

РЕЦЕНЗИЯ

**от доц. д-р Ирина Д. Пунева, ИФРГ – БАН
относно дисертационен труд “Влияние на дехидратационния стрес и АБК
върху разтворими белтъци и антиоксидантни ензими в прорастъци от
пшеница” на докторанта Светла Николова Събева за присъждане на
образователната и научна и степен “доктор”**

Засоляването и засушаването на почвата са едни от най-съществените абиотични стресове, които ограничават растежа на значими за селското стопанство култури. Способността на растителната клетка да се адаптира и да преживява при условия на дехидратационен стрес включва задействане на мрежа от сигнализиращи събития, включително продукцията на активни кислородни форми (АКФ) и хормони като абсцисинова киселина (АБК). За нея се знае, че регулира много важни процеси, свързани с растежа и развитието на растенията и играе критична роля при отговори на стрес, като регулира покълването на семената и ранното развитие на кълновете в условия на дехидратация. По тези причини, проведеното от докторанта изследване върху влиянието на дехидратационния стрес и АБК в прорастъци от пшеница, допринася за решаване на твърде актуален проблем. Това е така, защото получените резултати биха могли да бъдат както с фундаментален така и с практически принос.

Дисертационният труд на Светла Събева е посветен на изучаване на разтворими белтъци и антиоксидантни ензими в прорастъци от пшеница, подложени на дехидратация и екзогенно въздействие с АБК. Работата обхваща 160 страници. Структурирана е добре с правилни пропорции между отделните глави. Библиографската справка е направена въз основа на 378 автора, от които 27 на кирилица, а останалите - на латиница.

Литературният обзор обхваща 48 страници, в които коректно е отразено съвременното състояние на проблема. Дисертантката показва добра литературна осведоменост, която илюстрира чрез задълбочена характеристика на различните форми на абиотичен стрес, водещи до дехидратация на растенията. Систематизирани са съществуващите понастоящем знания за отражението на дехидратацията върху цялата клетка, състоянието на плазмените мембрани като първи стресов сензор, върху нарушения на метаболитни пътища, водещи до натрупване на АКФ, токсични и междинни

метаболити, подтискане синтеза de novo на нормална РНК и експресия на специфични гени, отговорни за стартиране синтез de novo на стресови белтъци. Прави впечатление задълбоченото познаване генезиса на АКФ, тяхната локализация върху органелни мембрани с висока метаболитна активност или постоянен електронен поток, а също и появата им като функция от онтогенетичното развитие на растителния организъм. Отражена е динамиката при превръщане на една активна форма в друга, както и механизмите на въздействие на АКФ върху растителната клетка на различни нива. Посочено е двойственото поведение на АКФ с добро изясняване на баланса между тяхната увреждаща цитотоксична роля и позитивната им защитна роля. Задълбочено са описани и сигналните функции на АКФ при стресови отговори, както и провокираната от тях експресия на гени, свързани с ензимни и не ензимни отговори на редица защитни реакции. Направен е аналитичен преглед на широката палитра от разнообразни защитни механизми, които растенията са придобили, за координирано преодоляване на стресово възникнали физични и биохимични проблеми с акцент върху синтеза на различни стресови белтъци – белтъци на термичния шок, киселинно разтворими, ниско молекулни, устойчиви на протеази, хидрофилни LEA белтъци и прочие. Литературният преглед внушава добро познаване и на начините за обезвреждане на АКФ с отделено особено внимание на антиоксидантните ензими пероксидаза (ПО), супероксиддисмутаза (СОД) и каталаза (КАТ), които са свързани и отговорни за тези процеси.

Литературният обзор не е механичен сбор от факти по изследвания проблем. Прави приятно впечатление способността на докторанта логично да обсъжда съществуващите до момента данни. Като подхожда аналитично към достъпната ѝ литература, Светла Събева посочва различни аспекти и въпроси, касаещи проучвания от нея проблем, които понастоящем са дискуссионни и не изяснени. Въз основа на този подход и на добрата ѝ литературна осведоменост, тя обосновава и формулира ясно целта на своя научен труд, както и въпросите, чието решаване е необходимо за реализиране на поставената цел.

Методичният подход е адекватен на поставената цел и произтичащите от нея задачи. В процеса на научните си изследвания, докторантката е овладяла и използва успешно широк набор от класически и модерни методи.

Прави приятно впечатление критичният подход към ползваната методология. Така, при прилагане на Real – Time PCR анализ, Събева модифицира стандартния Light Cycler протокол (Ball et al., 2003), провеждайки допълнителна четвърта стъпка в амплифициращата програма, с което успява да улови селективно флуоресцентния сигнал, излъчен само от очаквания специфичен PCR продукт.

Достоверността на получените резултати е гарантирана чрез използване на подходящи статистически анализи, базирани на съвременни статистически програми и специализиран софтуер.

Резултатите и тяхното обсъждане са изложени на 73 страници. Те са добре структурирани и онагледени, като са представени с помощта на 9 графични табла, 25 денситометрични табла, отразяващи белтъчни електрофоретични профили и електрофоретични профили на изследваните антиоксидантни ензими, 19 снимки на гелове, илюстриращи полипептидни и изоензимни електрофоретични профили и 1 снимка на пшенични прорастъци, подложени на 2 форми на стрес и екзогенни агенти, водещи до дехидратация.

Безспорно достойнство на предоставения ми за рецензиране труд е стремежът на докторанта да прилага комплексен подход в процеса на изучаване отговорите на подложени на различни форми на абиотичен стрес пшенични прорастъци, а именно – поетапно използване на физиологични и биохимични изследвания, последвани от генетични проучвания.

По-значимите изводи, отразени в дисертационния труд доказват, че в корените на *Triticum aestivum*, в по-късните онтогенетични фази от развитието на прорастъците, има корелация между стимулирането на растежа от H₂O₂ и понижените нива на МДА. Авторката доказва, че при изследваните форми на стрес, не настъпва тотална промяна на белтъчните профили, които са характерни за прорастъци, отгледани в норма. Установените стресови промени на различни полипептиди нямат специфичен характер, но белтъчна мобилизация настъпва по различно време в зависимост от приложения стрес. Не е установено чувствително инхибиране на характерните синтезирани в норма белтъци, както и рязко нарастване на стресови белтъци. Изследваните антиоксидантни ензими се включват в отговора на стрес поетапно. Първо се променя изоензимният профил на ПО, следван от този на КАТ и най-късно са регистрирани промени в профила на СОД, като е установено, че активността

на тези ензими е тъканно специфична. При сравняване експресията на два гена, кодиращи пероксидазни изоензими, се установява, че по-чувствителен към стресови ситуации е ген *POXI*. Докторантката доказва, че ниската температура е най-силният ефектор с установено негативно действие върху растежа, съдържанието и профилите на нативни белтъци и полипептиди, изоензимните спектри на антиоксидантните ензими и генната експресия.

Добрата литературна осведоменост на Събева ѝ позволява логично да тълкува и интерпретира получените резултати. Често, при съществуващи противоречиви данни на други автори, тя заема категорично и мативирано становище въз основа на получените от нея резултати.

Към дисертационния труд имам следните бележки и препоръки:

- В периода 2010 г. – 2011г. в литературата има публикации, касаещи изучавания проблем, които докторанта би било добре да включи в обзора си. Обстоятелството, че само за първото тримесечие на настоящата година са излезли от печат над 10 статии по темата на докторската работа, още веднъж доказва значимостта и актуалността на дисертационния труд.

- Добре би било също да се отбележи ролята на АБК в отогенезата и на нисши растения (зелени едноклетъчни водорасли), както в норма, така и в условия на стрес, което би дало възможност да се правят изводи за някои универсални отговори на висши и нисши растения по отношение на този хормон.

- Определяне съдържанието на H_2O_2 е извършено по метода на Jessup et al. (1994), основан на окислението на KJ до J_2 . С този метод се регистрира освен H_2O_2 и други пероксиди например хидропероксиди. Добре би било успоредно с този метод да се използва и методът на Paterson et al. (1984), който се базира на реакция, специфична само за H_2O_2 без намесата на други пероксиди или АКФ.

- В илюстративния материал полипептидните и белтъчни спектри са представени както като снимки на гелове така и като денситограми с превес на последните. Добре би било за по-директно възприемане на резултатите да доминират снимките.

- Както и самата докторантка отбелязва в литературния обзор, поведението на изучаваните стресови маркери е различно при чувствителни и толерантни към съответния стрес сортове. Препоръчително е в бъдещи работи

да се сравняват чувствителни с устойчиви растения, което ще бъде база за нови изводи и заключения.

Предоставената ми за рецензиране работа притежава съществени научни приноси. Безспорен е оригиналният характер на установената чувствителност към стрес на базичните изоинзими на ПО и възможността активността на този ензим да се използва като маркер за нискотемпературен и осмотичен стрес. За първи път Светла Събева установява различия в отговорите на прорастъци от *Triticum aestivum* към екстремни температури (ниски и високи), проявени в различните полипептидни профили, изоензимни спектри на изучаваните антиоксидантни ензими и нивата на транскрипти. Същевременно тя установява сходство в отговорите към ниска температура и осмотичен стрес от една страна и сходство между високо температурен стрес и екзогенно въздействие с АБК от друга. Оригинален и приложен за първи път е и подходът да се изследва хроничното влияние на дехидратационен стрес, постигнат чрез различни въздействия, върху темпа на прорастване и растеж на семена от пшеница, електрофоретичните профили на нативни белтъци и полипептиди, както и на ензимите ПО, КАТ и СОД, изолирани от тях. За първи път е установено и че в корените на млади прорастъци липсват CuZnСОД изоензими, а се регистрират само MnСОД и FeСОД изоензими.

По темата на дисертационния труд докторантката е публикувала 3 статии, в които тя е водещ автор. Две от тях са публикувани в наши списания – Доклади на БАН и *Bulg. J. Pl. Phys.*, а третата статия е публикувана в международното списание *Acta Agronomica Hungarica*. Във връзка с тях до този момент са забелязани 13 цитата в международни списания, повечето от които с импакт фактор.

З А К Л Ю Ч Е Н И Е

Докторантката Светла Събева познава добре литературата, свързана с изучаване на проблеми, касаещи влиянието на дехидратационен стрес върху пшенични прорастъци и отражението му върху разтворими белтъци и антиоксидантни ензими. Тя владее съвременни и класически методи, които прилага творчески и успешно за разрешаване на поставените в дисертацията цели и задачи. Извършената експериментална работа е с голям обем и е проведена прецизно и качествено. По-голямата част от изследванията имат оригинален характер. Получените резултати безспорно ще послужат като

фундамент за бъдещи разработки с теоретичен и приложен характер. Считам, че настоящият дисертационен труд отговаря на изискванията на Правилника за придобиване на научни степени и за заемане на академични длъжности в ИФРГ, във връзка с което си позволявам да предложа на почитаемите членове на СН Жури-ИФРГ да присъдят на Светла Николова Събева образователната и научна и степен “Доктор”.

26.05.2011г.

София

РЕЦЕНЗЕНТ:

(И. Пунева)