

## РЕЦЕНЗИЯ

за получаване на научната и образователна степен „доктор”

**Тема:** „Влияние на дехидратационния стрес и АБК върху разтворими белтъци и антиоксидантни ензими в прорастъци от пшеница”

**Докторант:** Светла Николова Събева

**Рецензент:** проф. д.б.н. Аглика Минева Едрева

Дисертационният труд на Светла Николова Събева е написан на 131 страници, от които 39 страници увод и литературен обзор, 8 стр. материал и методи, 70 стр. резултати и дискусия и 13 стр. обобщение и изводи, като включва 48 фигури и 1 схема. Литературният списък съдържа 351 заглавия.

Дисертантката показва завидна литературна осведоменост и много добра теоретична подготовка. Литературният обзор е адекватен на темата и целите на дисертационния труд и представя съвременна информация. В критичен план са разгледани противоречиви становища, обяснени с органната, тъканна и онтогенетична специфичност на обектите на изследване, както и с различията в параметрите на стресовите въздействия. Впрочем, това е направено и в раздела „Резултати и дискусия”. Задълбоченото познаване на литературата по въпроса е позволило на докторантката да формулира ясно и точно целта и задачите на дисертацията, както и изводите и приносите. Правят отлично впечатление научният език и стил, както и прецизното описание на резултатите, много доброто оформление на фигурите и текстовете към тях.

При разработването на дисертационния труд е приложен комплексен физиологичен, биохимичен и молекулярен подход, позволяващ изясняването на проблема от различни аспекти. Добре обоснован е изборът на фазата на развитие, в която са проведени изследванията - прорастване на семената, което е критичен етап, определящ по-нататъшната съдба на растенията. Обхванат е в динамика целият начален период, в който прорастъците са особено чувствителни към стресови въздействия. Направени са щателни предварителни проучвания за уточняване на експерименталния модел - етапи в процеса на прорастване на семената и параметри на стресовите

въздействия, както и за прецизиране на използваните експериментални техники. Трябва да се подчертае използването на надеждни съвременни биохимични и молекулярни методи, като електрофореза в полиакриламиден гел и транскрипционен анализ с помощта на Real-Time PCR.

Несъмнената актуалност на темата на дисертационния труд е нейно основно положително качество. В един все по-индустриализиращ се глобален свят, където стресовите ситуации, причинени от човешката дейност, а не само от природни фактори стават все по-чести, продължителни и драматични, неимоверно расте интересът към проблемите на стресовата физиология на растенията, целящи да изяснят механизмите на стресовите въздействия и стратегиите, използвани за преодоляване на стресовите ситуации. От особена важност са проблемите, свързани с недостига на вода и с всички фактори, които водят до дехидратиране на растителните организми - осмотичен и солев стрес и екстремни температури. Актуален е и изборът на обекта на изследването - пшеница, най-широко отглежданото културно растение в страните от умерения пояс, използвано за изхранване на много голяма част от населението на земята, като намалените добиви от тази култура вследствие засушаване могат да доведат до хуманитарни кризи. Детайлно развита е тезата, че окислителният стрес е общо първично субмолекулно събитие, отключващо по-нататъшната верига от метаболитни отговори при различни стресови въздействия; на тази основа са проследени важни метаболитни маркери за окислителен стрес, като малонилдиалдехид и водороден пероксид, както и широко разпространените в растенията антиоксидантни ензими: пероксидаза (POX), каталаза (CAT), супероксид дисмутаза (SOD).

Като главно и безспорно достойнство на дисертационния труд изпъква използването на нестандартен подход, а именно сравняването на отговорите на растението към няколко стресови фактора, причиняващи дехидратация на тъканите – висока и ниска температури, NaCl и захароза, приложени във високи концентрации. Освен това стресовите въздействия са приложени без прекъсване, в целия период на прорастване, т.е. имат хроничен, а не акутен характер, което доближава използвания модел до ситуацията, наблюдавани в природни условия. Този подход позволява получаването на интересни резултати с висока научна стойност, много от които представляват оригинален принос.

Към дисертационния труд могат да се направят някои критични забележки.

Използваният метод за определяне на водороден пероксид (Jessup *et al.*, 1994) не е специфичен, а отчита и хидропероксидите, както и всички присъстващи в извлека

вещества, които могат да окислят KJ до J<sub>2</sub>. Следователно тази важна особеност трябва да се има предвид за терминологията, която ще се използва при публикуване на резултатите.

Водородният пероксид е приложен като един от стресовите фактори при прорастване на пшеницата. В зависимост от концентрацията и начина на приложение обаче, той може да индуцира проява на кръстосана устойчивост (cross tolerance, cross acclimation), а не окислителен стрес. Тъй като водородният пероксид не инхибира растежа на пшеничните прорастъци (фиг. 1-3) и не повишава нивото на маркера за окислително увреждане, малониловия диалдехид (фиг. 4), едва ли може да се допусне действието му като стресов фактор.

Механизмът на важната реакция на Fenton (компонент от цикъла на Haber-Weiss), при която се образува най-токсичният свободен радикал OH<sup>•</sup>, е описана фрагментарно, без представяне на схема. Fe<sup>2+</sup> йони неправилно са наречени катализатор на реакцията (стр. 21); те са компонент в електронните преходи, чрез които тя се осъществява.

Не е посочена стойността на рН при електрофоретичните системи на Davis (1964) и Reisfeld (1962), използвани съответно при разделяне на анодни (кисели) и катодни (базични) протеини.

Неправилно на няколко места е използван терминът „корелация” вместо „връзка”, „зависимост”. „Корелация” е строг математически термин.

Налице са и някои неточни изрази. Използва се „нарастване” вместо „повишаване” на температурата и флуидността, „патогенно свързани” протеини, вместо „протеини, свързани с патогенезата” (pathogenesis related proteins, PRs), „позитивна” вместо „защитна” роля на водородния пероксид.

Очевидно е, че направените критични забележки и препоръки не засягат същността на проведените изследвания, а имат изцяло конструктивен характер.

В дисертационния труд са направени следните оригинални приноси.

- За първи път са установени различия в отговорите на пшенични прорастъци към ниска и висока температура. Това доказва, че освен дехидратирането, което е общ компонент при двете стресови въздействия, се включват и механизми, характерни за всеки един от тях. Тези разлики се изразяват в растежните показатели, спектрите на анодните пероксидази (фиг. 30.1, 36, 37) и SOD (фиг. 34, 39), полипептидните профили (фиг. 21, 22) и нивата на транскриптите на POX1, POX2 и CAT (фиг. 45, 46, 48).

- Показано е, че от всички изследвани стресови въздействия най-значителен ефект има ниската температура. Той се изразява в силно забавяне на мобилизацията на резервните протеини, придружено от подтискане на растежа и понижение на активността на антиоксидантните ензими CAT, SOD и POX, като в спектъра на катодните POX много от изоензимите, включително и главни компоненти, са напълно инактивирани. Инхибирана е също транскрипцията на гените на POX1, POX2 и CAT (фиг. 45, 46). Подтиснатата антиоксидантна защита води до окислително увреждане, което се доказва с повишените нива на водородния пероксид и малонилдиалдехида - продукт от фрагментирането на клетъчните мембрани.
- Оригинален характер има и наблюдението, че съществува значително сходство в отговорите на прорастъците към ниска температура и захарозен разтвор с висока концентрация. Това показва, че определящ в случая е общият компонент на двете стресови въздействия, а именно създаването на високо осмотично налягане в тъканите.
- Друг важен оригинален принос е, че в корените на прорастващи пшенични растения е установено наличие на FeSOD. С това се оспорва общоприетото становище, че FeSOD присъстват само в тъкани, съдържащи хлоропласти.

Наред с тези оригинални приноси налице са и редица приноси с потвърдителен характер.

- В млади пшенични прорастъци е установена висока органна и тъканна специфичност на POX и ниска специфичност на SOD и CAT.

- Изоензимните спектри на SOD и CAT са по-консервативни на стресови въздействия от тези на POX.

- Промените в катодните POX са по-силно изразени от тези на анодните POX.

- Ендоспермът се характеризира с по-ниска активност на изследваните ензими в сравнение със зародиша и корените. Отговорите на тези органи при стресови въздействия показват определени различия.

- В редица случаи различните стресови фактори индуцират сходни отговори. Тази неспецифичност се наблюдава в спектъра на CAT от корени (фиг. 42), катодна POX от корени (фиг. 38) и зародиши (фиг. 24.2), тоталните полипептиди от зародиши (фиг. 11) и ендосперм (фиг. 15, 20) и термостабилните полипептиди (фиг. 13); тя може да се обясни с наличието на общи компоненти в приложените стресови въздействия, а именно

дехидратирането на тъканите и окислителното структурно увреждане на мембраните, показано чрез повишените нива на малонилдиалдехида (фиг. 4).

- Не във всички случаи се наблюдава съответствие между нивото на транскриптите на POX1, POX2 и CAT гените и ензимните активности, което се обяснява с действието на транслационни и пост-транслационни фактори.

Във връзка с дисертацията са представени три излезли от печат публикации. В тях са отразени някои от експерименталните резултати, получени в хода на разработването на дисертационния труд. За научния интерес, който представляват тези публикации свидетелства фактът, че досега те са цитирани 13 пъти.

Дисертационният труд в голяма степен е лично дело на докторантката, което става очевидно след запознаване с публикациите във връзка с дисертацията, във всяка от които тя е първи автор.

Съгласна съм със справката за приносите.

### **Заключение**

Оценявам положително дисертационния труд на Светла Николова Събева като оригинално замислено и коректно проведено изследване с несъмнени научни приноси към стресовата физиология на растенията - научна област с изключителна актуалност, и препоръчвам да ѝ се присъди научната и образователна степен „доктор”.

гр. София

Рецензент:

18.05.2011г.