

РЕЦЕНЗИЯ

по конкурс за заемане на академичната длъжност **доцент** по специалност 4.3 Биологични науки (Физиология на растенията - 01.06.16), обявен в ДВ бр. 59 от 2 август 2011г.

Кандидат: д-р **Калина Иванова Ананиева**, гл. асистент в секция *Фотосинтеза* на Институт по физиология на растенията и генетика при Българска Академия на Науките

Рецензент: дн **Лиляна Тодорова Масленкова**, професор в секция *Фотосинтеза* на Институт по физиология на растенията и генетика при Българска Академия на Науките

Като единствен кандидат в конкурса участва гл. асистент д-р Калина Иванова Ананиева. Тя е завършила Биологически факултет на Софийския Университет през 1983 г. с магистърска степен по биология, специалност *Молекулярна и функционална биология*. Научно-изследователската дейност на д-р Ананиева започва през същата година като специалист-биолог в секция *Фотосинтеза*, като се включва активно в изследванията на групата на проф. Васил Станев в областта на растителната екофизиология. През този период тя натрупва знания и опит в една важна и специфична област на фотосинтетичните изследвания, основана на анализ на газообмена на растенията и пътищата на дифузия на CO₂ от околния въздух до хлоропласта. Като специалист-биолог в секцията тя работи и по проблематиката на групата на проф. Л. Попова върху изясняване ефектите на фитохормоните (АБК, ЖК и Ме-ЖК) върху фотосинтетичните реакции и ролята им в защитните механизми на растенията в условия на стрес. Изследванията са разширени и доразвити на едно ново ниво под формата на дисертационна работа, разработена от Калина Ананиева като докторант на самостоятелна подготовка към секция *Геномика и протеомика*. През 1999 г. К. Ананиева защитава успешно кандидатската си дисертация на тема „Влияние на метиловия естер на жасмоновата киселина, абсцисиевата киселина и бензиладенина върху растежа, биосинтезата на белтък и РНК в изолирани семедели от тиквичка (*Cucurbita pepo L. Zucchini*)” и получава научната степен кандидат на биологическите науки (доктор). От 1999 г. до 2002 г. работи като научен сътрудник II ст. в същата секция, а от 2002 г. и до момента е н. с. I ст. (гл. асистент) в секция *Фотосинтеза*. През периода май 2002-май 2003 осъществява post doc специализация в лабораторията на проф. J. van Staden в Research Centre for Plant Growth and Development към University of KwaZulu-Natal, Южна Африка. Членува в секцията по Физиология и биохимия на

растенията към Съюза на учените в България и във Федерацията на Европейските дружества по растителна биология (FESPB). Член е на редколегията на специализираното международно списание *Plant Growth Regulation* и дългогодишен езиков редактор на сп. *General and Applied Plant Physiology* (ново *Genetics and Plant Physiology*).

Общият списък на публикациите на д-р Ананиева включва **29** научни труда, върху които до момента на кандидатстване са забелязани **72** цитирания, подробно отразени в отделен списък. За участие в конкурса са представени **26** заглавия, всички на колективни публикации, в 11 от които Ананиева е първи и в 8 втори автор, което считам за показателно за значимостта на личното ѝ участие. **15** от публикациите по конкурса са отпечатани в списания с импакт фактор, от които **10** са в реномирани международни поредици, като: *Plant Growth regulation* (№22, 24, 25), *Physiol. Plant.* (№15, 16, 23), *J of Plant Physiol.* (№21), *South African J of Botany* (№19), *Biologia Plant.* (№13), *Photosynthetica* (№6) и **5** статии са в Доклади на БАН (№ 7, 12, 14, 17, 20). Общият ИФ на представените по конкурса трудове е **21.567**. **Единадесет** от заглавията в списъка на публикациите са на научни трудове в български (№1-4, 8-11, 18, 26) и чуждестранни списания (№5) без ИФ, като статията в сп. *Genetics and Plant Physiology* под № 26 е с обзорец характер. И в двата преставени списъка на публикациите д-р Ананиева не е включила автореферата на докторската си дисертация. Към материалите по конкурса са представени още списък на участия в **11** международни и **2** национални научни форума, както и темите на разработваните с нейно участие проекти. През периода 2004-2011 г. Ананиева е била ръководител на един проект към НФНИ и на един по линия на ЕБР и съизпълнител в още 4 научно-изследователски проекта.

Цялостната научно-изследователска дейност на д-р Ананиева е в областта на обявения конкурс – физиология на растенията, като приносите от представената по конкурса научна продукция, извън включените в автореферата за присъждането на научната и образователна степен *доктор* публикации, могат да бъдат отнесени към две тематични направления. **Първото** от тях е свързано с началото на научната ѝ кариера и е насочено към изясняване на лимитиращите звена, водещи до понижена фотосинтетична продуктивност при неблагоприятни условия на околната среда (засушаване, токсични канцентрации на тежки метали). Резултатите от съвместните ѝ изследвания със

сътрудници от групата по *Екология на фотосинтезата* са представени в шест публикации, с номера от 1 до 6 от списъка на статии по конкурса. Като приноси с **научно-приложен характер** към този раздел могат да бъдат отнесени резултатите от изследванията за установяване ефектите на засушаването върху интензивността на фотосинтезата, транспирацията и биологичната продуктивност на различни сортове фасул и царевица и за влиянието на азотното торене при възстановяване на активността на фотосинтетичния апарат след прекратяване на водния стрес (№ 1, 2, 4).

Второто и основно тематично направление определя ясно очертан научен профил на изследванията на д-р Ананиева, свързан с изучаване на механизмите и фитохормоналната регулация на процеса стареене, както и на взаимовръзката между процесите фотосинтеза и стареене. Тематиката е едно от основните направления на изследванията в секция *Фотосинтеза* повече от 10 години, **като научната продукция във връзка с изследванията по това тематично направление носи основния приносен характер в научното творчество на кандидатката.** Комплексната характеристика на процеса стареене се основава на изследвания в два растителни органа: семедели (изолирани или интактни) и същински листа на тиквичка (*Cucurbita pepo* L. zucchini), по време на естествено стареене или индуцирано под въздействие на различни физични и химични фактори изкуствено стареене и се базира на широк спектър от параметри, характеризиращи стареенето: фотосинтетични параметри (хлорофилно съдържание, скорост на фотосинтезата), ултраструктурни промени на хлоропластите, транскриптомен анализ, протеомен анализ, както и промени в ендогенните нива на всички групи фитохормони, имащи отношение към процеса стареене. Голяма част от изследванията по това направление са разработвани през периода 2004-2011 г. под нейно ръководство по линия на два научно-изследователски проекта - към НФНИ на тема: „Механизми на регулация на стареенето в интактни семедели от тиквичка (*Cucurbita pepo* L. zucchini)” и по линия на ЕБР с ЧАН на тема „Метаболизъм на цитокинините и регулация на генната експресия по време на индуцирано стареене и последващо възстановяване на семедели на *Cucurbita pepo* L.(zucchini)”, което е доказателство за актуалността на разработваната тематика и израз на уменията на д-р Ананиева да привлича подходящи партньори за успешно и качествено провеждане на изследванията.

Приносите от проучванията по посоченото по-горе основно тематично направление са с подчертано **фундаментален характер**, като **получените нови научни факти чрез използване на оригинални методични подходи** допринасят за разширяване на познанията ни относно механизмите на процеса стареене и в частност, разкриват механизмите на органо-специфичен контрол на стареенето в семеделите на тиквичка с участието на различни групи фитохормонии.

Една съществена част от изследванията в това тематично направление са посветени на изучаване на механизмите на действие на двойката фитохормони-антагонисти – цитокинина 6-БАП и абсцисиновата киселина (АБК), както и на метиловия естер на жасмоновата киселина (ЖК-Ме), в качеството му на растежен регулатор с добре известен стимулиращ ефект върху процеса на листното стареене. Експериментите са проведени в моделна система на изолирани семедели от тиквичка (*Cucurbita pepo* L. zucchini), като фитохормоните са прилагани самостоятелно или в комбинация. Получените оригинални резултати от проведените изследвания на транскрипционно ниво посредством *in vitro* биосинтеза на РНК в изолирани ядра, на нивото на биосинтеза на белтъци, както и върху функционалната активност на фотосинтетичния апарат са отразени в публикации с номера **7, 8, 9, 12, 13, 14, 17 и 18**.

➤ Установено е, че АБК и ЖК-Ме потискат транскрипцията, като инхибират активността на двете РНК полимерази (РНК полимераза I и РНК полимераза II). Инхибиторният ефект на АБК е по-силно изразен в сравнение с ЖК-Ме (**14**).

➤ ЖК-Ме повлиява белтъчния метаболизъм в изолираните семедели, предизвиквайки ускорена деградация на резервните белтъци по начин сходен с действието на цитокинините и паралелно с това синтез на специфични жасмонат-индуцирани белтъци – JIPs. С помощта на денатурираща 2-D електрофореза е установено, че два от основните жасмонат-чувствителни полипептида с молекулна маса 43 и 53 kDa се състоят от няколко изомерни форми (**12, 13, 17**).

➤ Проведеният инхибиторен анализ с участието на инхибитора на протеази от тиолов тип фенилметилсулфонил флуорид (PMSF) показва, че в синтезата на JIPs участват аминокиселини, които се освобождават по време на хидролизата на резервните глобулини в семеделите с участието на протеази, чувствителни към PMSF (**13**).

➤ В моделната система на изолирани зеленеещи семедели от тиквичка са установени антагонистични ефекти на 6-БАП и ЖК-Ме върху растежа, фотосинтетичната активност и белтъчния метаболизъм. Същевременно е показано, че цитокинините неутрализират инхибиторния ефект на ЖК-Ме върху изследваните параметри при комбинираното приложение на двете вещества, включително натрупването на JPs. Изказано е предположение, че наблюдаваният антагонизъм може да представлява механизъм за поддържане на клетъчната хомеостаза в условия на стрес през ранните етапи от прорастването (7, 8, 17) .

➤ В сравнение с АБК, ЖК-Ме е по-силен фактор, ускоряващ стареенето в изолирани зеленеещи семедели от тиквичка, съдейки по понижената активност на фотосинтезата и пониженото натрупване на хлорофил в резултат от по-висока степен на инхибиране синтезата на основния предшественик на хлорофила δ -аминолевулинова киселина (δ -АЛК) (7, 18).

Едногодишната следдокторска специализация на д-р Ананиева в лабораторията на проф. J. van Staden в Research Centre for Plant Growth and Development към University of KwaZulu-Natal, Южна Африка, както и успешното ѝ сътрудничество с колегите от лабораторията на проф. M. Kamínek от Института по експериментална ботаника на ЧАН разширяват и задълбочават творческите ѝ търсения по изясняване механизмите на контрол на естественото и изкуствено предизвиканото стареене с участието на ендогенните фитохормони и по-специално, на цитокинините, известни като главната група фитохормони с доказан инхибиторен ефект върху процеса стареене. Експериментите са проведени върху семедели и диференцирани листа от интактни растения на тиквичка (*Cucurbita pepo* L. *zucchini*). Към **категорията получаване и доказване на нови факти** могат да се отнесат следните резултати, отразени в серия от публикации с номера **16, 20, 21, 15, 22, 19, 23, 25 и 26**.

➤ На базата на широк спектър от параметри, характеризиращи стареенето (понижено хлорофилно съдържание, увреждане на хлоропластната ултраструктура, намаление на всички функционални групи цитокинини), е установено, че ЖК-Ме, приложен екзогенно в качеството на химически стресов агент, е по-силен индуктор на стареенето на семеделите в сравнение с тъмнината, приложена като физичен агент, провокиращ стареене. Изказано е

предположението, че даун-регулацията на ендогенните цитокининови нива, както и инхибираната трансформация между активните и неактивни групи цитокинини са част от механизма, чрез който жасмонатите провокират стареене в интактните семеделите от тиквичка (16,20,21).

➤ Установени са промени в нивата на ендогенните цитокинини в семеделите на интактни прорастъци от тиквичка в периода на позеленяване и последващо естествено стареене, които се изразяват в намаление на физиологично активните цитокинини, цитокининовите нуклеотиди, и цис-изомерите на зеатиновите деривати, докато физиологично неактивните 7- и 9-глюкозиди и О-глюкозидите нарастват. Тези хормонални се съпътстват от понижаване във функционалната активност на фотосинтетичния апарат и постепенно понижаване на количеството на разтворимите белтъци. По време на реювенилизацията на семеделите след декапотиране на епикотила се наблюдава пълно възстановяване на полипептидния профил на разтворимите белтъци, и на функционалната активност на фотосинтетичния апарат, паралелно с нарастване на ендогенното съдържание на физиологично активните цитокинини, цитокининовите нуклеотиди и цис-зеатините (15, 22).

➤ Установено е, че за разлика от естественото стареене на цели прорастъци от тиквичка, когато цитокининовите О-глюкозиди нарастват, по време на тъмнинно-индуцираното стареене те намаляват, което показва, че съществува различна метаболитна регулация на ендогенните цитокининови нива по време на естественото и изкуствено предизвиканото стареене (15).

➤ Показано е, че тъмнинно-индуцираната деструкция на хлоропластната структура в семеделите на цели прорастъци от тиквичка и нейното последващо възстановяване след връщане към нормален светлинен режим се контролират от промените в нивата на физиологично активните цитокинини и техните нуклеотиди (15).

➤ Направена е биохимична характеристика на изолиран и частично пречистен от листа и семеделите на тиквичка ензим - цитокинин оксидаза/дехидрогеназата (СКХ) (ЕС 1.4.3.18), ключов за катаболизма на цитокинините. Установено е, че СКХ участва в регулацията на ендогенните нива на цитокинините по време на тъмнинно-индуцираното стареене на семеделите (19, 23).

➤ Изследвана е потенциалната роля на тъмнината за ускоряване на стареенето в индивидуално затъмнени семедели (единичен семедел или двойката семедели) в прорастъци на тиквичка и е установено, че ефектът на тъмнината да ускорява или забавя стареенето на единичен индивидуално затъмнен семедел зависи от светлинния статус на срещуположния семедел от семеделната двойка. В механизмите на наблюдавания органо-специфичен контрол на стареенето в индивидуално затъмнените семедели първостепенна роля имат цитокинините с участието на ключовия ензим СКХ (23).

➤ В оригинални експерименти, включващи локалното затъмняване както на двойката семедели, така и на първичния лист на прорастъци от тиквичка е показано, че съществува механизъм на комуникация между семеделите и първичния лист, който се контролира от цитокинините и АБК, и който може да се включи в отговор на външни фактори, като напр. засенчване на листните органи по време на ранните етапи от развитието на растенията. В сравнение с първичния лист, семеделите от тиквичка са много по-резистентни към тъмнинния стрес, приложен или директно или върху съседния листен орган, което може да се дължи на повишените нива на ендогенните цитокинини в семеделите в сравнение с първичния лист (25).

Приемам за правилно отразени и компетентно анализирани в авторската справка основни научни приноси от изследванията на кандидатката. Положителна оценка заслужава и направеният подробен анализ на изследванията в литературата върху процеса на листното стареене, включен в колективната обзорна публикация върху декапитацията, като подход за изучаване на механизмите на стареене (26). Подробно са разгледани експерименталните подходи, като декапитация и дефолиация, ролята на хормоналния баланс и промяната в sink-source взаимодействията след декапитацията, които имат ключово значение за изясняване на контролните механизми на стареенето при растенията.

От забелязаните 72 цитата на 18 от публикациите на д-р Ананиева 47 са в чуждестранни списания и книги (23 от които с ИФ), 12 са в български научни издания и 13 са цитати в дисертации. Най-голям е дялът на цитатите върху публикациите по основния научен профил на д-р Ананиева. За публикации с номера 10, 13 и 15 са отбелязани между 5 и 15 цитата. Този факт, както и представянето на резултатите на голям брой международни научни форуми ги прави добре разпознаваеми в специализираната литература и е

показателно за актуалността на разработваната тематика и качеството на провежданите изследвания.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Анализът на предоставените по конкурса материали показва, че кандидатът за научната длъжност **доцент** по специалност физиология на растенията гл. ас. д-р **Калина Иванова Ананиева** участва с достатъчно по обем и качество научна продукция, отговаряща на изискванията на ЗРАСРБ и приетия от НС на ИФРГ Правилник за неговото приложение. Дългогодишните ѝ изследвания и придобитият експериментален опит я характеризират като изявен специалист в една специфична област на изследване, свързана с разкриване на механизмите и фитохормоналната регулация на процеса стареене.

Всичко изложено по-горе ми дава основание да подкрепя нейната кандидатура и да препоръчам на членовете на Научното жури и на НС на ИФРГ на гл. ас. д-р **Калина Иванова Ананиева** да бъде присъдена академичната длъжност **доцент** по физиология на растенията.

16 ноември 20011

София

Рецензент:

(проф. дн Л. Масленкова)