

РЕЦЕНЗИЯ

Върху дисертационен труд за **присъждане на научната и образователна степен „доктор“**

Автор на дисертационния труд: Гургана Кирилова Михайлова, асистент в секция *Фотосинтеза* на Институт по физиология на растенията и генетика при Българска Академия на Науките

Тема: “Засушаване на възкръсващото растение *Haberlea rhodopensis* в условия на висока температура и различни светлинни режими”

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

Представеният ми за рецензиране дисертационен труд на Гургана Михайлова е изработен като редовна докторантура в секция «Фотосинтеза» на ИФР (сега ИФРГ) на БАН и е по специалността *биохимия* (шифър 01.06.10). Дисертацията е написана на **141** машинописни страници и е структурирана по класическа схема. Уводът и литературният обзор заемат **35** страници, разделът «Материали и методи» е изложен на **18** страници, а резултатите и тяхното обсъждане са представени на **55** страници и обобщени в отделно *Заклучение* от четири страници. Илюстративният материал е представен от **46** фигури, **4** от които са включени в литературния обзор. Библиографската справка е пълна и коректна и включва списък на **261** литературни източника. Представен е списък от **4** статии по темата на дисертацията, публикувани в специализирани международни и наши издания, като: *Photosynthesis Research, Biotechnology&Biotech. Equipment, GAPP* и *Proc. 15 Intern. Congress on Photosynthesis* (in press) с общ **ИФ 2. 913**. Докторантката е първи автор в публикациите, което е показателно за решаващо лично участие. Върху публикуваните трудове по дисертационната тема до момента са забелязани **3** цитата. Представен е и списък, удостоверяващ докладването на резултатите по дисертацията на **5** научни форума.

Дисертационният труд е посветен на изследване на механизмите на увреждане и адаптация на *Haberlea rhodopensis* L. (Gesneriaceae), уникален за европейската флора представител на висшите пойкилохидридни растения, в условия на засушаване при висока температура и различни светлинни режими и представлява естествено продължение и разширяване на традиционните през последните 15 г. изследвания в

секция „Фотосинтеза“. Пойкилохидридните растения притежават необикновена способност да преживяват характерните за местообитанията им често повтарящи се цикли на екстремно засушаване и рехидратиране и да се възстановяват напълно след обезводняване на тъканите им до въздушно сухо състояние. Въпреки значителния напредък в изясняване на физиологичните и молекулярни основи на толерантността към десикация (DT), много въпроси остават все още открити. Несъмнената актуалност на изследванията по темата произтича и от факта, че фотосинтетичният апарат на хомеохлорофилните DT растения трябва да притежава специални адаптивни механизми поради повишения риск от окислителен стрес и фотоинхибиция, в резултат от блокиране на нормалната фотосинтетична активност в състояние на дехидратиране, съпътствано от повишаване в температурата и интензитета на светлината.

Литературният обзор е адекватен на темата и представлява кракът и целенасочен преглед на съвременното състояние на проблема. Същевременно той показва, че докторантката е запозната много добре с литературата по разработваната проблематика. В обзора са разгледани и систематизирани съществуващите в литературата данни, отнасящи се до характеристиката, разпространението и обеностите в стратегиите и механизмите на устойчивост на различни типове толерантни към екстремно засушаване растения. Подробно са разгледани причините за възникване на механичен стрес в клетките на засушените растения и механизмите, целящи намаляване на уврежданията. Специално внимание е отделено на механизмите за предпазване на мембранните и белтъчни структури от увреждания и за защита срещу окислителен стрес в процеса на обезводняване, както и на влиянието на екстремното дехидратиране върху активността на фотосинтетичния апарат. Във връзка с **целта** на дисертационното изследване е направен преглед на съществуващите данни за влиянието на температурата и светлината в процеса на засушаване, като е акцентирано върху дискуссионните или не достатъчно изяснени аспекти на увреждане и кросадаптация на растенията при комбинираното влияние на стресовите фактори на околната среда. **Произтичащите от целта шест конкретни експериментални задачи** са свързани с детайлно характеризиране на уврежданията и адаптацията към посочените стресови фактори, приложени самостоятелно или в комбинация, чрез установяването на корелация с промените в някои стресови маркери, в активността на антиоскидантните ензими, в полипептидните профили на изолирани тилакоидни мембрани, в експресията на стрес-индуцирани sHSPs и в активността на

фотосинтетичния апарат на растенията.

При разработването на дисертационния труд е приложен комплексен методичен подход, основаващ се на използване на взаимно допълващи се физиологични, биофизични, биохимични и молекулярни методи. От подробното им и аналитично описание, включващо освен теоретична постановка и подробен план на провеждане на измерванията, личи доброто овладяване и успешното прилагане на експерименталните подходи и използваните методи за изясняването на различни страни на изследвания проблем.

В раздел «Резултати и обсъждане» е описана и анализирана извършената значителна по обем експериментална работа, представляваща по своята същност едно детайлно изследване на влиянието на важни съпътстващи дехидратирането на растенията фактори на околната среда, оказващи съществено влияние върху стресовия отговор и адаптивните механизми на растенията в естествените им местообитания. Използването на висока температура и висок светлинен интензитет в комбинация към засушаването на растенията доближава експерименталната схема до природните условия и е безспорното предимство на дисертационния труд.

В **първата и най-обширна част** (5.1.) на раздела са представени и подробно анализирани промените в параметрите, характеризиращи стабилността на мембраните, скоростта на CO_2 асимилацията и кислородното отделяне и фотохимичната активност на фотосистемите 1 и 2 в серия от сравнителни изследвания на контролни и засушени при оптимална ($23/20^\circ\text{C}$) и повишена ($38/30^\circ\text{C}$) температура растения. Резултатите показват, че третирането на контролни (добре оводнени) растения *Haberlea rhodopensis* с висока температура (38°C) при нисък интензитет на осветяване ($30 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) предизвиква известно увреждане на мембраните, понижаване на фотохимичната активност, особено на ФС2, и слабо намаляване в количеството на белтъците на тилакоидните мембрани, като нееднаквата стартова стойност на относителното водно съдържание на листата може да е причина за една част от наблюдаваните различия. В процеса на засушаване на растенията при висока температура, когато загубата на вода от тъканите става многократно по-бързо, промените в изследваните параметри са значително по-добре изразени, но уврежданията остават напълно обратими при последващото 7-дневно рехидратиране. Въпреки установената добра корелация между промените в интегритета на мембраните и фотохимичната активност в листата на засушените растения и промените в полипептидните профили, възстановяването на

стойностите на електролитното изтичане след рехидратиране и наблюдаваното значително увеличаване на стойностите на q_N се нуждаят от по-задълбочена дискусия. В своята цялост резултатите от този раздел дават основание да се направи заключение, че устойчивостта на хомеохлорофилната *Haberlea* към екстремно засушаване се съпътства и от повишена термотолерантност. Изказано е предположение за възможните фактори, чрез които се ограничава степента на окислителния стрес и се допринася за преодоляване на стресовото въздействие и за пълното възстановяване на растенията след рехидратиране. Повишената дисипация на възбуждащата енергия, по-високото съдържание на пролин и каротеноиди и запазването на активността на антиоксидантните ензими в процеса на засушаване при висока температура и слаба светлина ($30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) имат решаваща роля в това отношение. Установена е появата на нови белтъци с молекулна маса между 10–30 kDa при екстремно засушените растения (с ОВС 20% и 8%) при оптимална и висока температура. Чрез използването на поликлонално анти-sHSPs антитяло е установено наличието на 9 различни изоформи на sHSPs, чиято експресия е зависима от засушаването, температурния стрес или от комбинираното им действие, а също така и от степента на засушаване на растенията.

Във **втората част** (5.2.) на раздела «Резултати и обсъждане» е представена оценка на чувствителността на фотосинтезата към фотоинхибиране в процеса на засушаване на *Haberlea* при оптимална и висока температура и след рехидратиране на растенията. Анализът на параметрите на светлинните криви на кислородното отделяне показва активиране на алтернативни електронни потоци (AES), които, както показват експерименталните данни, не са свързани с повишен ФС1-цикличен електронен транспорт. Друго възможно обяснение на повишаването на AES са цикличен електронен транспорт около ФС2 и/или процеси, водещи до редукция на пластохиноновия пул от стромални донори на електрони. Експериментални доказателства в подкрепа на първата възможност са получени при анализ на параметрите на главните термолуминесцентни В- и Q- пикове и на AG-емисията в процеса на засушаване на *Haberlea* в изследванията на Масленкова и Пеева.

В **третата част** (5.3) на «Резултати и обсъждане» ефектът на светлината в процеса на засушаване е оценен в серия от сравнителни измервания на фотосинтетичната активност и на нивото на стресовите маркери в растения *Haberlea*, растящи при различна интензивност на светлината в техните естествени местообитания - $25\text{--}30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (означени като «сенчести») и около $600 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (означени като «слънчеви»).

Резултатите показват, че интегритетът на мембраните на слънчевите растения е добре защитен и независимо от по-високото съдържание на малонилдиалдехид в листата на хидратираните (контролни) слънчеви растения, в сравнение със сенчестите, засушаването на растенията при висок интензитет на светлината не предизвиква допълнително фотоинхибиране. По-значителното понижаване на хлорофилното съдържание, по-високата фотохимична активност и скорост на фотосинтеза, и нарастването на дела на енергията на възбуждане, която не се използва за фотохимия, са фактори, допринасящи за намаляване на степента на фотоинхибиране в процеса на засушаване на слънчевите растения.

Като цяло формулировките на **изводите** интерпретират правилно получените в дисертационния труд експериментални резултати. Основните **приноси** от проучванията по дисертационната тема на Гергана Михайлова са главно с фундаментален характер, като получените нови научни факти, свързани с отговорите на цветното възкръсващо растение *Haberlea rhodopensis* към повишена температура и висок светлинен интензитет са оригинални и допринасят за разширяване на познанията ни относно многообразието на стратегиите и за разкриване на механизмите на адаптивните реакции на растения при неблагоприятни условия на силен воден дефицит.

Със задоволство трябва да отбележа, че в голямата си част отправените към докторантката в процеса на подробното апробиране на дисертацията пред научното звено въпроси и конструктивни бележки са взети под внимание и съответно отразени в представения дисертационен труд. Препоръката ми към Гергана Михайлова, която може да бъде отправена към всеки млад научен работник, е в бъдещата си работа да развива целенасочено умение за критичен анализ и обобщение на резултатите от усвоените многобройни и модерни експериментални подходи.

Авторефератът е в обем от 43 страници и по структура и съдържание отразява правилно същността на дисертационния труд.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Дисертационният труд на ас. Гергана Кирилова Михайлова е посветен на изучаване на важен научен проблем в областта на стресовата физиология на растенията. Проведени

са голям брой изследвания на високо методично ниво, като получените резултати представляват принос в разгадаване на механизмите на толерантността на растенията към един от най-често срещаните и причиняващи значителни увреждания стресове на околната среда, какъвто е засушаването. Оценявам положително дисертационния труд, като считам, че в голяма степен той е лично дело на докторантката и я характеризира като млад изследовател с много добра методична подготовка и теоретични познания в областта на съвременната физиология и биохимия на растенията. Всичко това ми дава основание убедено да препоръчам на членовете на уважаемото Научно жури да присъди на ас. **Гергана Кирилова Михайлова** образователната и научна степен „**Доктор**”.

07.06. 2012 г.

Рецензент:

София

/проф. дн Лиляна Масленкова /