

## РЕЦЕНЗИЯ

върху дисертационен труд за придобиване на образователната и научна степен “доктор” по професионално направление 4.3 “Биологически науки”, научна специалност 01.06.10 “Биохимия”

Автор на дисертационния труд: **Веселин Атанасов Стойчев**, редовен докторант в секция “Молекулярна биология на растителния стрес”, ИФРГ – БАН

Тема на дисертационния труд:

**“Белтъчни промени при заблатяване на бяла (*Trifolium repens* L.) и червена (*Trifolium pratense* L.) детелина”**

Рецензент: **Лиляна Георгиева Гилова**, доц. д-р, ИФРГ – БАН

Дисертационният труд на Веселин Стойчев обхваща 115 стандартни страници, включително 22 фигури и 4 таблици. Структуриран е по общоприетия модел в следните раздели: Въведение (2 стр.), Литературен обзор (34 стр.), Цел на дисертацията (2 стр.), Материали и методи (10 стр.), Резултати (36 стр.), Дискусия (11 стр.), Изводи (1 стр.), Приноси (1 стр.), Използвана литература (15 стр.), с добър баланс между тях, като естествено е даден превес на собствените резултати и тълкуването им. На по една страница са представени използваните съкращения и публикациите по темата на дисертацията. Литературният списък съдържа 169 заглавия, от които 3 на кирилица, а останалите на латиница.

Заблатяването на почвата е проблем, нарастващ през последните десетилетия поради засилените природонесъобразни човешки активности и свързаните с тях глобални климатични промени. Заблатяването оказва дълготраен негативен ефект върху плодородието на почвите, води до намаляване на земеделската продукция и в крайна сметка причинява значими икономически загуби. Особено силно е влиянието на заблатяването върху тревистите нискостеблени растения, каквито са фуражните бобови растения, чиято коренова система изцяло попада в зоната на преовлажняване. Наблюдава се голям спад на общото белтъчно съдържание, а от там и на хранителната стойност на фуражите. Отделните видове и сортове обаче, проявяват различна поносимост към заблатяване.

Поради отличните им хранителни качества и лесно смилаема растителна маса, бялата и червена детелини са стопански фуражни култури, широко застъпени в

умерените влажни региони. Стопанското значение на детелините, както и липсата на информация за въздействието на почвеното заблатяване върху надземната част на тези растения, прави изследването на отговора на детелините към преовлажняване и способността им за пост-стресово възстановяване особено актуално и важно. Сравнителният комплексен анализ на различни сортове детелини позволява оценка на тяхната устойчивост към стреса, което е от полза за селскостопанската практика за оптимизиране насажденията на терени, застрашени от заблатяване. От друга страна се обогатяват и задълбочават познанията относно динамиката на клетъчния метаболизъм и стратегиите за оцеляване.

В литературния обзор, обхващащ 34 страници, включително 3 фигури, са характеризирани различни аспекти на вредното въздействие на заблатяването, както и предимствата на бялата и червена детелина пред други фуражни растения, с което всъщност е добре аргументиран техният избор като стресов фактор и обект на изследване, съответно. Особено внимание е отделено на белтъците като компоненти на растителните клетки – техните разнообразни жизненоважни функции (структурни, транспортни, каталитични, информационни и защитни), тяхната динамика и стриктния, осъществяван на различни нива, контрол върху количеството и качеството им. Логично следва подробна характеристика на ензимите, чийто субстрат са белтъчните молекули. Описано е разнообразието на клетъчните протеази по структура, каталитичен механизъм, функция и локализация. Белтъците и тяхната динамика са акцент и в самата дисертационна разработка, което е уместно, като се има предвид важната им роля за преодоляване на стресови въздействия, за адаптиране на растенията и устойчивостта им към стрес. При фуражните растения, познанията върху въздействията и процесите, повлияващи количеството на усвояемите белтъци са и от практическо значение.

Вследствие на доброто познаване и анализ на литературата по проучваната проблематика, както и на способността да отсява съществените неизяснени въпроси, Веселин Стойчев обосновава и формулира ясно целта на своя научен труд и конкретните изследователски задачи за постигането ѝ.

Разделът Материали и Методи е написан подробно и прилежно. Описанието е допълнено с 2 снимки и една схема. Създадената експериментална постановка и използваните методи без съмнение позволяват получаването на коректни научни резултати и напълно съответстват на поставените цел и задачи. Прави добро

впечатление комплексността на изследователския подход – в допълнение към поставения акцент върху промени в листните белтъци, отговорът на растенията към заблацияване на почвата и последващо възстановяване е проследен по отношение на информативни биометрични и фотосинтетични показатели, пигментно и водно съдържание. Белтъчните промени са установени чрез изследване на съдържанието на общи разтворими белтъци в листата, полипептидните профили (едно и двупосочна гел електрофореза), относителното количество на познати, реагиращи на стрес белтъци (имуноблот анализ), протеазния профил (онагледен в полиакриламиден гел) и чрез протеомен анализ, в резултат на който са открити и идентифицирани (мас-спектрометрия и сравняване с бази данни) индивидуални белтъци в листата на детелините със значително повлияно от приложения стрес количество. Този изследователски подход е свързан с овладяването и очевидно успешното използване от докторанта на многобройни и разнообразни методи, включително, където е приложимо, методи за статистическа обработка на данните.

Логично подредените “Резултати” са добре описани и онагледени с 16 фигури и 4 таблици. Първоначално са сравнени и илюстрирани ефекти на преовлажняване на почвата и последващо възстановяване върху дължината на стъблото, площ, сухо тегло и водно съдържание на листата, съдържание и профил на разтворимите белтъци в листата, относително количество на двете субединици на Рубиско, Рубиско свързващ протеин, Rubisco активаза, протеазите ClpA и ClpP, както и протеолитичен профил и активност в три сорта детелини. Предизвиканите от приложения стрес отговори са най-ясно изразени при растенията от сорт „Старт“ (червена детелина), при които е установено:

1 - значително понижаване на листната площ и на съдържанието на общи разтворими белтъци в листата;

2 - забележимо повишаване (единствено при този сорт) на интезитета на полипептидната ивица с относителна маса около 110 kDa, визуализирана чрез поликлонални антитела срещу Рубиско активаза;

3 - двукратен спад в интезитета (количеството) на голямата субединица на Рубиско (при двата сорта бяла детелина „Хайфа“ и „Дебют“ спадът е по-малък);

4 - по-силно изразено повишаване на интезитета на протеазната ClpP ивица;

5 - осемкратно нарастване на общата протеолитична активност (при двата сорта бяла детелина увеличението е в рамките на един - два пъти);

6 - поява на допълнителна ивица с протеолитична активност (Р6).

С последващи експерименти е показано, че в резултат на заблацияване на почвата пигментното съдържание (обща каротеноиди и хлорофил *a/b*) при сорт „Старт“ значително се понижава, докато при сорт „Хайфа“ няма статистическа разлика между стойностите за контролните и стресирани растения (7). Червената и бялата детелини проявяват разлика и по отношение на показателя нефотохимично гасене на флуоресценцията (NPQ). При стресираните растения от сорт „Хайфа“ нивото на NPQ значително се повишава, а при сорт „Старт“ нарастването му е статистически недостоверно (8). Част от отговорите на детелините към заблацияване (2, 4, 6) спадат към категорията „получаване и доказване на нови факти“, останалите са в категорията „получаване на потвърдителни факти“. Получените резултати са разтълкувани логично и компетентно, основателно довеждайки до извода, че червената детелина (сорт "Старт") е по-чувствителна към преовлажняване в сравнение с бялата детелина (сортове "Хайфа" и "Дебют").

За по-пълно разбиране на механизмите, определящи различията в толерантността към заблацияване между растенията от сортове "Старт" и "Хайфа" е проведен сравнителен протеомен анализ, при който са проследени специфичните белтъчни промени както при приложения стрес, така и при последващо възстановяване. Получените оригинални и достоверни резултати от този анализ са с приносен характер. За първи път са идентифицирани двадесет и два реагиращи на стрес от заблацияване белтъка в сорт "Старт", и двадесет и шест в сорт "Хайфа". Седемнадесет от тях са общи за двата сорта. Повече от 60% от всички идентифицирани белтъци са свързани с фотосинтезата (светлинна фаза, синтеза на АТФ в хлоропластите, цикъл на Калвин, включително Rubisco и Rubisco свързани белтъци), което потвърждава и разширява познанието за вредния ефект на преовлажняването върху фотосинтетичния апарат, на белтъчно ниво. Останалите белтъци са свързани с аминокиселинния метаболизъм, протеолизата и др. При сравняване на "Старт" и "Хайфа", някои от идентифицираните белтъци показват противоположна посока на количествените промени при преовлажняване, което логично е свързано с различната чувствителност на двата сорта към стреса. Тъй като количеството на желязо-сърната субединица на Цитохром b6-f комплекса значително намалява при сорт „Старт“, а при сорт „Хайфа“ се увеличава, този белтък е предложен

за подходящ молекулен маркер за оценка на чувствителността/устойчивостта спрямо заблътяване. При пост-стресово възстановяване на растенията са разграничени пет различни типа отговори на проследените белтъци, което е обяснено с различната податливост на отделните белтъци към повреда при стрес и/или тяхната специфична роля при възстановяването. Интересна и оригинална находка е наблюдаваното свръхвъзстановяване на определени листни белтъци в детелините, проявили спад в количествата си под въздействие на стреса. Повишената експресия на тези белтъци в клетките е интерпретирана като подготовка за бъдещ стрес или като забавено настройване на протеома към липсата на стрес. Направената дискусия е логична и добре аргументирана със собствените и с литературни данни.

Цялостното комплексно сравнително изследване допринася за изясняване на механизмите на устойчивост към заблътяване и убедително доказва, че бялата детелина (сортове "Дебют" и особено "Хайфа") устоява по-успешно на отрицателните въздействия на преовлажняване на почвата, отколкото червената детелина (сорт "Старт"). Последният факт е значим, и от полза за селскостопанската практика. Правилният избор и отглеждане на видове и сортове, най-добре адаптиращи се към условията в даден регион са ключови елементи на устойчивото земеделие.

Изводите от дисертационния труд (7 на брой) са в пълно съответствие с получените резултати. Докторантът посочва 6 приноса, 4 от които имат оригинален характер. Приемам безрезервно авторската справка за научните приноси.

Авторефератът е изготвен съобразно изискванията и дава пълна и точна представа за направеното и постигнатото в дисертационния труд.

Намирам за уместно да направя следните препоръки, които се отнасят до конкретни текстове, но не и до същността на дисертационния труд:

- Добре е, от огромното количество налична информация да се подбира и да се анализира в обзора тази, с пряко отношение към изучавания проблем. Макар, че показва широката литературна осведоменост на автора на дисертационния труд, считам, че частта касаеща протеазите можеше да бъде по-стегната и целенасочена.

- Добре е, описанието на количествените промени в даден параметър да се базира на резултата от статистическата обработка на данните. В тази връзка, текстовете в раздел "Резултати" относно съдържание на каротеноиди, хлорофил *a/b* и ниво на нефотохимично гасене на флуоресценцията се нуждаят от по-голяма прецизност.

Представените публикации във връзка с дисертацията са три, от които една (излязла от печат 2013 г.) е в Acta Physiol Plant (IF<sub>2013</sub>=1.524), една е глава от книга (издателство Nova Science, 2015 г.) и една, обзорна, е публикувана през 2014 г. в реномираното наше списание Genetics and Plant Physiology. Трудовете на Веселин Стойчев са в съавторство, но неговото първо място в трите публикации свидетелства за съществената му роля при осъществяване и представяне на изследванията, свързани с дисертацията. До сега са забелязани 3 позовавания на публикацията в Acta Physiol Plant, всички в международни издания. Цитирането от други автори, както и представянето на резултатите под формата на 4 постерни доклада на 2 международни конференции и една национална с международно участие са показателни за актуалността на тематичната насоченост на изследванията, значимостта на получените резултати и научния интерес към тях.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Представеният дисертационен труд, по актуалност на разработвания проблем, прецизност, количество и качество на проведените изследвания, значимост на научните и научно-приложни приноси, както качеството и броят на публикациите по дисертационния труд, напълно отговарят на изискванията на Закона за развитието на академичния състав в Република България и на Правилника за специфичните условия и реда за придобиване на научни степени и заемане на академични длъжности в ИФРГ-БАН. Веселин Стойчев е интелигентен, логично и аналитично мислещ млад учен, с отлични теоретични знания и практически умения в областта на растителната биохимия, физиология и молекулярна биология. Като член на НЖ убедено гласувам положително и препоръчвам на уважаемите членове на Научното жури да подкрепят присъждането на образователната и научна степен “**доктор**” на **Веселин Атанасов Стойчев**.

София, 18.07. 2015 г.

Подпис:

/доц. Л. Гигова/