

РЕЦЕНЗИЯ

върху дисертационен труд за придобиване на образователната и научна степен “Доктор” по научна специалност „Генетика”, шифър 01.06.06.

Автор на дисертационния труд: Бистра Станишева Михайлова, специалист – агроном в Институт по физиология на растенията и генетика – БАН

Тема на дисертационния труд: „Генетични проучвания върху устойчивостта на пипера към краставичномозаичния вирус и създаване на линии с комплексна устойчивост към икономически най-важните болести“

Рецензент: Росица Милчева Родева, доктор, доцент в Институт по физиология на растенията и генетика – БАН

Представените ми за рецензиране материали по дисертацията съдържат всички необходими документи за законосъобразно протичане на защитата, съгласно изискванията на Закона за развитието на академичния състав (ЗРАС) на Република България, Правилника за приложение на ЗРАС и Правилника за условията и реда на придобиване на научни степени и заемане на академични длъжности в БАН и ИФРГ.

Обем и структура на дисертационния труд: Научният труд е написан на 157 страници и е структуриран по общоприетия модел: Заглавна страница, Благодарности – 1 стр., Съдържание – 2 стр., Използвани съкращения и специфични термини – 2 стр., Увод – 2 стр., Литературен обзор – 33 стр., Цел и задачи – 1 стр., Материали и методи – 14 стр., Резултати и обсъждане – 73 стр., Приложение, включващо 12 фигури – 8 стр., Изводи и Приноси – 2 стр., Списък на проекти с финансовата помощ, на които са осъществени изследванията – 1 стр. Цитираната литература (16 стр.) се състои от 346 източника (33 на кирилица и 313 на латиница), от които 133 са публикувани след 2001 г., а 22 – след 2010 г. Дисертацията е много добре онагледена и включва: **51 фигури**, от които 11 към Литературния обзор с цитиран източник, 1 към Материали и методи (Приложение – стр. 130-137) и 40 в Резултати и обсъждане; **15 таблици**, от които 3 са свързани с методичната част, а останалите – с онагледяване на получените резултати.

Актуалност на разработвания в дисертационния труд проблем: Разработеният в дисертацията проблем е изключително актуален. Създаването на сортове и линии културни

растения с комплексна устойчивост към икономически важни болести, притежаващи добри стопански качества, и въвеждането им в практиката води до получаване на стабилни добиви и качествена екологично-чиста продукция, поради ограниченото приложение на химически средства за борба с причинителите на болести, а това е благоприятна предпоставка за здравословно хранене. Изясняването на генетичните основи на устойчивостта е важна теоретична основа за успешната селекция на устойчиви към болести сортове и линии. Поради динамиката в популациите на патогените и възникването на нови патотипове, раси, щамове и т.н. този проблем винаги ще бъде актуален, както в научно, така и в научно-приложно отношение. Пиперът, който е обект на изследванията, е традиционна и икономически значима култура – пета за световното и втора за българското производство.

Литературният обзор е целенасочен и информативен. Направен е обширен преглед, посветен на болестите по пипера главно вирусните и техните причинители; транспорта на вирусите в растенията; устойчивостта на растенията към вирусни болести; източниците на устойчивост; генетичните основи на устойчивостта и т.н. Използвани са изключително голям брой литературни източници, отразяващи състоянието на изучавания проблем, макар че са пропуснати съвременни български публикации по гъбни болести при пипера. В този важен раздел от дисертацията докторантката показва задълбочени познания по проблема, което ѝ е позволило творчески да оцени известните научни факти, да формулира правилно основната цел на дисертационния труд и да определи четири конкретни задачи за нейното постигане.

Оценка на използваните материали и методи на изследване: Растителният материал, включен в дисертационния труд, е подбран правилно. В изследването са използвани 11 щама от 4 тобамовируса и 4 щама от CMV, чиито произход и най-важни характеристики са добре описани. Провеждайки експерименталната работа по дисертацията, докторантката е овладяла и приложила успешно разнообразни методи на класическата генетика и растителна вирусология. Изследванията ѝ се основават на използването на съвкупност от различни методически похвати, т.е. приложен е мултидисциплинарен подход на изследване, включващ селекционни, генетични, имунологични, биохимични методи. Проведен е съвременен статистически анализ за оценка на данните.

Представяне и обсъждане на получените резултати: Извършена е голяма по обем експериментална работа резултатите, от която са представени логично и последователно, решавайки поставените в дисертацията задачи. Резултатите са много добре онагледени и логично тълкувани. Получени са и са доказани нови факти. Формулирани са 12 извода. Първите 11 приемам изцяло, а дванадесетият, чийто текст частично съвпада с третия принос, е по-добре да бъде отнесен към приносите. По-важните теоретични резултати са, че линиите

L113 и L57, произлизащи съответно от холандска и българска популации, са устойчиви на CMV. Устойчивостта на L113 към CMV се дължи на свръхчувствителност (HR) и е по-стабилна от тази на L57. Контролира се от един доминантен ген *Cmv11.3*, разположен в 11 хромозома в близост до ген *L1*, контролиращ устойчивост към тобамовируси от патотип P0, при което двата гена се наследяват като скачени и са частично свързани с ген за устойчивост към *P. capsici*, разположен в същия клъстер. Устойчивостта на L57 към CMV се наследява непълно доминантно, контролира се от един ген *Cmv11.4*, разположен в 11 хромозома и частично свързан с ген *L+*. Доказано е, че основният механизъм на устойчивост към CMV е свързан с предотвратяване на проникването на вирионите във флоема и транспорта на вируса на дълги разстояния. За първи път генът за клейстогамия *cf* е интродуциран в едроплодна линия пипер и е получена линия *OkalR-cf*, която не се различава по устойчивост на болести и стопански показатели от родителската линия *OkalR*, но е със затворени цветове, което гарантира самоопрашване и улеснява семепроизводството.

По-важните научно-приложни резултати са, че новосъздадените устойчиви на болести линии L57, L113, L114, L16, L14, L64, *OkalR* и *OkalR-cf*, имат и много добри стопански качества, сравнени със стандартните сортове Албена и Куртовска капия 1619. Средният добив на линии (L57, L64) е по-висок от този на сортовете, като ги превъзхождат по съдържание на витамин С, редуциращи захари и ликопен в плодовете. Създадените устойчиви генотипове с оранжеви плодове не се различават по добив от тези на сорт Албена. Положителна оценка заслужава онагледяването със снимков материал с много добро качество, както и показаните схеми на отбор. Плодовете на създадените линии са с различен цвят (червени, оранжеви, без антоциан) с добри хранителни и вкусови качества, по този начин е обогатен генофонда при пипера.

Дисертационният труд има ясен приложен характер, с възможност получените разработки да бъдат използвани за практически цели (селекционни или производствени). Формулирани са 3 приноса, които приемам напълно.

Оценка на публикациите по дисертационния труд: Докторантката е включила резултати от дисертационния труд в 3 публикации, на които е първи автор. Две от статиите са на английски език, а третата е на български език. Две статии са публикувани в български списания, от които едното е с импакт фактор, и една – в сборник от XI EUCARPIA Meeting on Genetics and Breeding of Capsicum and Eggplant, Antalya, Turkey. Посочено е и участие в научна конференция с награда от международно жури. Забелязани са общо три цитата, от които два са в докторска дисертация у нас, а един е в чуждо списание с импакт фактор. Един от цитатите е на публикация по настоящия дисертационен труд.

Лично участие на докторанта: Познавам добре докторантката Бистра Михайлова, нейното трудолюбие, отговорност и организираност. Практическото изпълнение на експериментите са лично нейно дело. Резултатите в дисертационния труд, както в теоретичен, така и в приложен план, показват в максимална степен личното ѝ участие под компетентното ръководство на проф. д-р Елисавета Стоименова. Това се доказва и от факта, че и в трите публикации тя е водещият автор.

Критични бележки, препоръки, въпроси: Имам някои критични бележки за дребни грешки и неточности: в латински и английски наименования на патогените, липса на някои използвани съкращения в списъка, използване на някои съкращения в английски и български вариант, какъвто е случаят с транспортен (MP и BT) и капсиден (CP и KB) белтък. Повтарят се две таблици с номер 7 и цитирани източници под номера 269 и 272 са напълно идентични. При описанието на растителния материал се посочва, че включеният в изследването унгарски сорт Novalis е устойчив на тобамовируси, но липсва цитирана литература. Добре би било при цитиране на повече автори те да бъдат подредени по годината на публикуване, а не по азбучен ред на авторите или съвсем безразборно. Вместо локален генотип пипер да се използва местен. Повечето от тези технически неточности са с формален и редакционен характер. Сорът Златен медал 7 е създаден в Опитната станция в Негован, а не в Института по генетика.

Срещат се някои недобре формулирани изрази:

– стр. 27 „VPg белтъкът контролира устойчивостта на: 1) va и va2 гените при тютюна; 2) pvr1, pvr2 гените при пипера и pot1 гена при домати” (всъщност тези гени контролират устойчивостта, а VPg белтъкът има значение при експресията им);

– стр. 28 „Има многобройни примери на доминантни и рецесивни гени, които контролират относително голям брой вирусни видове” (всъщност контролират реакцията на растението – гостоприемник към вирусите); „Концентрацията на вируса се определя спектрометрично и се съхранява при концентрация 1mg/ml ...” (вместо Вирусът се съхранява при концентрация 1mg/ml, определена спектрометрично);

– стр. 67 „Плодовете са blocky type тип (излишно дублиране на тип);

– стр. 78 „ За целта са хибридизирани двете линии, които са проведени в двете посоки” (вместо Проведена е реципрочна хибридизация между двете линии)

Имам някои въпроси по работата, извършена с *Phytophthora capsici*. За инокулиране с гъбата са използвани различни агресивни раси, изолирани от пипер, отглеждан на полето в района на Петрич, Горна Оряховица, Сапарева баня и др., получавани от колеги от ИЗР, гр. Костинброд. Със сбор от всички раси ли е заразявано, или поотделно? Ако са прилагани в

комбинация, как са съчетавани, за да се запази едно и също съотношение при експериментите през годините? Когато инокулирането на растенията с тази гъбата се осъществява в разсадна фаза, почвата в съответния съд се полива с 400 ml инокулум (2 петриевы блюда). Важно е да се посочи с какъв обем е съдът, в който се отглеждат растенията, т.е. какъв обем мицелноспорангиална суспензия е използвана за обем от 1 литър почва. По какъв метод е изолирана *P. capsici* от почвата и какво е обяснението за непреживяването на гъбата през зимата? Използвана ли е скала, по която да е отчитана различна степен на нападение на пипера от *P. capsici*, или е регистриран само брой, респективно процент болни растения? При поява на загниване и почерняване в основата на стъблото при изкуственото заразяване правена ли е реизолация на причинителя, за да се докаже, че тези симптоми се дължат на *P. capsici*?

На различни места в текста и още в списъка на използваните съкращения терминът dpi (day post inoculation) е преведен като дни след заразяването, а по-добре е да се използва дни след инокулирането, защото особено при гъбните патогени може да се направи инокулация с гъбата, но да не настъпи заразяване на растението, т.е. заразяването е успешен резултат след инокулиране.

Имам следните въпроси към докторантката: възможно ли е пирамидизиране (събиране) на всички посочени устойчивости в един генотип, кои методи за това са препоръчителни, веднъж постигната тази устойчивост до колко може да е стабилна в поколенията и до колко се очаква да бъде ефективна? Може ли да доведе до поява на нови раси или патотипове на патогените с по-висока вирулентност?

Ще си позволя да направя някои препоръки:

Полезно и за други учени, особено за селекционерите, би било, ако получените линии пипер, съчетаващи устойчивост към болести и много добри стопански качества, бъдат депозирани в Националната генбанка в гр. Садово.

Селекцията на устойчиви линии по фенотип след инокулиране с вируси е изключително труден процес и отнемащ много продължително време, влияе се от условията на средата и фазата на развитие на растенията и зависи от наличността на съответните патотипове на вируса. Известно е, че с помощта на ДНК маркери, генетично свързани с гените контролиращи устойчивостта, могат за изключително кратко време да се проверят десетки генотипове за наличието на съответните гени за устойчивост и да се проведе ефективна селекция особено при пирамидизиране на различни гени на устойчивост. Затова в бъдещата работа на Бистра Михайлова препоръчвам тясно сътрудничество с колеги от Лабораторията по молекулярна генетика.

Оценка на автореферата: Авторефератът е изготвен съгласно изискванията и правилно отразява получените резултати и научните приноси на дисертационния труд.

Заключение: Дисертационен труд е едно задълбочено научно изследване, проведено на много добро научно ниво. Докторантката Бистра Михайлова познава литературата, публикувана по проблема и отлично я използва. В хода на експерименталната работа тя е овладяла разнообразни методи, които е приложила творчески и успешно за разрешаване на основната цел и поставените в дисертацията задачи. Извършената експериментална работа е с голям обем и е проведена прецизно и качествено. Считам, че настоящият дисертационен труд отговаря и дори надхвърля изискванията за придобиване на образователната и научна степен „доктор“ на ЗРАС в РБ и Правилника за приложението му в БАН и ИФРГ. **Затова убедено предлагам на почитаемото Научно жури да присъди на Бистра Станишева Михайлова образователната и научна степен „доктор“ по научна специалност “Генетика”, шифър 01.06.06.**

гр. София
17.06.2016

Подпис:

/доц. д-р Росица Родева/