

РЕЦЕНЗИЯ

върху дисертационен труд за придобиване на научната степен „доктор на науките” по професионално направление 4.3. Биологически науки, научна специалност „Физиология на растенията”

Автор на дисертационния труд: **Виолета Борисова Великова**, д-р, професор в лаборатория “Фотосинтеза – активност и регулация” в Институт по физиология на растенията и генетика – Българска Академия на Науките

Тема на дисертационния труд: **Физиологична роля на биогенния изопрен в растенията**

Рецензент: Лиляна Георгиева Гигова, д-р, проф., Институт по физиология на растенията и генетика – Българска Академия на Науките

Настоящата рецензия е изготвена на основание на Заповед на Директора на ИФРГ-БАН № 971 от 17.12.2019 г. и решение на заседанието на Научното жури от 15.01.2020 г.

По процедурата за защита проф. д-р Виолета Великова е представила всички документи в съответствие с изискванията на Закона за развитие на академичния състав в Република България (ЗРАСРБ), Правилника за неговото приложение, както и Правилниците за условията и реда за придобиване на научни степени и заемане на академични длъжности в БАН и ИФРГ-БАН.

Кариерен профил на дисертанта

Виолета Борисова Великова придобива квалификацията биолог в Биологически факултет на СУ ”Св. Кл. Охридски” през 1986 година. През 1988 година е назначена за специалист биолог в ИФР “Акад. М. Попов”-БАН. През 1998 година успешно защитава дисертация и придобива образователната и научна степен “доктор”. През 2006 год. Виолета Великова е избрана за старши научен сътрудник II ст. (доцент) в ИФР, а през 2012 год., - за професор в ИФРГ. През 2006 год. е на специализации в Италия (3 месеца) и във Великобритания (4 месеца), а през 2009 и 2010 год. специализира в Италия 4 и 12 месеца, съответно. В периода 2001-2014 год. е спечелила 6 стипендии в чужбина (Италия, Германия, Великобритания, Португалия, Гърция) с обща продължителност 60 месеца.

Осъществените специализации във водещи научни институции и сътрудничеството с водещи учени обогатяват знанията на Виолета Великова в областта на растителната физиология, разширяват уменията и компетенциите ѝ за прилагане на различни техники и методи за научни изследвания (газово-хроматографски, протеомни, биофизични), компютърни програми за обработка и анализ на данни и спомагат за изграждането ѝ като един от разпознаваемите изследователи в областта на биогенните органични съединения. Професор Великова е съавтор в 102 научни статии, 74 от които са публикувани в престижни международни списания (Q1 – 43; Q2 – 9; Q3 – 20; Q4 – 2, общ ИФ=190.489), забелязаните цитати върху тях са над 4000 (WoS/Scopus), *h*-индексът ѝ е 25 (Scopus). Понастоящем проф. Великова е ръководител на лаборатория “Фотосинтеза – активност и регулация”, както и председател на Научния съвет на ИФРГ (от 2014 г.). Членува в национална (Съюз на учените в България) и международна (Федерация на Европейските дружества по растителна биология, FESPB) научни организации.

Характеристика и оценка на дисертационния труд

Дисертационният труд на проф. Виолета Великова е посветен на изясняване на ролята на биогенния изопрен за намаляване на негативните последствия от абиотичен стрес при растенията и на възможните механизми на защитното му действие. Като част от съвременните изследвания върху биогенната изопренова емисия, дисертационният труд допринася за намиране отговор на въпроса: „защо растенията произвеждат изопрен”. Тъй като биосинтезата на изопрен е “скъпа”, голямата инвестиция на въглерод и енергия в нея трябва да има съответстващи функционални причини. Функционалните причини за емисиите на изопрен обаче, все още са въпрос на горещ дебат. Тематиката е актуална и значимостта ѝ се подчертава от факта, че емисиите на изопрен имат осезаемо въздействие върху атмосферната химия, качеството на въздуха и изменението на климата. Това въздействие е свързано с високата реактивност на изопрена, която води до повишаване на концентрацията на тропосферен озон, продължителността на живота на метана и повлиява нуклеирането, кондензацията или коагулацията на вторични органични аерозоли.

Дисертацията е написана на 148 страници. Основният текст е изложен в 7 части, онагледен със 67 фигури (вкл. 4 снимки, 3 електронно-микроскопски снимки, 4 схеми и 2

диаграми) и 1 таблица. Цитирани са 358 литературни източника. Обобщени са приносите от 20 научни публикации.

В стегнатия (17 стр.) и информативно представен Литературен преглед ясно проличава добрата осведоменост на автора в контекста на заявените за изпълнение експериментални задачи. Основно внимание е отделено на факторите, контролиращи изопреновата емисия (светлина, температура, циркаден ритъм, концентрация на CO₂, почвена влага, обезпечаване с хранителни елементи). Представени и анализирани са налични литературни данни за ролята на биогенния изопрен за защита на растенията срещу абиотични стресови фактори (висока температура, озон), както и за предполагаемите механизми на защитното му действие. В 2 фигури, адаптирани от коректно посочени първоизточници, са онагледени (1): източниците на изопрен и ролята му в атмосферната химия и (2): биосинтетичните пътища на растителните изопреноиди и тяхната клетъчна локализация.

Изхождайки от данните в литературата и от натрупания научно-изследователски опит върху изследвания проблем, проф. Великова ясно формулира целта на дисертационния труд, 3 хипотези и 4 специфични задачи за постигане на поставената цел. Използвани са различни експериментални модели, добре онагледени на фигура. Приложен е мултидисциплинарен подход (проведени са изследвания на физиологично, биофизично, биохимично и структурно ниво), като за всяко ниво на изследване е използван богат набор от съответстващи класически и съвременни методи и техники. За пример ще посоча методите, използвани за количествена и качествена протеомика - стабилно изотоп-кодирано белязване на хлоропластни белтъци, в комбинация с полиакриламидна гел електрофореза (PAGE) и течна хроматография в тандем с мас-спектрометрия (LC-MS/MS), както и Label-Free LC-MS/MS, Blue Native PAGE на нативни белтъци и белтъчни комплекси, Acid-Urea-PAGE на хистонови белтъци, Biotin-Switch и LC-MS/MS за анализ на S-нитрозилирани белтъци. Биофизичните техники кръгов дихроизъм, електрохромно отместване при 515 nm и термолуминесценция са **използвани за първи път** при изясняване на физиологичната роля на изопрена. Експерименталните резултати са обработени с адекватни статистически методи, като е използван ANOVA анализ, последван от тест на Tukey при ниво на конфиденциалност 5%, както и *t*-test на Student при $P < 0.05$. Резултатите от протеомните анализи са подложени на мултивариантен анализ

със статистическите методи на Анализ на главните компоненти и Анализ на ортогоналните частни най-малки квадрати.

Резултати и обсъждане: получен и анализиран е голям обем от отлично документиран и онагледени (на 67 фигури и 1 таблица) данни от изследванията. Всяка от 7-те части с резултати съдържа въведение (вкл. обосновка на целта на изследването и хипотеза), изложение, обсъждане и заключение, което правилно отразява съответните резултати. Изследванията са логично планирани в съответствие с формулираните три хипотези за физиологичната роля на ендегенния изопрен. Експерименталните резултати ясно показват, че в изопрен-синтезиращите растения фотосинтетичната активност е по-слабо нарушена при различни стресови въздействия, в сравнение с растенията неотделящи изопрен. **За първи път е показано**, че ендегенният изопрен има важна антиоксидантна роля, защитавайки растенията при окислителен стрес индуциран от озон и синглетен кислород. Установено е, че изопрен-отделящите растения са не само по-добре защитени при висока температура и засушаване в сравнение с неотделящите, което е в подкрепа на литературни данни, но и се възстановяват по-бързо след прекратяване на стресовото въздействие. Защитната роля на изопрена се свързва със способността му да ограничава образуването на реактивни кислородни и азотни форми и да намалява липидното пероксидиране на клетъчните мембрани, пряко да взаимодейства със синглетния кислород или да благоприятства потока на електрони през фотосинтетичните/фотодихателните пътища. Бих искала да отбележа и оценя високо изследванията, свързани с ефекта на биогенния изопрен върху фотосинтетичните мембрани. Приложени са 3 целесъобразно подбрани биофизични техники, изследващи различни аспекти на фотосинтетичния апарат. Получените резултати **за първи път експериментално доказват**, че изопренът подобрява интегритета и функционалността на фотосинтетичните мембрани в условия на висока температура, повишавайки термотолерантността на растенията. Предположено е, че изопренът подобрява термичната стабилност на тилакоидните мембрани чрез въздействие върху липидния състав на мембраните, което е доказано в последващи експерименти. Инхибирането на изопреновата емисия води не само до съществени изменения в липидния и мастнокиселинен състав на тилакоидните мембрани, но и до промени в ултраструктурата на хлоропластите. **Впечатляващи и от особен интерес** са резултатите от протеомните анализи. Чрез прилагане за първи път на метода на стабилно изотоп-

кодирано маркиране на белтъци е установено, че инхибирането на изопреновата биосинтеза променя хлоропластния белтъчен профил в посока на структурни промени във фотосинтетичните мембрани и намаляване на защитата срещу окислителен стрес. Интересен факт е, че промените в хлоропластния белтъчен профил обуславят развитието на алтернативни защитни механизми като фотодишане и нефотохимично гасене, които да компенсират липсата на изопрен. **Нови са и данните** за натрупване на азотен оксид само в изопрен-инхибирани листа третирани с озон, което е свързано с по-силно изразени промени в S-нитрозилирането на белтъците. Сравнителният профил на *in vivo* S-нитрозопротеома на изопрен-отделящи и неотделящи растения показва повишено нитрозилиране на редица антиоксидантни ензими, което води до извода, че изопренът индиректно регулира образуването на активни кислородни форми (ROS), контролирайки нивата на S-нитрозилиране на метаболизиращите ROS ензими. **Оригинални и значими резултати** са получени при изследване на действието на отделни компоненти от антиоксидантната защитна система на растенията в условия на единичен и комбиниран стрес. Представени са **нови доказателства** за специфична регулация на антиоксидантната защита през различните часове на деня, които разкриват неизвестно дотогава съвместно действие на летливи, нелетливи изопреноиди и флавоноиди в растения (*Platanus x acerifolia*), изпитващи комбинираното въздействие на висока температура, висока светлина и засушаване. При силно засушаване на трансгенни тютюневи растения, присъствието на изопрен стимулира синтеза на нелетливи изопреноиди (абсцисиева киселина и каротеноиди) и фенилпропаноиди, осигурявайки допълнителна защита на растенията. Резултатите от това изследване подчертават централната роля на изопрена в индуцираната от стрес метаболитна настройка. На моделна система *Populus nigra* е показано, че не само изопренът, но и индуцираните от стреса високомолекулни изопреноиди, като цис- β -осцимен и линалол, могат да играят важна роля в защитните механизми на растенията срещу тежки метали.

Заслужаващи специално внимание са **научно-приложните аспекти** на тези фундаментални изследвания. В настоящия труд **за първи път** е показано, че конститутивната изопренова емисия и индуцираните изопреноидни емисии при *Populus nigra* (черна топола) се повишават при стресово въздействие с Ni. Установено е, че комбинираното въздействие на висока температура и повишена атмосферна концентрация

на CO₂ ([CO₂]) има неблагоприятен ефект върху изопреновата емисия, функционалните и структурните характеристики на *Platanus orientalis* (източен чинар). Освен това, повишената [CO₂] не само инхибира изопреновата емисия, но и стимулира емисията на метанол. Установено е също, че обикновената тръстика (*Phragmites australis*) може да акумулира високи нива на фосфор без да увеличава постъпването на биогенен изопрен в атмосферата. От друга страна, високите нива на фосфор стимулират фотосинтезата, което може да ускори натрупването на биомаса и да увеличи отстраняването на фосфор от замърсени води. Тези резултати биха били полезна основа при разработване на адекватни модели за количествено и качествено прогнозиране на конститутивните и индуцирани изопреноидни емисии от растенията в условия на стрес (антропогенно замърсяване, климатични промени), на модели за въздействието на тези емисии върху качеството на въздуха в регионален и глобален мащаб, както и за подбор на подходящи растителни видове за залесяване, вкл. ремедиация на райони с различно антропогенно замърсяване.

В най-обща форма **научните приноси** в дисертацията могат да бъдат обобщени като **предоставяне на нови експериментални доказателства**, подкрепящи формулираните три хипотези за физиологичната роля на ендогенния изопрен, а именно:

- изопренът има съществено значение за повишената толерантност на растенията, оказвайки ефект на функционално, протеомно, метаболитно и структурно ниво;
- изопренът модулира отговора на растенията към стрес индиректно посредством регулирано генериране на активни кислородни и азотни форми;
- изопренът е част от антиоксидантната система на растенията и действа синхронизирано с други защитни метаболити, осигурявайки по-добра защита на растенията при стрес.

Публикации по дисертационния труд

Научният труд на проф. Великова е оригинален и изключително значим. Силен аргумент в подкрепа на високата ми оценка е фактът, че получените резултати, представени в 20 научни статии, са публикувани в списания с импакт фактор (общ **IF 86.851**) и **Q1** ранг (**19** статии) и с **Q2** ранг (**1** статия). Всички публикации са в реномирани международни списания: *New Phytologist* (IF 7.210); *Plant, Cell and Environment* (IF 6.960); *Plant Physiology* (IF 6.456); *Journal of Proteome Research* (IF 4.245) и т.н. Като израз на

признанието им от международната научна общност са забелязаните **1327** цитирания, от които 1159 са в издания реферирани/индексирани във Web of Scienese и Scopus. В 13 от публикациите проф. Великова е първи автор, в две – втори, а в една – последен (кореспондиращ автор), което прави личният ѝ принос несъмнен. Седем от научните публикации по дисертацията са извън хабилитационния труд за заемане на академичната длъжност „професор”. В 2 от тези публикации проф. Великова е първи автор, в една е първи и кореспондиращ автор и в една е кореспондиращ автор, което е в съответствие с това специфично изискване на ИФРГ. В допълнение, научните резултати са докладвани на 26 международни и 3 национални научни форума. В 14 от международните доклади проф. Великова е първи автор (вкл. 5 устни презентации, в 2 от които е поканен лектор). Дисертацията на проф. Великова включва резултати от общо 9 проекта (6 международни и 3 национални), в 6 от които тя е координатор.

Очевидно, наукометричните показатели на проф. Великова са изключително високи, като техните стойности и качество далеч надхвърлят изискванията за придобиване на научната степен „доктор на науките”.

Приемам авторската справка за **приносите**, представена в дисертационния труд. Ясно очертаните 15 научни приноса обективно отразяват реалните постижения на разработката, включително постигнатото за първи път в науката.

Авторефератът (78 стр.) съдържа всички основни данни и послания на дисертацията и е отлично онагледен.

Бележки и препоръки:

- Фиг. I.2., C-F и Фиг. I.6. от автореферата липсват в дисертационния труд;
- Фиг. II.2. C - не е показано, че фотосинтезата е слабо инхибирана в листа, подложени на възстановителен експеримент, при който е подаван екзогенен изопрен, както се посочва в текста на стр. 31 на дисертационния труд;
- Част от приносите би могло да бъдат освободени от подробности и обединени по смисъл. Например приноси 1-3 и приноси 8 и 10;

- По мое мнение, резултати от публикациите по дисертационния труд не би трябвало да се представят и дискутират в Литературния преглед, нито тези публикации да се включват в списъка с цитирана литература.

Бих искала да отбележа, че направените бележки и препоръки са от незначителен характер и не засягат достойнствата на дисертацията.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Анализът на предоставения за рецензия дисертационен труд показва, че това е логично замислена, прецизно изпълнена мултидисциплинарна разработка, с редица оригинални научни приноси, която отговаря напълно на изискванията на ЗРАСРБ, Правилника за неговото приложение, както и Правилниците за условията и реда за придобиване на научни степени и заемане на академични длъжности в БАН и ИФРГ-БАН. Дългогодишните целенасочени изследвания и придобитите задълбочени теоретични знания и богат експериментален опит, високата и стойностна публикационна активност и цитируемост характеризират проф. Великова като международно признат, водещ учен в една специфична област на изследване, свързана с изясняване на физиологичната роля на биогенния изопрен в растенията и механизмите на защитното му действие в условия на абиотичен стрес. Всичко това ми дава основание да **оценя положително** научната разработка, постигнатите резултати и оригинални приноси и **безусловно да подкрепя** придобиването на научната степен „доктор на науките” от автора на тази разработка. Позволявам си убедено да препоръчам на уважаемото Научно жури да присъди на **проф. д-р Виолета Борисова Великова** научната степен „доктор на науките” по професионално направление Биологически науки, научна специалност „Физиология на растенията”.

06.03.2020 г.

Рецензент:

/проф. д-р Лиляна Гилова/.....