

РЕЦЕНЗИЯ

относно дисертационен труд на тема “Физиологична роля на биогенния изопрен в растенията” за присъждане на научната степен “Доктор на науките”

на проф. д-р Виолета Борисова Великова

в област на висше образование 4. Природни науки, математика и информатика,
професионално направление 4.3. Биологически науки, специалност
“Физиология на растенията”

от проф. Стефка Германова Танева, дбн

Институт по биофизика и биомедицинско инженерство - БАН, София

Представени документи по процедурата

За рецензиране са представени: Дисертационен труд; Автореферат на дисертационен труд; Списък на научните публикации, реферирани и индексирани в Web of Science и Scopus; Публикациите на които е базиран дисертационният труд в пълен текст; Списък на цитатите, които не се припокриват с тези, предоставени за научната и образователната степен „Доктор“; Списък на участия в научни форуми.

Представени са следните административни документи: Автобиография на докторанта; Копие от диплома за придобита образователна и научна степен „Доктор“; Заповед за разширяване на научния семинар № 791/11.11.2019 г. и Протокол от № 47/05.12.2019 г. от заседанието на разширения научен семинар на лаборатория „Фотосинтеза – активност и регулация” към Института по физиология на растенията и генетика, БАН, проведен за обсъждане на проект на дисертационния труд; Правилник за специфичните условия и реда за придобиване научни степени и за заемане на академични длъжности в ИФРГ-БАН.

Представените от проф. д-р Виолета Борисова Великова материали за рецензиране за присъждане на научната степен на „Доктор на науките” са прецизно подготвени и отговарят напълно на изискванията на ЗРАСРБ, Правилника за неговото приложение и специфичните изисквания на ИФРГ-БАН за придобиване на научната степен „доктор на науките”.

Представяне на дисертанта

Проф. Великова е завършила Биологическия факултет на СУ “Климент Охридски”, специалност Екология и опазване на околната среда, защитава докторска (кандидатска) дисертация през 1998 г. Научната кариера на проф.

Великова започва като специалист биолог в Института по физиология на растенията „Акад. М. Попов”, БАН; от 1998 г. до 2006 г. е научен сътрудник I - II ст., през 2006 г. се хабилитира като ст.н.с. II ст. (понастоящем – доцент), а през 2012 г. е избрана за академичната длъжност професор. Ръководител е на лаборатория „Фотосинтеза – активност и регулация” към ИФРГ - БАН .

Проф. Великова е специализирала в престижни изследователски центрове в Италия, Германия, Великобритания, Португалия, Гърция: след докторска специализация (Италия 2010 – 12 месеца); специализация по линия на ESF – VOCBAS (Италия 2009 – 4 месеца); специализация по линия на ESF – VOCBAS (Великобритания 2006 – 4 месеца); специализация по линия на ACCENT (Италия 2006 – 3 месеца). Била е стипендиант по линия на НАТО (Португалия – 2003- 2004 – 12 месеца; Италия – 2003; 2000-2001 – общо 12 месеца; Гърция – 2001 - 3 месеца); “Александър фон Хумболд” (18 месеца, 2012 – 2014); “Мария Кюри” (Индустрия – Академия (PTR-TOF) (Италия 2011 – 12 месеца) и Програма за обучение (ISONET) (Италия 2007 – 3 месеца)). Понастоящем тя има активно сътрудничество с водещи учени от чужбина.

Проф. Великова е автор на 102 научни публикации, от които 74 са публикувани в реномирани международни списания (с ранг Q1 – 43; с Q2 – 9; с Q3 – 20; с Q4 – 1); с общ ИФ 190.489. Трудовете ѝ са цитирани над 4000 пъти (Web of Sci, Scopus); h-индекс 25 (Scopus, Web of Sci), което показва високото качество на научната ѝ продукция.

Била е ръководител и е участвала в разработването на научни проекти с национално и международно финансиране.

Ръководител е на 2 успешно защитили докторанти.

Член е на Съюза на учените в България, Федерацията на Европейските дружества по растителна биология (FESPB), и Дружеството по експериментална биология (SEB).

Председател е на НС на ИФРГ – БАН от 2014 г.

Актуалност на тематиката

Дисертационният труд на проф. Великова е посветен на изключително актуален проблем за физиологичната роля на биогенния изопрен, най-широко разпространения летлив въглеродород, емисиите на който (44% от общите емисии на биогенни летливи органични съединения) са свързани със значителен разход на енергетични метаболити и въглерод, и имат съществена роля за атмосферната химия и качеството на въздуха. Изучаването на факторите, които контролират емисията на изопрен от растенията са особено важни както за прогнозиране на промени в атмосферната химия и подбор на растителни видове подходящи за райони с индустриално замърсяване, така и за установяване на предполагаемата защитна роля на изопрен в растенията при различни стресови въздействия.

Познаване на проблема

Дисертантката е използвала 379 литературни източника, за да обоснове актуалността на проблема. Оформянето на литературния обзор и анализа на публикуваните данни и научните постижения в областта показват отлично познаване на проблема, солидно разбиране и компетентност в областта на научните изследвания. Прегледът на литературата е написан стегнато и компетентно в 5 раздела фокусирани върху: 1) растенията като източници на изопрен; 2) ролята на изопрена в атмосферната химия; 3) биосинтеза на изопрен в растенията; 4) фактори, контролиращи изопреновата емисия; 5) ролята на биогенния изопрен за защита на растенията срещу абиотични стресови фактори.

Авторът отбелязва научните постижения в областта, ролята на емисиите на изопрен за качеството на въздуха, глобалната тропосферна химия и изменението на климата, и посочва важните въпроси за “биосинтетичния път на изопрена” и „защо растенията произвеждат изопрен” на които съвременните изследвания на биогенната изопренова емисия търсят отговор и на които са посветени изследванията на дисертационния труд.

Подходи и методи на изследването

Приложени са съвременни експериментални техники и разнообразни методи: биофизични; биохимични; спектроскопски (за измерване на хлорофилна флуоресценция); протеомика; хроматографски; методи за антиоксидантни анализи; статистически и др. за провеждане на изследвания на физиологично и структурно ниво, което определя високо качество на получените резултати.

За изследванията са подбрани (1) растителни видове отделящи изопрен като естествен метаболит (*Phragmites australis*, *Platanus orientalis* L., *Platanus x acerifolia* L., *Populus nigra*, *Populus x canescens*, *Arundo donax*); неотделящи изопрен (*Nakonechloa macra*); и подложени на генна манипулация (*Arabidopsis thaliana*, *Nicotiana tabacum* cv. Samsun; *Populus x canescens*), водеща до променена способност да отделят изопрен като естествен метаболит; (2) листа с манипулирана изопренова емисия: по химичен път с фосмидомицин, който специфично блокира MEP биосинтетичния път в хлоропластите; листа, развити в атмосфера с повишена концентрация на CO₂; листа в различен етап на онтогенетичното развитие; различни по възраст растения.

Характеристика и оценка на дисертационния труд

Дисертационният труд е представен на 422 страници. Основният текст е оформен в 6 тематични глави (Литературен обзор, Цели и задачи, Материали и методи, Резултати и дискусия, Заключение, Приноси) на 148 страници; илюстриран с 67 фигури и схеми; цитирани са 379 литературни източника. В

приложение са представени библиография на публикуваните трудове, свързани с дисертацията и копия на публикациите.

Литературният обзор на дисертацията показва изключително задълбочено познаване на тематиката; обобщава синтезирано познанията за растителните източници на изпорен; биосинтеза му в растенията; ролята на биогенния изопрен за защита на растенията срещу абиотичен стрес и за атмосферната химия.

Изясняване физиологичната роля на биогенния изопрен като средство за защита на растенията срещу абиотичен стрес е основна цел на дисертацията, която обобщава изследването на следните хипотези:

(1) изопренът има съществено значение за толерантността на растенията, което се проявява на функционално, протеомно, метаболитно и структурно ниво; факторите на околната среда силно влияят върху емисията на биогенен изопрен, а в същото време тя представлява нетривиална загуба на въглерод за растенията;

(2) ендогенният изопрен влияе върху акумулирането на реактивни азотни и кислородни продукти в клетките, и по този начин определя отговора на растенията при стрес;

(3) синхронизирано действие на изопрена като част от антиоксидантната система на растенията, заедно с други защитни метаболити, осигурява по-добра протекция на растенията им при стрес.

За постигане на поставената цел на дисертационния труд са формулирани специфични задачи за изучаване на:

- възможния защитен ефект на изопрена срещу различни абиотични фактори (озон, синглетен кислород, висока температура, висока концентрация на CO₂ в атмосферния въздух, засушаване, антропогенно замърсяване);
- взаимодействието между изопрен и азотния оксид (NO) в растенията и последствието от това взаимодействие при оксидативен стрес;
- последиците от инхибирането на изопреновата емисия върху протеома, липидния и мастнокиселинен състав на фотосинтетичните мембрани, както и върху ултраструктурата на вътрешно-мембранната система на хлоропластите;
- взаимовръзката между изопреноидите и фенилпропаноидите при оптимални и стресови условия.

Основната част на дисертацията - Резултати и дискусия съдържа 7 тематични раздела.

В първия раздел 4.1 са представени резултати за антиоксидантния капацитет на биогенния изопрен, и включва изследвания за ролята на ендогенния изопрен за защита на фотосинтетичния апарат срещу окислителен стрес (индуциран с озон и чрез третиране с Rose Bengal) и срещу синглетен кислород, както и на трансгенни растения тютюн срещу окислителен стрес.

Следващият раздел 4.2 е посветен на термозащитната роля на биогенния изопрен, изучен в листа, в които емисията на изопрен е химически

манипулирана с фосмидомин, и листа от различни по възраст растения, които отделят различно количество изопрен. Освен това е изследвано комбинираното въздействие на повишена атмосферна концентрация на CO₂ и висока температура върху изопреновата емисия, и функционалните и структурни характеристики на растенията. Наблюдавани са нарушения във фотосинтетичната функция поради инхибиране на изопреновата емисия след третиране с висока температура, и стабилизиращ ефект на биогенният изопрен върху фотосинтетичните мембрани. Изследванията демонстрират, че ендегенният изопрен има защитна функция срещу висока температура, а също допринася за възстановяването на листата след прекратяване на стресовото въздействие. По-добрата термотолерантност на изопрен-отделящите листа се обяснява със способността на изопрена да стабилизира фотосинтетичните мембрани и да намалява активните кислородни форми. Резултатите показват също, че изопреновата емисия зависи от възрастта на растенията и че антиоксидантната и антирадикалната способност на растенията значително се повишава след излагане на висока температура.

В раздел 4.3 са обсъдени изследванията на ефекта на засушаване върху изопреноидите в трансгенни тютюневи растения и представя данни за това, че изопрен-отделящите тютюневи растения са по-добре защитени при засушаване в сравнение с растенията, които не отделят изопрен, което е в потвърждение на други изследвания. Получени са нови данни за възстановяване на растенията от приложения стрес при засушаване и за стимулиране на образуването на нелетливи изопреноиди и фенилпропаноидите, което води до допълнителна защита на растенията в условия на стрес. В процеса на засушаване емисията на изопрен се увеличава почти двойно в началните етапи на засушаване, и намалява значително само при най-силната степен на засушаване

Раздел 4.4 се отнася до взаимодействието между ендегенния изопрен и азотния оксид в растенията, ефекта от инхибирането на изопреновата емисия върху образуването на азотен оксид и възможността изопренът и азотният оксид да повишават устойчивостта им към окислителен стрес. Освен потвърждавайки това, че изопрен-отделящите листа са по-добре защитени срещу окислителен стрес, е установено, че изопрен-инхибираните листа, изпитващи окислителен стрес, отделят по-големи количества азотен оксид. Дискутирано е взаимодействието между изопрена и азотния оксид при нитрозилиране на белтъците. Екзогенният азотен оксид, подаден като газ или чрез донора SNP, има благоприятен ефект върху листата, които са изложени на окислителен стрес, намалявайки инхибирането на фотосинтезата, натрупването на реактивни кислородни форми и продукти от увреждане на мембраните.

За първи път е демонстрирано, че азотен оксид се натрупва само в изопрен-инхибирани листа на *P. australis* третирани с озон, докато азотен оксид

не е локализиран в изопрен-отделящи и изопрен-инхибирани листа, неизпитващи озонен стрес, нито в изопрен-отделящите листа третирани с озон.

Специално внимание е отделено на белтъците, липидите и ултраструктурата на хлоропластите в растения с инхибирана изопренова емисия в раздел 4.5, задълбочено са изследвани промените в хлоропластния протеом при генно манипулиране на изопреновата емисия в топола, промените в липидния матрикс на тилакоидните мембрани и ултраструктурата на хлоропластите в топола, и в S-нитрозилирането на белтъците в резултат от инхибирането на изопреновата емисия. Важно е да се отбележи, че за първи път е приложен нов метод за протеомни изследвания (изотопно кодирана техника за маркиране на белтъци), който позволява да се установи, че инхибирането на биосинтеза и емисия на изопрен води до промяна на белтъчния профил на хлоропластите, структурни промени във фотосинтетичните мембрани и намаляване на устойчивостта на растенията към окислителен стрес. Доказано е, че нивата на хлоропластните белтъци, участващи във фотосинтезата, намаляват при неотделящите изопрен генотипове топола, и се повишават нивата на хистоните и рибозомалните белтъци.

Раздел 4.6 обобщава данни за корелацията между действието на изопреноидите и фенолпропаноидите при стрес; за синхронизация на отделните компоненти на антиоксидантната система на растенията за защита и за интегриране между изопреноиди, летливи и нелетливи, и флавоноиди в растенията в отговор на екологични стрес фактори (високи температура и светлинен интензитет, и засушаване при чинар (*Platanus x acerifolia*)), и за физиологичната им роля при видове от под-семејство Arundinoideae с различен метаболизъм в условия на засушаване. Установено е, че изопренът намалява фотоокислителния стрес, редуцирайки реактивните кислородни и азотни форми, и засилва термоустойчивостта на тилакоидните мембрани.

Представени са нови убедителни доказателства за синхронизация на отделните компоненти на антиоксидантната система на растенията за защита и комбинирано действие на изопреноиди, летливи и нелетливи, и флавоноиди в растенията в отговор на екологични стрес фактори (високи температура и светлинен интензитет, и засушаване).

Анализът на два екотипа *A. Donax* показва стимулиране на биосинтеза на изопрен, което има защитна функция и предотвратява метаболитни увреждания при силно засушаване при екотипа, адаптиран към сурови в сравнение с този адаптиран към умерени климатични условия.

Последният раздел 4.7 поставя акцент върху ефекта на антропогенно замърсяване на околната среда върху емисията на изопрен, влиянието на тежкия метал никел върху фотосинтезата, мезофилната проводимост и изопреноидните емисии в *Populus nigra*, и промените в първичния метаболизъм и емисията на изопрен при различни нива на фосфор. Демонстрирано е, че Ni

влияе негативно върху растителния метаболизъм, ефект, който зависи от количеството Ni акумулирано в листата и от стадия на тяхното развитие, и за първи път е показано, че при третиране с Ni поради намалените мезофилна проводимост, електронен транспорт и максимална карбоксилираща активност на Рубиско се понижава фотосинтетичната ефективност, което зависи от етапа на онтогенетичното развитие на листата. Тези резултати са важни за разработването на модели, прогнозиращи емисиите на конститутивни и индуцирани изопреноиди в условията на стрес.

Високите нива на фосфор в растенията стимулират респираторните метаболитни процеси без да се увеличава отделянето на биогенен изопрен в атмосферата, а от друга страна стимулират първичния въглероден метаболизъм чрез увеличаване на фотосинтезата, което може да стимулира натрупването на биомаса и да увеличи отстраняването на фосфор от замърсени води.

Дисертационният труд завършва със Заключение и Справка за научните приноси, които представят най-важните и нови научни постижения на дисертационния труд.

Приноси на дисертационния труд за науката

Формулираните основни приноси, съдържат нова и оригинална за науката информация, а някои имат потвърдителен характер, и коректно отразяват директните експериментални доказателства за трите поставени хипотези за ролята на изопрена.

Доказателствата за (1) индуцираното от ендогенния изопрен повишаване на термостабилността на тилакоидните мембрани, свързано с влиянието му върху липидния състав на мембраните, количеството на основните липидни класове и мастнокиселинния им състав; (2) зависимостта на хлоропластната ултраструктура и хлоропластният протеом от инхибирането на биосинтеза на изопрен; (3) корелирането на отделянето на изопрен с нивото и мастнокиселинния състав на основните липидни класове в тилакоидите потвърждават хипотезата за съществената роля на изопрена за повишената толерантност на растенията, индуцирайки промени на структурно, протемно, метаболитно и функционално ниво.

Контролирайки нивата на S-нитрозилиране на ензими метаболизиращи реактивните форми, ендогенният изопрен регулира нивото на активните кислородни и азотни форми, което подкрепя втората хипотеза затова, че изопоренът индиректно модулира отговора на растенията към стрес.

Резултатите за синхронизирано действие на биогенния изопрен с други защитни метаболити (летливи и нелетливи изопреноиди и фенилпропаноиди), което осигурява допълнителна „антиоксидантна“ защита на растенията при стресови условия подкрепят третата хипотеза.

Публикации по дисертационния труд и личен принос на автора

Дисертационният труд обобщава научните приноси от 20 публикации, всички публикувани в реферирани в ISI Web of Science научни списания с висок ИФ (9 от тях са публикувани в списания с импакт фактор над 5 (от 5.08 до 7.21), общ импакт фактор 86.851, (19 с ранг Q1 и 1 с Q2). Резултатите са докладвани на 72 научни форума.

Трудовете свързани с дисертацията са на високо научно ниво, с висока цитируемост (1326). Има публикации цитирани: 561 пъти (*Plant Physiology* 127: 1781-1787, 2001); 125 (*Plant Cell and Environment* 32: 520-531, 2009); 119 (*Plant Cell and Environment* 28, 318-327, 2005); 4 публикации са цитирани повече от 47 пъти и т.н.

В 13 от публикациите проф. Великова е първи автор. Това показва нейната водеща роля, независимо, че са публикувани в съавторство с български и чуждестранни изследователи.

Автореферат

Авторефератът е представен на български и английски, и отразява съдържанието на дисертацията, научните приноси и включва списък на публикациите, свързани с дисертационния труд.

Лични впечатления

Познавам проф. Великова от дълги години като отдаден на научните изследвания, високо квалифициран учен, което е видно от солидната ѝ научна продукция. Считаю, че проф. Великова е изследовател с много голям потенциал и капацитет и в бъдеще да реализира оригинални научни проекти.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Представеният от проф. Виолета Борисова Великова дисертационен труд обобщава голям обем експериментални резултати, публикувани в авторитетни научни списания, и получили широк международен отзвук. Научните резултати представляват ценен принос за науката и отговарят на препоръчителните изискванията Закона за развитие на академичния състав в Република България (ЗРАСРБ), Правилника за прилагане на ЗРАСРБ в БАН и специфичните изисквания на ИФРГ-БАН за придобиване на научната степен "Доктор на науките".

Това ми дава основание да изразя убедено своята положителна оценка за дисертационния труд, задълбочените изследвания, постигнатите резултати и приноси за науката и да препоръчам на почитаемото Научно жури да присъди научната степен „Доктор на науките“ на проф. Виолета Великова в област на

висше образование 4. „Природни науки, математика и информатика“,
професионално направление: 4.3. Биологически науки, специалност
“Физиология на растенията”.

София
12.03.2020 г.

/проф. Стефка Германова Танева, дбн/