

РЕЦЕНЗИЯ

на дисертационен труд за присъждане на образователната и научна степен „**доктор**” в професионално направление 4.3 „Биологически науки”, научна специалност 01.06.08 „Биофизика“

Тема на дисертационния труд:
„Роля на температурата и каротеноидите за устойчивостта на висши растения към висок светлинен интензитет”

Автор: **Милена Танева Герганова**

Научен ръководител: проф. д-р Мая Величкова
Научен консултант: проф. д-р Антоанета Попова

Рецензент: доц. д-р Анелия Георгиева Добрикова
от Институт по биофизика и биомедицинско инженерство – БАН,
член на научно жури във връзка със защита на дисертационен труд,
съгласно заповед № 624/26.09.2017 г. на директора на ИБФБМИ - БАН

Милена Танева Герганова е била зачислена като редовен докторант, по специалността „Биофизика” към секция „Фотовъзбудими мембрани” в Института по биофизика и биомедицинско инженерство – БАН, от септември 2013 г. В момента работи като химик-специалист в същата секция. Тя е завършила Химикотехнологичния и металургичен университет – София със специалност: магистър „инженер-биотехнолог” през 2012 г. Дипломната си работа е изработила в Гърция, университета в гр. Патра, по програмата ЕРАЗЪМ. По процедурата тя е представила всички необходими документи, в съответствие с Правилника за приложението на ЗРАСРБ в ИБФБМИ-БАН.

Представеният дисертационен труд е свързан с изследванията по вече приключения двустранен Българо-Швейцарски изследователски проект. Във връзка с това, докторантката е имала две работни посещения - в Швейцария и в Унгария, с цел усвояване на нови методи, включени в дисертацията. Милена Герганова е била ръководител на 1 проект по Програмата на БАН за подпомагане на младите учени.

Представеният дисертационен труд е написан на 157 страници и включва: Увод, Литературен обзор - 40 стр. и 9 фигури, Цел и задачи - 2 стр., Материали и Методи - 9 стр., Резултати - 53 стр. с 2 таблици и 55 фигури и Обсъждане на 13 стр. с 3 обобщаващи фигури, Изводи – 9 броя и Приноси – 5 броя. Цитираната литература включва общо 289 литературни източника, от които 108 са от последните 10 години.

Актуалност и значимост на дисертационния труд:

Глобалната промяна на климата в последните години оказва неблагоприятно въздействие върху фотосинтетичните процеси като повлиява негативно развитието и добива на растенията. Ето защо изследванията, свързани с толерантността и устойчивостта на икономически значими растения към стресови фактори от околната среда като екстремни температури, висок светлинен интензитет и повишена UV-радиация, стават все по-актуални и придобиват все по-голяма важност. През последните години усилията в световен мащаб се насочиха към изясняването на аклиматизационните механизми за оптимизиране ефективността на фотосинтезата към промените на околната среда. Оптималната активност на фотосинтетичния апарат се определя от динамичните промени в състава и структурата на фотосинтетичните мембрани под въздействие на неблагоприятните условия на околната среда. Ето защо считам за актуална темата на представения ми за рецензия дисертационен труд, посветен на изучаване ролята на температурата и каротеноидите за устойчивостта на фотосинтетичния апарат на висшите растения към висок светлинен интензитет.

Литературният обзор е добре систематизиран и представлява обстоен научен преглед на съществуващите литературни данни до момента по темата на изследването. Представената информация е подробна и онагледена с подходящи модели и фигури, цитирани са актуални публикации. Изчерпателното изложение на обзора показва много добрата теоретична подготовка на докторантката. Той се състои от 5 основни раздела, посветени на съвременните представи за състава, структурата и функциите на фотосинтетичния апарат, локализиран в тилакоидните

мембрани. Представени са литературни данни за влиянието на светлинния интензитет и температурата върху структурата и функциите на фотосинтетичния апарат, както и механизмите за предпазване от оксидативен стрес. Специално внимание е отделено на състава, свойствата и функциите на каротеноидите и ксантофилите в тилакоидните мембрани. Тук бих посочила, че има известно повторение при показването на химичните структури на растителните пигменти на Фиг. 2А,В и на Фиг. 8А. Литературният обзор е написан в тясна връзка с целта на проведените изследвания в дисертацията и показва актуалността на поставените задачи.

Целта и задачите са формулирани ясно и конкретно. Основната цел на настоящата дисертация е да се изследва ролята на температурата и каротеноидите в отговора и аклиматизацията на фотосинтетичния апарат на домати растения (*Solanum lycopersicum*) към висок светлинен интензитет и да се сравнят функционалните им характеристики с тези на моделното растение *Arabidopsis thaliana*, отличаващо се с различна термотолерантност. За постигането на тази цел са формулирани **5 основни задачи**.

За тяхното изпълнение е използван широк набор от **съвременни биофизични и биохимични методи**, които включват: PAM хлорофилна флуоресценция за определяне активностите на двете фотосистеми (PSI и PSII), полярографски метод за измерване на кислородното отделяне на листа, HPLC за определяне съдържанието на каротеноиди и ксантофили, SDS-PAGE електрофореза (1D и 2D) за определяне на белтъчния състав, UV-VIS спектроскопия за пигментното съдържание в листата. В раздела „Материали и методи” подробно са описани и различните методи за количествено определяне на фотосинтетичните пигменти, за определяне степента на липидното окисление, определяне съдържанието на антоциани, изолиране на тилакоидни мембрани и статистическа обработка на експерименталните резултати. Овладяването на всички тези изброени методи ще е от изключителна полза за бъдещите изследвания на докторантката.

В разделите **Резултати** и **Обсъждане** са представени общо 58 фигури и 2 таблици. В тях е описана и анализирана извършената значителна по количество

експериментална работа във връзка с поставените задачи. Изследванията са насочени към изучаване на промените във функционалната активност на доматените растения, сравнени с тези на моделното растение *Arabidopsis thaliana*, в зависимост от продължителността на действие на стресовите фактори и обратимостта на наблюдаваните промени, индуцирани от високия светлинен интензитет в зависимост от температурата. Експерименталните резултати са разделени и представени в три основни части.

Първата част проследява промените и възстановяването след продължително въздействие (2 и 6 дни) на светлина с висок интензитет при оптимална температура (22/20 °C), **втората и третата част** изследват влиянието на високия светлинен интензитет в комбинация с умерено висока (38/29 °C) и субоптимална (12/10 °C) температура. Изследвани са промените в съдържанието на общи каротеноиди и хлорофили, синтеза на антоциани, промените в степента на окисление на мембранните липиди (липидна пероксидация), кислородното отделяне на цели листа, промените в максималната квантова ефективност и квантовия добив на фотосистема 2 (PSII), активността на фотосистема 1 (PSI), фотохимичното и нефотохимично гасене при двата вида растения. При доматените растения допълнително са определяни стрес-индуцираните промени, настъпващи в организацията и състава на пигмент-белтъчните комплекси на двете фотосистеми, както и в съдържанието на каротеноидите: виолаксантин, зеаксантин, неоксантин, лютеин и β -каротин. Установено е, че съдържанието на виолаксантин и зеаксантин при растения, третирани 6 дни с висок светлинен интензитет при нормална и ниска температура се увеличава значително. При третиране в комбинация на висок светлинен интензитет с висока температура такива данни липсват.

Резултатите от проведените детайлни паралелни изследвания на функционалните активности на *Solanum lycopersicum* и *Arabidopsis thaliana*, различаващи се по своята термочувствителност, са обобщени и анализирани в раздела **Обсъждане**. За оценка и сравнение на способността на двата растителни вида да се аклиматизират към действието на високия светлинен интензитет в зависимост от околната температура, в този раздел докторантката е представила обобщени диаграми, които онагледяват разликите в чувствителността им, както и в

способността им да се възстановят. Дискутирани са механизмите на аклиматизация при двете изследвани растения.

Известно е, че растенията се аклиматизират към висок светлинен интензитет, използвайки различни механизми за защита, някои от които включват промени в стехиометрията на реакционните центрове на двете фотосистеми и промени в размера на антенните им комплекси като съществено значение оказва и функционирането на ксантофиловия цикъл за обезвреждане на излишната погълната светлина. **Представените нови данни** в настоящата дисертация показват, че процесът на аклиматизация на доматиените растения към високия светлинен интензитет включва значително увеличение на съдържанието на каротеноидите, участващи в ксантофиловия цикъл (виолаксантин и зеаксантин), както и промени в стехиометрията на основните пигмент-белтъчни комплекси (отношението на PSI/PSII и Lhc/PSII). Установеното значително нарастване на количеството на PSII-CP43 комплекса, свързан с цикъла на „поправка” на PSII, показва интензивен процес на възстановяване на повредите във фотосистема 2, причинени от високия светлинен интензитет и комбинираното му действие с висока или с ниска температура.

Получените резултати показват, че аклиматизирането на *Solanum lycopersicum*, по отношение на функционалната активност на фотосистема 2, протича по-ефективно, когато високият светлинен интензитет се прилага заедно с умерено висока температура. Установено е също, че високата температура намалява увреждащия ефект на светлината и при двата растителни вида (*Solanum lycopersicum* и *Arabidopsis thaliana*), тъй като липидната пероксидация и синтеза на антоциани са по-слабо изразени при тази комбинация. От друга страна е показано, че ниската температура засилва увреждащия ефект на високия интензитет на светлината и при двете растения. За разлика от *Solanum lycopersicum*, отговорът и аклиматизацията на *Arabidopsis thaliana* към висок светлинен интензитет и ниска температура включва в много по-голяма степен нефотохимичното гасене по механизъм независим от функционирането на ксантофиловия цикъл (FNO).

Резултатите са обобщени в **9 извода и 5 приноса**, които са формулирани ясно и съответстват на получените експериментални резултати и на задачите, поставени в дисертационния труд.

Приемам **основните приноси** на дисертационния труд, които могат да се обобщят по следния начин:

Установена е по-висока стабилност на каротеноидите в сравнение с хлорофилите при *Solanum lycopersicum*, третирани с висок светлинен интензитет в комбинация с висока и субоптимална температура. Показано е, че *Solanum lycopersicum* се аклиматизира по-добре към високия светлинен интензитет при по-висока температура. Оригинален принос на дисертационния труд е показаната промяна в популацията на антенните белтъци на фотосистема 2, която е съпътствана с промяна в стехиометрията на двете фотосистеми при третиране на *Solanum lycopersicum* с висок светлинен интензитет и субоптимална температура. Показан е различният принос на ксантофил-зависимото нефотохимично гасене (NPQ) и на нерегулираното нефотохимично гасене (ФНО) при отговора на *Solanum lycopersicum* и на *Arabidopsis thaliana* към висок светлинен интензитет и ниска температура.

Авторефератът отразява правилно основните резултати на дисертационния труд като по обем и съдържание отговаря на изискванията.

Бележки и препоръки по дисертационния труд:

- В дисертацията се забелязват някои технически грешки и стилистични неточности, които съм показала лично на докторантката, например: „Mn4Cl клъстера” вместо „Mn4Ca клъстера” и т.н. или изрази като: “*подуване* на граната при топлинен стрес“, „Тъмнинно адаптираните листа бяха *окислени* от светлината“ и други.

- Всички цитирани автори в текста са описани в литературната справка. Но при цитиране на литературата, на места в текста има дребни технически грешки като: „Arnstrong”, вместо „Armstrong”; „Jihkson, 2002“ вместо “Johnson, 2002“ (на стр. 29), „Aller и Ort, 2001” вместо „Allen и Ort, 2001” (на стр. 47), „Bunker и съавт.,

1992” вместо „Bunker, 1992”. В раздел 4.2.1. от Литературния обзор (на стр. 42) са посочени някои цитати за температурен стрес при растения, но от литературната справка се вижда, че статиите са за толерантност към засушаване или засоляване.

- Представената формула за определяне концентрацията на общи каротеноиди по Lichtenthaler (1987) в раздела 3.1. на Материали и методи не е коректна, тъй като цялата сума се дели на числото 198, а не само хлорофил *b* (Chl *b*).

- Би било добре да се даде статистическата достоверност на представените резултати в двете таблици, за да може да се оцени дали промените в стойностите на изследваните параметри са статистически значими.

- Въпрос: Използван ли е Western blot в изследванията за определяне на белтъчния състав, тъй като това не е описано подробно в раздела Материали и методи?

- В резултатите се дава промяната в отношението на белтъчните комплекси Lhc/PSII и PSI/PSII в тилакоидни мембрани, но не са показани самите гелове от Blue-Native PAGE електрофорезата. Въпросът ми е: как по-точно е определяна идентичността на комплексите и може ли да се определи как се променят отделните комплекси на Lhc, PSII и PSI, а не само техните отношения?

Въпросите ми са уточняващи и направените забележки не засягат приносите на дисертацията, а по-скоро имат за цел отстраняване и избягване на посочените неточности в бъдещата работа на докторантката.

Собствените ми впечатления от докторантката Милена Герганова са, че тя е навлязла много добре в изследваните проблеми, притежава необходимата компетентност и експериментална подготовка. Считам, че тя може отговорно и самостоятелно да провежда научни експерименти, както и да интерпретира получените резултати.

Във връзка с дисертацията са публикувани **3 научни статии** в списания с импакт фактор: 1 в международното реномирано списание *Plant Physiology and Biochemistry* (IF = 2.724), която вече има 2 забелязани цитирания, и 2 в българското списание *C. R. Acad. Bulg. Sci.* (IF = 0.251). Това потвърждава наличието на нови и

оригинални резултати в дисертационния труд. Трябва да се отбележи, че и в трите публикации Милена Герганова е първи автор, което показва значимостта на нейното участие в тях. Материалите от дисертацията са представени общо на 7 научни форума, от които 2 международни и 2 като доклади на национални научни сесии за млади учени. Тези наукометрични данни напълно изпълняват изискванията на ИБФБМИ - БАН за присъждане на образователната и научна степен „доктор”.

Заклучение:

Дисертационният труд е актуален. Извършена е значителна по обем и качество научно-изследователска работа с подходящи и съвременни биофизични и биохимични методи като са получени нови и оригинални резултати. Тези резултати са публикувани в 3 списания с импакт фактор и вече са цитирани в реномирани международни списания.

Считам, че дисертационният труд на Милена Герганова до голяма степен е лично дело на докторантката и показва нейната много добра практическа подготовка и теоретични познания в областта на биофизиката на фотосинтетичните мембрани. Дисертационният труд отговаря напълно на изискванията на ЗРАСРБ и на Правилника за приложението му в ИБФБМИ-БАН.

Всичко това ми дава основание да дам своята **положителна оценка** и убедено да препоръчам на членовете на Научното жури да присъдят на кандидатката **Милена Танева Герганова** образователната и научна степен „доктор” по научната специалност „Биофизика”, професионално направление 4.3. „Биологически науки”.

20.11.2017 г.
гр. София

Рецензент:
/ Доц. д-р Анелия Г. Добрикова/