

РЕЦЕНЗИЯ

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

Автор на дисертационния труд: Константин Владимиров Добрев, ИБФБМИ, БАН

Тема на дисертационния труд: „Промени в ефективността на фотосинтетичните процеси в *Arabidopsis thaliana* в отсъствието на лютеин и при въздействие с висок светлинен интензитет”

Рецензент: проф. д-р Катя Маринова Георгиева, ИФРГ, БАН

Константин Добрев е завършил висшето си образование през 2012 г. в Биологически факултет на СУ „Св. Климент Охридски, откъдето получава магистърска степен по специалност “Молекулярна биология”. През 2013 г. е зачислен като редовен докторант към секция „Фотовъзбудими мембрани“, Институт по биофизика и биомедицинско инженерство, БАН. Докторантът е представил всички необходими документи, в съответствие с Правилника за приложението на ЗРАСРБ в ИБФБМИ-БАН, за да бъде допуснат до защита на дисертационния си труд.

Обща характеристика на дисертационния труд

Дисертационният труд е написан на 132 страници, структуриран е според изискванията за такъв труд и включва разделите: увод (1 стр.), литературен обзор (34 стр.), цел и задачи (1 стр.), материали и методи (12 стр.), резултати (60 стр.), изводи (2 стр.), заключение (2 стр.), приноси (1 стр.) и цитирана литература (12 стр.). Използваната литература включва 133 източника. В дисертационния труд са включени 61 фигури и 3 таблици.

Актуалност на разработвания в дисертационния труд проблем

Разработеният в дисертационния труд проблем е изключително актуален и е от важно значение за изясняването на ролята на каротеноидите за устойчивостта на фотосинтетичния апарат към неблагоприятното влияние на силната светлина при оптимална и ниска температура. В естествените си местообитания растенията са изложени на неблагоприятното действие на различни фактори на околната среда, които забавят растежа и развитието им. Излагането на растенията на светлина по-силна от тази, необходима за оптималното протичане на фотосинтезата, води до образуването на активни кислородни форми, оксидативен стрес и инхи-

биране на фотосинтезата. Фотоинхибирането е много по-силно, когато растенията са изложени на силна светлина при ниска температура. За изследване ролята на каротеноидите и най-вече на най-разпространения каротеноид лютеин за устойчивостта на фотосинтетичния апарат към фотоинхибиране докторантът е използвал подходящо избрана моделна система – див тип *Arabidopsis thaliana* (Col-0) и мутант *lut2*, в който не се синтезира лютеин.

Анализ на дисертационния труд

Литературният обзор е много добре структуриран, целенасочен и информативен. В първата глава подробно са описани и илюстрирани организацията на тилакоидните мембрани в гранални и стромални структури и разположението на компонентите на фотосинтетичната електрон-транспортна верига в тях, което е от съществено значение за изясняване на регулацията на фотосинтетичната активност. Обърнато е внимание на специфичните особености на липидния състав на тилакоидните мембрани. Във втората глава на литературния преглед са отразени съвременните представи за структурната организация и функциите на компонентите на фотосинтетичния апарат. Разгледано е значението на цикличният електронен транспорт около ФС1 като защитен механизъм срещу фотоувреждане в условия, когато линейният електронен транспорт през ФС2 е инхибиран. По-нататък са описани структурата и функциите на фотосинтетичните пигменти, като ясно е посочена защитната роля на каротеноидите. Важна част от литературния обзор е отделена на ефекта от третирането на растенията със светлина с висок интензитет върху фотосинтетичния апарат, като в четвъртата глава подробно са описани процесите на фотоинхибиране, фотообезцветяване и нефотохимично гасене. В последната, пета глава от литературния обзор, е направена характеристика на каротеноидния мутант *lut2* на *Arabidopsis thaliana*, при който поради блокиране на гена ликопен ϵ -циклаза не се синтезира лютеин и е използван в изследванията на докторанта за изясняване на ролята на лютеина за устойчивостта на растенията към абиотичен стрес.

Изложението на раздел *Литературен обзор* е илюстрирано с 13 фигури, което улеснява възприемането на представената информация. Изчерпателното изложение на обзора показва много добрата теоретична подготовка на докторанта.

Целта и задачите са формулирани ясно и точно. Основната цел на настоящата дисертация е да се изясни ролята на каротеноидите и най-вече на най-разпространения каротеноид лютеин, за (1) устойчивостта на фотосинтетичния апарат на висши растения към условията на абиотичен стрес – силна светлина при стайна или ниска температура и (2) за организацията на пигмент-белтъчните комплекси в тилакоидните мембрани в условията на висок светлинен

интензитет. За постигането на тази цел са формулирани 3 основни задачи. Изследванията са проведени с *Arabidopsis thaliana* – див тип (wt) и мутант lut2, който не синтезира лютеин. За третиране със висок светлинен интензитет при оптимална и ниска температура са използвани цели листа и изолирани тилакоидни мембрани.

За изпълнението на поставените задачи са използвани съвременни биофизични и биохимични **методи**, които включват: спектрофотометрично определяне на пигментното съдържание, полярографски метод за измерване на кислородното отделяне, измерване на светкавичните кислородни добиви с помощта на скоростен кислороден електрод, нискотемпературна (77K) хлорофилна флуоресценция, хлорофилна флуоресценция с помощта на РАМ флуорометър, SDS-RAGE електрофореза и Western blot. Всички методи са описани подробно и ясно.

От прегледа на изложените в раздел Материали и методи експериментални техники може да се заключи, че в процеса на обучението си докторантът е усвоил много и разнообразни методи.

Представяне и обсъждане на получените резултати. Раздел „Резултати“ е структуриран в три части, в които са описани изследванията върху 1) Промените във фотосинтетичната активност на цели листа *Arabidopsis thaliana*, wt и lut2, третирани *in vivo* с висок светлинен интензитет при стайна (22°C) и ниска (8-10°C) температура, както и промените във фотосинтетичната активност на тилакоидни мембрани, изолирани от листа, третирани за 4.5 ч. с висок светлинен интензитет; 2) Промени във фотосинтетичната активност на тилакоидни мембрани, изолирани от *A. thaliana*, wt и lut2 и третирани с висок светлинен интензитет при стайна (22°C) и ниска (4°C) температура; 3) Фотообезцветяване на фотосинтетичните пигменти и разграждане на белтъците на светосъбиращите комплекси в изолирани тилакоидни мембрани от *A. thaliana*, wt и lut2, при стайна температура.

В края на всяка част е представена **дискусия** на получените резултати. От този раздел се вижда, че е извършена значителна по обем експериментална работа и са получени съществени резултати, които са представени на 48 фигури и 3 таблици.

По-интересните и значими резултати по отделните задачи могат да се обобщят както следва:

1) Промени във фотосинтетичната активност на *Arabidopsis thaliana*, wt и lut2, третирани *in vivo* с висок светлинен интензитет ($1400 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) при стайна и ниска температура

Фотоинхибирането на цели листа при оптимална и ниска температура води до по-силно инхибиране на квантовата ефективност на ФС2 в мутанта *lut2* в сравнение с дивия тип, което корелира с увеличаване на дела на затворените ФС2 реакционни центрове и повишена дисипация на излишната абсорбирана светлинна енергия чрез независимото от ксантофиловия цикъл нефотохимичното гасене (ФНО). Степента на окисление на Р700 намалява при осветяване на листата със светлина с висок интензитет и то е най-силно в резултат на фотоинхибирането на *lut2* при ниска температура.

Сравняването на пигментния състав на *wt* и *lut2* при неосветени листа показва по-ниска концентрация на хлорофил и на каротеноидите при мутанта *lut2*, при който е установено и значително намаляване на концентрацията на пигментите при фотоинхибиране при ниска температура.

Изследването на фотосинтетичната активност в тилакоидни мембрани, изолирани от контролни и осветявани с висок светлинен интензитет цели листа от див тип и *lut2* в продължение на 4.5 ч. при стайна и ниска температура, показва понижена активност на електронния транспорт през ФС2, но не е установена температурна зависимост. Не са установени съществени промени във фотохимичната активност на ФС1, както за *wt*, така и за *lut2*.

Получените резултати показват, че в резултат на фотоинхибирането при стайна температура при *lut2* се намаляват активните ФС2- α реакционни центрове, но не се нарушава съществено механизма на кислородно отделяне при центровете, които остават активни. Фотоинхибирането при ниски температури води до значително намаление на добивите както при *wt*, така и при *lut2*, но нарушаването на периодичността на светкавичните добиви при мутанта предполага нарушение на отделянето на кислород по некооперативния модел на Kok.

Измерването на нискотемпературните флуоресцентни спектри показва, че третирането на дивия тип и мутанта при силна светлина увеличава относителното ниво на флуоресценцията при F735 и съответно на отношението F735/F685, което може да се дължи на миграция на ССК2 към ФС1, което е механизъм за защита на по-уязвимите към висока светлина ФС2 комплекси и/или поради намаляване на флуоресценцията от реакционния център на ФС2.

2) Промени във фотосинтетичната активност на тилакоидни мембрани, изолирани от Arabidopsis thaliana, wt и lut2 и третирувани с висок светлинен интензитет ($800 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) при стайна (22°C) и ниска (4°C) температура

Фотохимичната активност на ФС2 намалява с увеличаване на времето на осветяване на тилакоидните мембрани, изолирани от *wt* и *lut2* и при двете температури. ФС1 се повлиява в по-малка степен.

Изследванията на разпределението на енергията между ФС2 и ФС1 показват по-високо отношение F735/F685 при неосветени тилакоидни мембрани на *lut2* в сравнение с неосветените тилакоиди на *wt*, което най-вероятно е свързано с по-голям дял на стромалните участъци в тилакоидните мембрани и/или на по-голямото количество ФС1 комплекси при *lut2*. Освен това е установено, че с увеличаване времето на осветяване на тилакоидите при стайна температура се увеличава дялът на енергията, насочена към ФС1, като този процес е по-силно изразен при мутанта. При осветяване при ниска температура не се наблюдават съществени промени в отношението F735/F685, както при дивия тип, така и при мутанта.

3) *Фотообезцветяване на фотосинтетични пигменти и разграждане на белтъците на светосъбиращите комплекси в изолирани тилакоидни мембрани от Arabidopsis thaliana, wt и lut2, при стайна температура*

Анализът на абсорбционните спектри на неосветени тилакоидни мембрани показват понижена концентрация на каротеноидите и в по-малка степен на хлорофил б при *lut2*.

Установено е, че липсата на лютеин увеличава степента на фотообезцветяване на фотосинтетичните пигменти, най-силно изразено при хлорофил а и каротеноидите и предизвиква нарушаване на организацията на фотосинтетичния апарат при продължителното осветяването на тилакоидните мембрани при $800 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Резултатите от проведените изследвания са обобщени в 9 **извода**, които са формулирани ясно и съответстват на получените експериментални резултати и на задачите, поставени в дисертационния труд. **Заклучението** точно и ясно обобщава получените резултати.

Приемам посочените **научни приноси**, които имат оригинален характер.

Авторефератът е оформен съгласно изискванията и отразява основните раздели и резултати от дисертационния труд.

Въпроси и препоръки по дисертационния труд:

Защо изследванията върху промените във фотосинтетичната активност в резултат от третирането с висок светлинен интензитет *in vivo* са проведени с откъснати листа, а не с цели растения?

При изследване на промените във фотосинтетичната активност на изолирани тилакоидни мембрани, третирани с висок светлинен интензитет ($800 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) при 22°C и 4°C, правени ли са измервания с неосветени контроли за 1 час при съответната температура, тъй като активността на изолираните тилакоидни мембрани се запазва вероятно по-добре при 4°C в сравнение с 22°C?

Като препоръка към докторанта, добре е статистическата достоверност на разликите да бъде показана на всяка от представените фигури.

Преценка на публикациите по дисертационния труд

Резултатите от изследванията са публикувани в три научни статии с импакт фактор, в *Comptes rendus de l'Academie bulgare des Sciences*, *Photochemistry and Photobiology* и *Photosynthesis Research*. В първите две публикации докторантът е първи автор, а в третата втори автор, което показва личния му принос. Забелязан е цитат на статията в *Photochemistry and Photobiology*. Резултатите от дисертационния труд са представени на 6 научни мероприятия. Присъдена му е грамота за най-добър постер, представен на Младежка научна конференция „Климентови дни – 2016“. Ръководител е на научен проект ДФНП-134 „Роля на каротеноидите за устойчивостта на фотосинтетичния апарат на тилакоидни мембрани на висши растения към висок светлинен интензитет“.

Заклучение

Дисертацията на Константин Добрев е едно сериозно и задълбочено изследване, проведено на много добро научно ниво. Използвани са интересни подходи и съвременни биофизични и биохимични методи, извършена е голяма по обем експериментална работа и са получени научни резултати, които представляват оригинален принос в науката.

Дисертационният труд отговаря на всички изисквания на Закона за развитие 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 ИБФБМИ- БАН.

Като член на Научното жури убедено гласувам положително и препоръчвам на уважаемите членове на Научното жури да присъдят образователната и научна степен „доктор“ на Константин Владимиров Добрев в професионално направление 4.3. Биологически науки, научна специалност „Биофизика“.

08.01.2019 г.

Рецензент:

(проф. д-р Катя Георгиева)