

РЕЦЕНЗИЯ

на дисертационен труд за присъждане на образователната и научна степен „доктор” в професионално направление 4.3. „Биологически науки”

Тема на дисертационния труд:

„Чувствителност, инхибиране и защита на фотосинтетичния апарат в условия на кадмиев стрес“

Автор: Екатерина Калинова Йоцова, редовен докторант в секция „Фотовъзбудими мембрани“, Българска Академия на Науките, Институт по Биофизика и Биомедицинско инженерство. Научен ръководител: проф. д-р Емилия Апостолова, Научен консултант: доц. д-р Анелия Добрикова

Рецензент: доц. д-р Детелин Стефанов Стаменов, Софийски Университет „Св. Климент Охридски“, Биологически факултет, катедра Биофизика и радиобиология

Екатерина Калинова Йоцова е завършила Биологическия факултет на СУ „Св. Кл. Охридски”. Има бакалавърска степен по „Екология и опазване на природната среда” и магистърска степен по „Биофизика”. Екатерина Йосифова е зачислена като докторант в секция „Фотовъзбудими мембрани” към ИБФБМИ – БАН през 2014 г. и е отчислена с право на защита през 2018 г. Съгласно представените документи Йосифова е изпълнила индивидуалния си докторантски план, представила е дисертационния си труд на разширен семинар в секцията и след преценка е насочена към защита.

Представената ми за рецензия дисертация третира актуален въпрос, свързан с ефектите на кадмиев стрес върху фотосинтезата и търсене на начини за защита на фотосинтетичния апарат от вредното действие на кадмия. Така се търсят подходи за ограничаване на вредните ефекти на замърсяване с тежки метали (в случая кадмий) върху растенията. Темата е изключително интересна поради факта, че влиянието на кадмия върху организмите и по-специално върху растенията е изследвано от много лаборатории, но засега на база наличната литература смятам, че са получени множество противоречиви данни относно тези ефекти. Това най-вече се отнася до изследванията на ниво фотосинтетичен метаболизъм, където няма ясни виждания относно молекулните механизми на увреждане

на фотосинтетичния апатат от кадмия. Също така трябва да се отбележи, че в литературата почти не се срещат изследвания посветени на търсенето на подходи за защита от кадмиево увреждане. Растенията абсорбират хранителни вещества от почвата, използвайки корените си, като абсорбират и тежки метали заедно с необходимите им полезни минерали. Тежките метали също може да се абсорбират и директно в листата поради наличие на частици, отложени върху листните повърхности, което е последвано от преки ефекти върху фотосинтетичния метаболизъм. Токсичността на тежките метали в растенията варира в зависимост от растителните видове, специфичния метал, концентрацията и химическите особености на метала, както и състава и рН на почвата. Тежки метали се считат за една от най-сериозните опасности за човешкото здраве, тъй като лесно се поглъщат от растенията и следователно може ефективно да навлязат в хранителната верига. Кадмий присъства нормално в околната среда в концентрация около $1 \text{ mg Cd.kg}^{-1} \text{ DM}$. Освен опасностите свързани с човешкото здраве, замърсяването с кадмий силно ограничава и продуктивността на растенията. Тук трябва да се отбележи, че високите нива на кадмий в природата са предимно резултат от човешката дейност, докато естествени местообитания с повишено съдържание на кадмий са твърде рядко срещани, като например райони в Унгария и Индия. Въпреки факта, че йони на Cd се задържат главно в корените, той може бързо да се пренесе по ксилема и да се транспортира в листата, или да се абсорбират директно в листата поради наличие на съдържащи кадмий частици, отложени върху листните повърхности. Всичко това определя актуалността на темата, разглежданата от докторантката Екатерина Йоцова.

Представеният ми за рецензия дисертационен труд изпълнява изискванията за такъв научен труд и включва основни раздели като: „Литературен обзор“, „Цел и задачи“, „Материали и методи“, „Резултати“ и „Обсъждане“. Дисертационният труд е написан на 125 стр., от които „Увод“ – 2 стр., „Литературен обзор“ – 35 стр., „Цел и задачи“ – 1 стр., „Материали и методи“ – 7 стр., „Резултати“ – 30 стр., „Обсъждане“ – 15 стр., „Изводи“ – 2 стр., „Приноси“ – 1 стр. и „Литература“ – 24 страници. Резултатите са илюстрирани с 24 фигури и 18 таблици, като в раздел „Литературен обзор“ са включени 10 фигури. Цитирани са 439 литературни източника, като повечето от тях представят най-новите резултати в изследванията в съответната област, което е и основа за много добре написаното по-нататък в дисертацията обсъждане на резултатите.

В дисертационния труд са изследвани три различни обекта – ориз (*Oryza sativa* L. Galileo); зеленото микроводорасло *Chlorella vulgaris* Beijerinck 1890, добавяно към хранителната среда за отглеждане на растението във вид на клетъчна суспензия, с цел търсене на защитен ефект върху растенията третирани с кадмий. Изследвани са и две близко-

изогенни линии пшеница (*Triticum aestivum* L., cv. April Bearded) с разлика в *Rht-B1* локуса: *Rht-B1a* (високи растения, див тип) and *Rht-B1c* (джуджета, мутантен алел). Мутантният алел *-B1c* показва изменена морфология на клетките и на растенията като цяло, включително и фотосинтезата и е използван с цел изследване на защитни ефекти на DELLA протеини срещу увреждане от кадмий. За всеки от тези обекти е изследвано влиянието на кадмия, както и търсене на защитни ефекти срещу кадмий-индуцирано инхибиране на фотосинтезата растежни параметри и др. след третиране със салицилова киселина, добавяне на зеленото микроводорасло *Chlorella vulgaris* към хранителната среда и защитните ефекти на DELLA протеини, в пшеница с мутантен алел *-B1c*.

Литературният обзор е написан компетентно и описва в детайли развитието на проблематиката, разгледана от дисертантката. Литературни данни относно структурата и функциите на фотосинтетичния апарат са подходящо подбрани, което дава основа за набелязване на целта и задачите на дисертационния труд. От особено значение в тази дисертация е подробният анализ на база на наличните литературни данни относно ефектите на кадмия в растенията, което е база за доброто по-нататъшно описание на резултатите и тяхното детайлно обсъждане. Тук трябва да отбележа, че частта в литературния обзор свързана с ефектите кадмия е сам по себе си един великолепен обзор на постигнатото в тази област от изследвания и заслужава специално да бъде отбелязан като постижение, макар и несвързано пряко с експерименталната част.

Целта и задачите са формулирани ясно и точно и са базирани на прегледа на литературата и на съществуващите проблеми относно възможностите за търсене на защита от вредното действие на кадмия. Произтичащите от поставената цел четири експериментални задачи, са свързани с: изследване ефектите на салицилова киселина и наличието на *Chlorella vulgaris* за целите на търсене на защита от кадмиеви увреждания. Изследвана е и ролята на DELLA белтъците в условия на кадмиев стрес, чрез използване на два специфични генотипа пшеница.

В раздела „Материали и методи“ са представени детайлите относно опитната постановка на отделните експерименти с използваните растения и водорасли, видовете третираня, всяко от тях със своите специфични изисквания. Използваните подходи са съобразени с целите и задачите на дисертацията. Приложената статистическа обработка е подходяща и представителна по обем и качество.

В разделите „Резултати“ и „Обсъждане“ е описана и анализирана извършената значителна по обем експериментална работа във връзка с установяване уврежданията на фотосинтезата от кадмий и възможностите за търсене на подходи за ограничаване на тези увреждания. Изследвано е влиянието на различни концентрации салицилова киселина (SA), добавени към хранителния разтвор, върху растежните параметри и пигментното

съдържание в листата на оризови растения. Данните показват нарастване на корените и стъблата на растенията при най-ниската изследвана концентрация. Експерименталните резултати показват, че третирането със SA повлиява параметрите на РАМ хлорофилната флуоресценция. Влиянието на SA върху окислително-редукционните процеси във ФС1 е изследвано в детайли по промените в абсорбцията при 830 nm, които са резултат от фотоокислението на Р700. Установено е нарастване на това фотоокисление спрямо контролата при най-ниската изследвана концентрация на SA. Фотохимичната активност на двете фотосистеми, оценена по ФС2- ($H_2O \rightarrow BQ$) и ФС1-зависимият електронен транспорт ($DCPIP_{H_2} \rightarrow MV$) показва, че изследваните концентрации на SA повлияват фотохимичните активности на двете фотосистеми. Светкавични кислородни добиви и кислородно отделяне при непрекъснато осветяване показват, че най-ниската изследвана концентрация от 10 μM SA има стимулиращ ефект върху кислородното отделяне. Изследвани са и евентуалните защитните ефекти на SA и микроводораслото *Chlorella vulgaris* при наличие на кадмиев стрес. За по-детайлното изучаване на такива защитни ефекти са изследвани не само промените в растежните параметри, флуоресцентните и абсорбционните изследвания, кислородната активност, но и някои биохимични маркери свързани с кадмий-индуцираното развитие на оксидативен стрес като: малондиалдехид, водороден пероксид и пролин. Резултатите, базирани на различните биофизични и биохимични показатели, ясно показват, че защитната роля на зеленото водорасло *Chlorella vulgaris* в условия на кадмиев стрес е по-голяма от тази на SA. Като особено интересен резултат тук трябва да отбележа, че третирането с $CdCl_2$ води до нарастване на отношението F744/F685 (измерено с помощта на 77 K флуоресцентни спектри), което е свързано с увеличаване на преноса от ФС2 към ФС1, докато добавянето както на SA така и на *Chlorella vulgaris* в условия на Cd стрес предотвратява това нарастване. Изследвана е чувствителността към Cd стрес на два генотипа пшеница, с цел изучаване на ролята на DELLA протеини в защитата към този стрес. Установено е, че защитата срещу кадмиев стрес в мутантната пшеница не зависи това, колко кадмий се натрупва в тези растения, а зависи само от ефекта на DELLA протеините. Въпреки че мутантните растения натрупват повече Cd в тъканите от дивия тип, техните растежни параметри и фотосинтетичната активност са по-слабо повлияни.

В раздела „Обсъждане” са синтезирани представените в дисертационния труд данни, свързани с особеностите на кадмиево увреждане и са посочени особеностите на защитните ефекти на SA така и на *Chlorella vulgaris*, както и ролята на DELLA протеините.

Резултатите са обобщени в 8 извода, които съответстват на получената информация от експериментите. Приемам дефинираните

„Приноси” на дисертационния труд, а именно: 1) За първи път е показано, че *Chlorella vulgaris* защитава функциите на фотосинтетичния апарат на висши растения в условия на кадмиев стрес; 2) Представени са експериментални доказателства, че салициловата киселина, *Chlorella vulgaris* и DELLA белтъците намаляват инхибиращия ефект на кадмия върху растежните параметри и количеството на пигментите, като защитният ефект на *Chlorella vulgaris* е най-голям; 3) За първи път е показано влиянието на различни концентрации салицилова киселина в хранителния разтвор върху кинетичните параметри на кислородното отделяне при физиологични условия; 4) За първи път са представени експериментални доказателства за промените, настъпващи в кинетичните параметри на кислородното отделяне в условия на кадмиев стрес, както и ролята на салициловата киселина, *Chlorella vulgaris* и DELLA белтъците за защитата на Mn-кълстер на кислород-отделящата система; 5) За първи път са представени експериментални доказателства за защитната ролята на DELLA белтъците в пшеничен мутант (Rht-B1c) върху функционалната активност на фотосинтетичния апарат при въздействие с кадмий. Установени са молекулните механизми, чрез които тези белтъци подобряват толерантността на фотосинтетичния апарат към кадмиев стрес.

Авторефератът е в обем от 42 страници и по структура и съдържание отразява същността на дисертационния труд.

Към дисертационния труд имам някои бележки и препоръки. Дисертационният труд е добре написан и постигнатите резултати са прегледно представени, но се срещат и някои пропуски и неточности, които не намаляват качеството на дисертационния труд. В повечето утвърдени в литературата протоколи относно измерването на индукционни криви на флуоресценцията е зададено време за тъмнинна адаптация 30 минути. Според мен обаче по приемливо е измерване след по-кратка тъмнинна адаптация (5-10 минути) с цел избягване на евентуални ефекти на хлоропластно дишане върху началното ниво на флуоресценцията, F_0 . Предполагам, че има някаква печатна грешка относно интензитета на измерващата светлина $0.020 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ PFD. Би трябвало интензитетът да е в рамките на $0.120 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ PFD. Дисертантката използва неточно съкращение за светлинния интензитет $\mu\text{mol m}^{-2} \text{sec}^{-1}$, което не е съобразено с изискванията на SI системата ($\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ PFD). Освен това към мерната единица за интензитет на светлината трябва да се добавя съкращението PFD (photon flux density) или да се изписва без PFD, но тогава да е изписано като $\mu\text{mol hv} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$. Относно флуоресцентното отношение F_v/F_0 е избран за цитиране обзорът на Rohachek, но по-точното цитиране е някоя от свързаните с това флуоресцентно отношение работи на изследователят утвърдил използването на F_v/F_0 – H. Lichtenthaler. На 63 страница е допуснат лапсус по отношение на PAM флуориметрията като е написано,

че данните са флуоресцентни спектри, а те са флуоресцентни индукционни криви.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Оценявам високо дисертационния труд на докторант Екатерина Калинова Йоцова, представляващ актуално и детайлно изследване върху кадмиев стрес върху фотосинтезата и възможностите за разработване на приложни подходи за ограничаване на индуцираните от кадмия увреждания в растенията. По съдържание и научни приноси предложената за процедура по защита дисертационна работа отговаря на изискванията на ЗРАСРБ и правилниците за неговото приложение. Всичко това ми дава основание да препоръчам да се задвижи процедурата за защита на дисертационния труд за придобиване на образователната и научна степен „доктор”.

04.08. 2020 г.

Рецензент:

София

/доц. д-р Детелин Стефанов /