

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: Екатерина Калинова Йоцова, ИБФБМИ, БАН

Тема на дисертационния труд: „Чувствителност, инхибиране и защита на фотосинтетичния апарат в условия на кадмиев стрес”

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

Екатерина Йоцова е завършила висшето си образование през 2013 г. в Биологически факултет на СУ „Св. Климент Охридски, откъдето се дипломира като Магистър по “Биофизика”, специалност “Молекулярна биология”. От август 2013 г. е назначена като специалист биолог в Институт по биофизика и биомедицинско инженерство, БАН, а от 2014 г. е зачислена като редовен докторант към секция „Фотовъзбудими мембрани“ в същия институт. Отчислена с право на защита през 2018 г. Общият брой публикации на Екатерина Йоцова е 10. Участвала е в 24 научни форума и в разработването на 10 научни проекта.

Докторантката е представила всички необходими документи, в съответствие с Правилника за приложението на ЗРАСРБ в ИБФБМИ-БАН, за да бъде допусната до защита на дисертационния си труд.

Обща характеристика на дисертационния труд – обем и структура

Дисертационният труд е написан на 125 страници и включва разделите: увод (2 стр.), литературен обзор (34 стр.), цел и задачи (1 стр.), материали и методи (8 стр.), резултати (30 стр.), обсъждане (15 стр.), изводи (2 стр.), приноси (1 стр.) и цитирана литература (25 стр.). Използваната литература включва 439 източника. В дисертационния труд са включени 24 фигури и 18 таблици.

Актуалност на разработвания в дисертационния труд проблем

Проблемът със замърсяването на околната среда с тежки метали е актуален както в световен мащаб, така и в нашата страна поради факта, че те остават в почвата за продължителен период от време и процесът на тяхното очистване е труден и продължителен. Кадмият е

един от най-токсичните тежки метали. Поради високата му разтворимост във вода той лесно се поглъща от растенията и натрупването му в растителните тъкани може да доведе до инхибиране на фотосинтезата и растежа на растенията и намаляване на тяхната продуктивност. Въпреки засиления интерес, механизмите на увреждане и защита на растенията в условия на кадмиев стрес не са напълно изяснени. Разработеният в дисертационния труд проблем е изключително актуален и е от важно значение за изясняването на защитните функции на салициловата киселина, зеленото микроводорасло *Chlorella vulgaris* и на DELLA белтъците за преодоляване на вредното действие на повишената концентрация на кадмий. Като обект на изследване са използвани растения с важно селскостопанско значение - ориз (*Oryza sativa* L.) и пшеница (*Triticum aestivum* L.). Представеният за рецензия дисертационен труд разглежда един важен проблем с научно и научно-приложно значение.

Анализ на дисертационния труд

Литературният обзор е добре структуриран, целенасочен и информативен. Описана е структурната организация на хлоропластите и характерните особености на липидния състав на тилакоидните мембрани. Особено внимание е отделено на организацията на комплексите на фотосистема 1 (ФС1) и ФС2, светосъбиращите комплекси (ССК1 и ССК2), структурната организация и функционирането на кислород-отделящата система (КОС), цитохром b6f комплекса и АТФ-синтезния комплекс. Освен за компонентите на електрон-транспортната верига, представена е и кратка и ясна информация за линейния и цикличния електронен транспорт. Важна част от литературния обзор е посветена на ефекта на кадмия върху растенията като е обърнато особено внимание на влиянието му върху структурната организация на фотосинтетичния апарат и функционалната активност на ФС1 и ФС2. Последната, пета глава от литературния обзор е посветена на защитните механизми в растенията в условия на кадмиев стрес, като докторантката подробно е описала защитната роля на салициловата киселина (SA), DELLA белтъците и на микроводораслите при отстраняване на тежки метали, които са обект на изследване в дисертационния труд.

Литературният преглед е онагледен с 10 цветни фигури, което улеснява възприемането на представената информация. Изложението на обзора, както и цитирането на 439 литературни източника показва добрата теоретична подготовка на докторантката.

Целта и задачите са формулирани ясно и точно. Основната цел на дисертационния труд е да се изследват промените, настъпващи при ориз (*Oryza sativa* L.) и пшеница (*Triticum aestivum* L.) в условия на кадмиев стрес, както и да се изяснят защитните функции на сали-

циловата киселина, зеленото микроводорасло *Chlorella vulgaris* и на DELLA белтъците. За постигането на тази цел са формулирани 4 основни задачи. Обектите на изследване са важни селскостопански култури, които са подходящо подбрани за изпълнението на поставените задачи. Оризовите растения са използвани за изследване на защитното действие на салицилова киселина и зеленото микроводорасло *Chlorella vulgaris* за преодоляване на вредното влияние на кадмиевия стрес. А за изследване на ролята на DELLA белтъците в условия на кадмиев стрес са използвани два генотипа пшеница: Rht-B1a (див тип) и Rht-B1c (мутант с високи нива на DELLA белтъци).

За изпълнението на поставените задачи са използвани съвременни биофизични и биохимични **методи**, които включват: спектрофотометрично определяне на пигментното съдържание и на количеството на водородния пероксид, малондиалдехид и пролин, хлорофилна флуоресценция с помощта на РАМ флуорометър, полярографски метод за измерване на кислородното отделяне, измерване на светкавичните кислородни добиви с помощта на скоростен кислороден електрод, нискотемпературна (77K) хлорофилна флуоресценция. Всички методи са описани подробно и ясно. Много добро впечатление прави добрата статистическа обработка на данните, което е допринесло за правилното описание и дискутиране на получените резултати.

От прегледа на изложените в раздел Материали и методи експериментални техники може да се заключи, че в процеса на обучението си докторантката е усвоила много и разнообразни методи, което ще е от полза за бъдещите ѝ изследвания.

Представяне и обсъждане на получените резултати. Раздел „Резултати“ е структуриран в три части, в които са описани изследванията върху 1) Влиянието на салициловата киселина върху оризови растения; 2) Влиянието на кадмиевия стрес върху оризови растения в присъствието на салицилова киселина и *Chlorella vulgaris*; 3) Ролята на DELLA белтъците за толерантността на пшенични растения към кадмиев стрес. Проследени са промените в растежните параметри, нивото на стресови маркери (водороден пероксид, МДА, пролин), функционалната активност на фотосинтетичния апарат (чрез измерване на фотохимичната активност на ФС2 и ФС1 и разпределението на енергията на възбуждане между тях, промените в пигментния състав и функционалната активност на кислород-отделящата система), както и натрупването на кадмий в корените и стъблата. Извършена е значителна по обем експериментална работа и са получени съществени резултати, които са представени на 14 фигури и 18 таблици.

Основните резултати могат да се обобщят както следва:

1) *Влиянието на салициловата киселина върху оризови растения*

Важна част от дисертационния труд е посветена на определянето на оптималната концентрация на SA за оризови растения, тъй като литературните данни показват, че тя е видово специфична. Направено е задълбочено изследване на влиянието на различни концентрации салициловата киселина (10, 50 и 100 μM), добавени към хранителния разтвор върху растежните параметри, пигментното съдържание и фотосинтетичната активност на оризови растения. Изследванията на докторантката допринасят за изясняването на ефекта на екзогенното третиране със SA чрез корените, тъй като в повечето от изследванията, описани в литературата, са третирани семената или растенията са пръскани със SA.

Получените резултати показват, че 10 μM е оптималната концентрация на SA за млади оризови растения. Третирането с 10 μM SA води до стимулиране растежа на растенията, увеличаване на общото хлорофилно съдържание в листата, стимулиране на фотохимичната активност на двете фотосистеми, увеличение на цикличния електронен транспорт около ФС1. Установен е и стимулиращ ефект върху кислородното отделяне, значително се повишава количеството на всички функционално активни реакционни центрове на ФС2.

2) *Влиянието на кадмиевия стрес върху оризови растения в присъствието на салицилова киселина и *Chlorella vulgaris**

Подобно на салициловата киселина, присъствието на зеленото микроводорасло *Chlorella vulgaris* в хранителния разтвор стимулира растежа, особено на корените и повишава пигментното съдържание, фотохимичната активност на ФС2 и кислородното отделяне при въздействие със светкавици и при непрекъснато осветяване.

Третирането на оризови растения с 150 μM CdCl_2 за 14 дни води до значително увеличаване на количеството на изследваните стресови маркери (H_2O_2 , МДА и пролин), което показва наличието на кадмиев стрес. Кадмиевият стрес инхибира на растежа на корените и стъблата, фотохимичната активност на двете фотосистеми и кислородното отделяне. Установени са промени в кинетичните параметри на кислород-отделящите реакции и увеличаване на количеството на блокираните ФС2 центрове и е изказано предположението за изменения в Мп-кълстер и/или увреждане на КОС в донорната страна на ФС2. По-силното инхибиране на светкавичните кислородни добиви в сравнение с кислородното отделяне при неп-

рекъснато осветяване предполага, че ФС2 α центровете в граналните области са по-силно повлияни от CdCl₂ в сравнение с ФС2 β центровете в стромалните ламели.

Третирането на оризови растения със салициловата киселина и *Chlorella vulgaris* понижава количеството на H₂O₂ и пролин и липидната пероксидация и намалява инхибиторното действие на кадмия върху параметрите на растежа, пигментното съдържание и ефективността на ФС1 и ФС2. За първи път е показано, че микроводораслото *C. vulgaris* защитава фотосинтетичния апарат на висши растения в условия на кадмиев стрес. Предполага се, че защитният ефект на SA е резултат от обезвреждането на ROS, предпазвайки клетките от оксидативното увреждане, както и на намаленото натрупване на Cd в стъблата на оризовите растения в резултат от намалената (с около 56%) транслокация на метала от корените към надземните части. Една от вероятните причини за защитният ефект на зеленото микроводорасло е намаленото съдържание на Cd в стъблата, в резултат от слабата транслокация на този метал от корените към стъблата, както и абсорбцията му от водораслото. Сравнено е влиянието на SA и *C. vulgaris* за намаляване на вредното действие на кадмия върху изследваните параметри. Като цяло, резултатите показват, че те имат доста сходен защитен ефект.

3) *Ролята на DELLA белтъците за толерантността на пшенични растения към кадмиев стрес.*

В дисертационния труд за първи път е сравнена чувствителността към Cd на два генотипа пшеница: Rht-B1a (див тип) и Rht-B1c (мутант с високи нива на DELLA белтъци). Получените резултати показват, че нискостъбленият DELLA мутант е по-толерантен към Cd стрес, отколкото дивия тип, което се изразява в по-слабо намаляване на пигментното съдържание, по-слабо инхибиране на фотохимичната активност на ФС1 и ФС2 и по-слабо увреждане на кислород-отделящия комплекс. Предполага се, че намаленото инхибиране на ФС2 се дължи на по-голямото количество на отворените реакционни центрове, по-слабото инактивиране на кислород-отделящите ФС2 α центрове и по-малките промени в Mn-кълъстер на кислород-отделящата система при мутанта.

По-голямо натрупване на Cd в тъканите на мутантните растения, особено в стъблата, в сравнение с дивия тип показва, че Rht-B1c мутацията не води до намаляване на транслокацията на Cd от корените към стъблата. Предполага се, че по-високата устойчивост на мутанта към Cd би могла да се дължи на повишен антиоксидантен капацитет и на ускорения цикличен електронен транспорт.

В раздел **Обсъждане** е направен задълбочен анализ на получените експериментални резултати чрез съпоставянето им с наличните литературни данни. Резултатите от проведените изследвания са обобщени в 8 **извода**, които съответстват на получените експериментални резултати и на задачите, поставени в дисертационния труд.

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:

Прави впечатление, че в Материал и методи формулата на отношението Rfd е написана по необичаен начин - $Rfd = Fd/(Fm - Fd)$. Според Lichtenthaler et al. (2005), $Rfd = \text{флуоресцентния спад от } Fm \text{ до } F_s (F_d) \text{ разделено на } F_s$; или $Rfd = (Fm - F_s)/F_s = Fd/F_s$

От представените на Фиг. 16 данни се вижда, че в условия на кадмиев стрес всички параметри на хлорофилната флуоресценция, измерени в светлинно адаптирано състояние (ФPSII, qP, ETR, Rfd), които обикновено са по-чувствителни към различни видове стрес в сравнение с параметрите, измерени в тъмнинно-адаптирано състояние (F_v/F_m , F_v/F_0) се понижават от 9 до 13%, докато отношението F_v/F_0 намалява най-силно. На какво се дължи това – на промяна в стойностите на максималната или нулевата флуоресценция? Освен това намаляването на квантовата ефективност на електронния транспорт през ФC2 (ФPSII) след третиране на оризови растения с $CdCl_2$ се свързва с намалението на отношението на квантовия добив на фотохимичните към нефотохимичните процеси (F_v/F_0). Вероятно нефотохимичните процеси са от значение в условия на кадмиев стрес. Добре би било да се представят данни за нефотохимичното гасене на хлорофилната флуоресценция, което е важен защитен механизъм в условия на стрес.

Преценка на публикациите по дисертационния труд

Резултатите от изследванията са публикувани в три научни статии – *Plant Physiology and Biochemistry* (IF 3.404, Q1), *Theoretical and Experimental Plant Physiology* (IF 1.532, Q2) и *Comptes rendus de l'Academie bulgare des Sciences* (IF 0.321, Q2). В две от публикации докторантката е първи автор, а в една – втори, което показва личния ѝ принос. Забелязани са общо 12 цитата досега, което доказва актуалността на проблема и изследванията на Екатерина Йоцова. Представените публикации напълно отговарят на дисертацията и покриват изиска-

нията на ИБФБМИ-БАН за присъждане на образователната и научна степен „доктор”. Резултатите от дисертационния труд са представени на 6 научни мероприятия с 4 устни съобщения и 2 постера, като на всички докторантката е първи автор. Екатерина Йоцова е била ръководител на проект ДФНП-137/12.05.2016 по *Програма за подпомагане на младите учени в БАН* на тема „Ефект на *Chlorella vulgaris* върху фотосинтетичния апарат на оризови растения в условия на кадмиев стрес“.

Заключение

Дисертацията на Екатерина Йоцова е сериозно и задълбочено изследване, проведено на много добро научно ниво. Използвани са съвременни биофизични и биохимични методи, извършена е внушителна по обем експериментална работа и са получени научни резултати, които представляват оригинален принос в науката. Докторантката притежава добра методична подготовка и е придобила значителен научно-изследователски опит, което е важна предпоставка за бъдещото ѝ успешно развитие.

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 Екатерина Калинова Йоцова в професионално направление 4.3. Биологически науки, научна специалност „Биофизика”.

07.08.2020 г.

Рецензент:

(проф. д-р Катя Георгиева)