

РЕЦЕНЗИЯ

от проф. д-р Нася Борисова Томлева

Институт по зеленчукови култури „Марица“, Пловдив

на дисертационен труд за присъждане на образователната и научна степен **„доктор“**

в област на висше образование: 4. Природни науки, математика и информатика

професионално направление: 4.3. Биологически науки

научна специалност: Молекулярна биология

докторска програма: Молекулярна биология

Автор: Николай Пламенов Аначков

Форма на докторантурата: докторант в редовна форма на обучение към Пловдивски университет „Паисий Хилендарски“

Тема: „Използване на растителни микроспорови култури в молекулярно-биологични изследвания“

Научни ръководители: Проф. д-р Алишер Тураев и Проф. д-р Галина Яхубян

1. Общо представяне на процедурата и докторанта

Представеният от Николай Аначков комплект материали на хартиен носител е в съответствие с Чл.36 (1) от Правилника за развитие на академичния състав на ПУ и включва следните документи:

1. молба по образец до Ректора на ПУ за разкриване на процедура за защита на дисертационен труд;
2. автобиография по европейски формат;
3. диплома за образователно-квалификационна степен „магистър“ с приложение-оригинал;
4. протокол от КС за готовността на кандидата за предварително обсъждане;
5. заповед на Ректора за разширяване на състава на КС;
6. протокол от предварително обсъждане в катедрата;
7. автореферат;
8. декларация за оригиналност и достоверност на приложените документи;
9. справка за спазване на специфичните изисквания на Биологически факултет;
10. списък на публикациите;
11. дисертационен труд;
12. копия на публикациите по темата на дисертационния труд;
13. заповед за зачисляване в докторантура;
14. заповеди (2 бр.) за удължаване на обучението;
15. заповед за отчисляване от докторантура;
16. заповеди за комисии за провеждане на изпитите от индивидуалния учебен план;

17. протоколи за издържани 2 изпита от индивидуалния учебен план с отличен 6.00;
18. комплект документи на хартиен носител от т.1 до т.18 – 3 броя;
19. комплект документи от т. 1, 2, 3, 8, 9, 10, 12, 13, 14, 15, 16, 17 (на електронен носител).

Николай Аначков е завършил висше образование със степен „Магистър по молекулярна биология и биотехнологии“ към Пловдивски университет „Паисий Хилендарски“. От март 2012 до март 2015 год. е зачислен в редовна докторантура в Катедрата по Физиология на растенията и молекулярна биология към Биологически факултет на ПУ „Паисий Хилендарски“.

Като докторант той осъществява специализации в две страни Нидерландия (Университета във Вагенинген) и Турция (Центъра за ядрени изследвания „Сарайкьой“, Анкара). Взема участие в международни и национални научни конференции (във Варна – 2 конференции и в Холандия). Владее отлично английски език.

Представеният от Николай Аначков комплект материали на хартиен носител по дисертацията е в съответствие с изискванията на Закона за развитие на академичния състав в РБ и Правилника за неговото приложение.

2. Актуалност на тематиката

Получаването на хаплоиди е много значимо и се извършва чрез процеса андрогенеза (от мъжки полови клетки, Polen), а на двойните хаплоиди (удвоени хаплоиди) (ДХ) - чрез хромозомно удвояване. Има различни методи за привеждане на растенията на културните видове в хомозиготно състояние – най-известните са т.нар. близко изогенни линии и рекомбинантни инбредни линии или комбинирано. Но, елиминирането на хетерогенността чрез класическите селекционни методи е дълъг процес, който продължава 8 години. Чрез тях не се постига пълна хомогенност, а предимно, но не само по гени, чиято експресия се наблюдава визуално. За разлика от методите на класическата селекция и генетика, двойно хаплоидните линии се създават много по-бързо и чрез тях се постигат напълно хомогенни линии. Налице са ограничаващи фактори, които влияят на ефективността на производството на двойно хаплоидни линии. Работата в рамките на настоящата дисертация допринася за преодоляването на недостатъците, възникнали при прилагането на технологията за производство на ДХ.

Оптимизирането на критичните фактори за репрограмиране на микроспори от гаметофитен към спорофитен път на делене е от решаващо значение за производството на двойни хаплоиди. Създадени, те имат редица съвременни приложения за земеделието:

- ДХ имат потенциал да осигурят родителски форми в хибридизационните програми за създаване на F_1 хибриди с подобреното си качество и/или повишен добив.

- ДХ са идеална система за индуциране на мутации, а още повече за селекция на мутациите, които по-често са рецесивни. Чрез тях за много кратък срок (ранни мутантни поколения) могат да бъдат създадени мутантни линии.

- Повече от важните признаци, като устойчивост на болести и неприятели, се кодират полигенно и по-често - от рецесивни алели. За да се експресират, те трябва да се комбинират в хомозиготно състояние.

- Чрез хаплоидните растения се получават растения с различна плоидност.

- Хаплоидите служат като идеален обект за трансформация.

Освен за решаването на много селекционни въпроси със стопанско значение, наличието на ДХ растителни организми е от важност за изследователската работа на цитолозите и за генетиката. Те са идеалната популация за идентифициране, маркиране и картиране на гени, откриване на произхода и генетичната близост на видовете.

Така, актуалността на темата трябва да се разглежда в теоретичен и в практичен аспект.

3. Познаване на проблема

Литературната справка се състои от 203 литературни източника на латиница, от които 48 (около 1/4) са от последните 10 години. Богатата, добре онагледена, подходящо и целенасочено систематизирана информация в този раздел ми дава основание да считам, че докторантът е много добре осведомен по основните постижения, свързани с проблемите, над които работи в дисертационния си труд.

4. Методика на изследването

Изборът на ценните растителни генотипи, особено при пипера, характеризирани по отношение на податливостта им за производство на хаплоиди е правилен. ДХ при избраните сортове, с потенциала си да се разшири спектърът на полезни качества, биха послужили за решаване на редица проблеми в селекцията.

В настоящата дисертация са изследвани фазите на развитие на микроспорите (ключов фактор за микроспоровата ембриогенеза), *in vitro* системи за развитие на микроспорите – среди за индуциране на ембриогенезата, изпитани са донорни растения и физиологичното им състояние, чиито статус е повлиян от фактори, създаващи условия за развитието им, а донорните растения са взети от генотипи, като е изследвано влиянието им върху ембриогенната продукция. Наблюдавана е силна генотипна зависимост и неподатливост към ембриогенеза. Проучени са стресови фактори, водещи до индуциране на микроспоровата ембриогенеза: облъчване с ^{60}Co ; ниска и висока температура, „гладуване“, колхицин.

Идеята за провеждането на научни изследвания методически е построена издържано. Анализите са изведени с подходящо избрани методи, описани правилно, усвоени и успешно приложени от докторанта, като някои от работните протоколи са оптимизирани.

- Измежду описаните методи в раздел „Литературен обзор“ е избран като основен методът за изолиране и култивиране на микроспори от пипер, домати и рапица.

- Описани и използвани са среди за стрес и репрограмане на микроспорите, за ембриогенно развитие на микроспорите и за регенерация на новополучените ембриони.

- Оцветяването за установяване фазата на развитие на микроспорите е проведено с DAPI, а за установяване жизнеността на микроспорите - с FDA и PI.

- Плоидността е определяна по метода на устичните клетки. Изборът на метода е подходящ, заради бързината му.

- Протоколи за приложение на избраните стресови фактори.

5. Характеристика и оценка на дисертационния труд и приносите

Производството на хаплоиди при домати е истинско предизвикателство, но това е една изключително смела задача, още повече, предвидена да се разработи за три години в рамките на една дисертация. Голямо неудобство е фактът, че при антерните култури често се получават ембриони и растения, които са резултат от разрастване на антерната стена (без гаметофитен произход), а не на микроспората. Друго неудобство е, че не може директно да се наблюдава развитието на гаметите и директното влияние на среди и фактори върху ембриогенезата. Опитите да се произведат ДХ при домати продължават над половин век и е необходимо първо да се изяснят механизмите, възпрепятстващи репрограмирането на микроспорите да преминат от гаметофитно в спорофитно развитие, преди да се продължи с опитите да се получи регенерация, хаплоидни и удвоени хаплоидни растения.

В този смисъл оценявам постиженията при домати, показани в тази дисертационна работа. Оптимизирани са критичните точки за ембриогенеза за репрограмиране на микроспори от домати *Solanum lycopersicum*, сорт Money-maker. Изтъква се положителният ефект на Трихостатин А върху репрограмирането и спорофитното делене на микроспорите му. Светлина би дало, вероятно, изолирането на гени, свързани с репрограмирането, включително и мутанти при тях, и при вече известните. От помощ би бил индуцираният мутагенезис, комбиниран с „ревърс“-молекулярна технология.

От гледна точка на част от практическата работа в селекцията за производство на F_1 хибриди, това мое твърдение се подсилва и от факта, че ДХ са от много по-голямо практическо значение при кръстосано размножаващи се, отколкото при самоопрашващи се видове. На нашите географски ширини домати са почти изцяло самоопрашваща се култура, докато пиперът е над 50% кръстосаноопрашваща се. За F_1 хибридите, наличието на ДХ действително спестява 2 пъти работна ръка и финансови средства. За съжаление, съществува ограничение от генотипната зависимост на ефективността на производството им. Точно затова, когато се правят опити за производство на ДХ се работи с генотипи с много добри стопански и качествени показатели, които бихме искали да бъдат прехвърлени в F_1 хибридите и завишени, подобрени чрез евентуално постигане на хетерозис. Разбира се, необходима е система за по-ефективно производство на ДХ и възможност за селекция на ДХ, при които се е получило съчетаване на благоприятни алели. По-масовото производство би дало възможност за отбор на най-добрите ДХ. Точно към това се е насочил докторантът в дисертацията се. Изпитани са стресови фактори, които водят до превключване на спорите от гаметофитен към спорофитен път или от клетка с ограничен потенциал за развитие в

тотипотентна или ембрионна стволова клетка. Такива са гама-лъчи, висока и ниска температура, „гладуване“ на бедни среди за *in vitro* култивиране, колхицин.

Пиперът е основният хранителен културен вид, подложен на интензивна селекция чрез всички познати досега методи, а биотехнологията, имаща потенциал да осигури производството на двойни хаплоиди, подава материал за хибридизационните програми при изпитване на комбинативната способност на ДХ с други ценни родителски компоненти. В дисертацията са получени ембриони от микроспорова култура от един сорт сладък и един сорт лют пипер.

От въвеждането на хаплоидите в селекцията, най-напред при царевицата, досега са изминали 70 години, но вече 50% от съвременните сортове при видове, като ечемик, са на основата на ДХ. Много добри са постиженията при рапицата, благодарение на общия напредък при Brassicaceae, вкл. *Arabidopsis*. Трябва да се отбележи приносът на дисертационния труд - създаването на хаплоидни растения от рапица (*Brassica napus*) чрез микроспорова ембриогенеза.

Изследванията в дисертацията скъсяват пътя за целенасочената селекция на подходящи линии с подобро качество, а това позволява да се посрещнат местните селекционни предизвикателства при F₁ хибридно производство.

Дисертацията е правилно структурирана по раздели, терминологията е издържана. Резултатите, онагледени с 24 фигури и 11 таблици, умело са интерпретирани и са дискутирани във връзка с постиженията на други автори по проблема. Научните изводи съответстват на целите, резултатите и дискусията. От тук научните приноси са постигнати по отношение на отбраните фактори, изпитаните перспективни сортове, които са добра перспектива за бъдещото създаване на двойни хаплоиди.

Въпроси към докторанта:

1. Достижимо ли е получаването на протоколи за получаване на голям брой хаплоидни и двойно хаплоидни ембриони от пипер и на какво трябва да се наблегне за оптимизирането им ?

2. Ще успеят ли биотехнологиите да доведат до получаване на хомозиготни растения при домат, за да задоволят нуждите на селекцията и генетиката ?

6. Преценка на публикациите и личния принос на докторанта

Николай Аначков представя две публикации в реферирани издания. В една от тях, той е водещ автор. Първата публикация е в българско научно списание, издание на БАН, а втората в чуждо. Двете публикации са в SCI с IF 0,233 и 1,563, съответно, и са на английски език.

7. Автореферат

Авторефератът съответства на представените в дисертацията резултати и изводи. Оформен е съгласно изискванията.

8. Препоръки за бъдещо използване на дисертационните приноси и резултати

Научната стойност на дисертационния труд насочва вниманието към продължаване на работата по технологията за производство на ДХ при пипер с нашите ценни селекционни генотипи до пълното ѝ внедряване. Необходимо е създаване на ДХ при ценните линии или сортове в практиката. Тази необходимост се подсилва от продължителното създаване по традиционен път на хомогенни селекционни линии.

В света почти всички продавани семена от пипер са хибридни. Останаха много малко страни, като България, където продължават да се създават директни сортове. От друга страна България има традиционно лидерство в Европа и света с ценната генетична плазма от пипер за полско производство, колекционирана от много десетки години. Опазването ѝ е икономически приоритет в съвременното ни земеделие, в което сме поставени в условия на конкурентна борба за пазари, наравно с високо технологичните страни. Създаването на ДХ би било добра основа за преразглеждане на приоритетите в селекцията на пипера.

Постиженията в тази дисертация са дело на докторанта, положил усилия за разработването на тази трудна тема. В края на 2015 год. Н. Аначков получи възможността за стипендия в Ядрения център в Сарайкьой, Турция, за да приложи облъчването с гама-лъчи като стресов фактор. Изключително добри са отзивите за него от супервайзора на Н. Аначков в Турция за компетентността, която е показал по време на специализацията си. Д-р Йапрак Кантоглу е изразила мнение, че Николай Аначков е перспективен бъдещ учен, показал задълбоченост и упоритост.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В дисертационния труд целите и задачите са изпълнени. Постигнатите научни и научно-приложни резултати представляват оригинален и значим принос в науката и отговарят на всички изисквани критерии според Закона за развитие на академичния състав в

Република България (ЗРАСРБ), Правилника за прилагане на ЗРАСБ и съответния Правилник на Пловдивски университет. Представените материали и резултати в дисертацията напълно съответстват на специфичните изисквания на Биологическия факултет за приложение на ЗРАСРБ.

Дисертационният труд доказва, че докторантът Николай Аначков притежава знания, експериментален опит и професионални качества за целенасочено и самостоятелно провеждане на научни изследвания на високо теоретично ниво. Напълно подкрепям кандидатурата на Николай Аначков да получи научната и образователна докторска степен в посочената област.

Въз основа на гореизложеното, като член на научното жури убедено давам своята *положителна оценка* за проведеното изследване, представено от дисертационен труд, автореферат, постигнати резултати и приноси и *предлагам на почитаемото научно жури да присъди образователната и научна степен „доктор“* на Николай Аначков в област на висше образование: 4. Природни науки, математика и информатика, научна специалност: Молекулярна биология.

12.06.2017 год.

Изготвил рецензията:

/проф. д-р Нася Томлева/