

РЕЦЕНЗИЯ

от акад. проф. Иван Георгиев Иванов, дбн
на дисертационния труд на Здравка Петрова Иванова „Секвениране и аотиране на хлоропластния геном на *Haberlea rhodopensis* Friv.” представен за присъждане на образователната и научна степен „Доктор” в Област на висшето образование 4. Природни науки, математика и информатика, професионално направление 4.3. Биологични науки, докторантска програма Молекулярна биология

Научни ръководители: Доц. д-р Веселин Баев и гл. ас. д-р Евелина Даскалова

1. Общо описание на представените материали

Представеният във връзка със защитата комплект материали на хартиен и електронен носител е в съответствие с Чл. 36 (1) от Правилника за развитие на академичния състав на ПУ и включва:

- Молба до Ректора на ПУ за разкриване на процедура за защита
- Автобиография в европейски формат
- Копие от диплома за висше образование (ОКС „магистър”)
- Заповед за зачисляване в докторантура
- Заповед за провеждане на изпит по специалността и протокол от изпита
- Протоколи от катедрени съвети свързани с процедурата
- Дисертационен труд (съдържащ 116 страници, 40 фигури, 14 таблици и 136 литературни източници)
- Автореферат на дисертационния труд (обхващащ 31 страници)
- Списък и копия от научните публикации свързани с дисертацията
- Декларация за оригиналност на получените резултати

2. Кратки биографични данни за докторанта

Здравка Петрова Иванова е възпитаник на Техническия университет - Пловдив, откъдето през 1999 г. придобива магистърска степен по специалността „Компютърни системи”. След дипломирането си постъпва на работа като програмист и системен администратор в Техническия колеж „Джон Атанасов“ в гр. Пловдив, а впоследствие и като главен експерт по компютърни системи и информационни технологии при Аграрния университет – Пловдив. От 2013 г. е редовен докторант по „Молекулярна биология” при катедра „Физиология на растенията и молекулярна биология” в БФ на ПУ „П. Хилендарски“.

3. Актуалност на тематиката и целесъобразност на поставените цели и задачи

Рецензираният дисертационен труд е посветен на изучаването на хлоропластния геном на ендемичния за Балканския полуостров рядък растителен вид *Haberlea rhodopensis*, известен с това, че оцелява при пълно засушаване, изпадайки в анабиоза и се възстановява след рехидратация. Тъй като способността на *Haberlea* да „възкръсва“ се дължи на стабилността на нейния фотосинтетичен апарат при екстремални условия,

докторантката си поставя за задача да секвенира (чрез NGS), асемблира и аотира хлоропластния геном и да го сравни с пластидните геноми на други близкородствени видове. Като се има предвид, че засушаването е световен проблем, а изследването на молекулните механизми свързани с устойчивостта на растенията към засушаване ще доведе до намиране на подходи за създаване на сухоустойчиви растителни видове, то актуалността на дисертационна тема е извън всякакво съмнение.

4. Познание на проблема

Литературният обзор обхваща около 40 страници и се позовава на 136 литературни източници. Той е съставен от няколко подраздела, посветени съответно на особеностите в структурата и организацията на хлоропластните геноми; описание на възкръсващите растения и в частност на *Haberlea rhodopensis*; приложение на масовото паралелно секвениране (NGS) за анализ на цели геноми (включително малки); алгоритми за асемблиране на данни от NGS; асемблатори и оценка на асемблирането. Литературните данни са разгледани критично, благодарение на което докторантката е съумяла да определи своята изследователска ниша и да формулира целите и задачите на своята дисертация.

5. Методика на изследването

Методичният раздел (16 страници) включва подробно описание на методите, основната част от които са биоинформатични. Тази поляризация не е случайна, като се има предвид, че секвенирането от ново поколение е напълно автоматизирано и в техническо отношение е сравнително лесно за изпълнение, но обработка на първичните данни и извличането на съдържащата се в тях биологична информация изисква задълбочени познания по биоинформатика. Днес пазарът разполага с богато разнообразие от биоинформатични продукти, но те не са универсални и получените резултати често зависят от особеностите на изследвания обект. Понеже пластидният геном има своя специфика, докторантката е трябвало да сравнява различни програмни пакети, за да избере най-надеждните за нейния конкретен случай. Така за оценка на качеството на данните от секвенирането тя прилага FastQC; за alignment – BWA и SAM tools; за удължаване на секвенциите - FLASH; за асемблиране – AbySS, Edena и SPAdes; за генериране на скафолди – SSPACE; за оценка на асемблирането – QUAST; за генериране на първичния геном – ABACAS и MUMmer; за запълване на празнините – GapFiller; за анотация - DOGMA и Geneious; за генериране на изображения и графики – OGDRAW, BRIG и mVISTA; за други анализи - MISA, REPuter и Ka/Ks calculator.

6. Характеристика и оценка на дисертационния труд

Резултатите от изследванията свързани с дисертацията са представени на 35 страници в раздел „Резултати и обсъждане“, който е илюстриран с 40 фигури и 13 таблици. Логиката и последователността на проведените изследвания следват тази на предварително поставените цели и задачи. Те започват със секвениране на хлоропластната ДНК прилагайки paired-end стратегия, която позволява да се получат секвенции с дължина ~170bp и да се повиши качеството на получените данни до Q65-Q70. Суровите данни от секвенирането са обработени с помощта на софтуерния пакет FastQC pre-processing, след което е осъществено асемблиране. С цел да подбере най-добрия софтуер, докторантката провежда тестовото асемблиране на хлоропластни секвенции със софтуерните пакети

Edena, SPAdes и AbySS. От тях е избран AbySS, с който са генерирани 123 контига с параметри N50 = 8 354 и най-дълъг контиг = 14 595 bp. Фрагментацията на асемблирането е премахната с GapFiller и така е получена циклична псевдомолекула с дължина 153 099 bp. Следващата стъпка към охарактеризирането на хлоропластния геном на *H. rhodopensis* е аотирането и определяне на генното съдържание. Разкрити са 137 гена, от които 86 - протеин-кодиращи, 8 - рРНК (4 основни, 4 повтарящи се) , 36 тРНК (29 основни и 7 повтарящи се) и 4 псевдогена.

Въз основа на получените резултати, З. Иванова провежда сравнителен анализ на пластома на *H. rhodopensis*, съпоставяйки го с пластидните геноми на други близкородствени видове. Най-големи разлики са намерени в кодиращите части на генома и по-конкретно при гените *ycf1*, *ndhF*, *accD*, *ccsA*, *rbcL*, *ycf2* и *rps19*. Два от тях - *psbI* и *rps12* (функционални в *H. rhodopensis*) са открити като псевдогени в близкородствения вид *Boea hygrometrica*.

Проведен е и анализ за прости повтори (SSR) с помощта на програмата MISA. По този начин са намерени общо 71 SSR с 10 типа повтарящи се мотиви, от които динуклеотидите AG/CT и AT/TA са с най-висока честота на повтаряне. Идентифицирани са и 18 прави и 22 палиндромни повтора с дължина 30 - 59 bp, от които 40% са локализирани в интергенното пространство, а 60% - в гените или граничните области.

Докторантката изследва и кодоновата употреба в пластидния геном на *H. rhodopensis*, като открива най-висока консервативност при гените *atpH*, *psaA*, *psaB*, *psaC*, *psbA*, *psbE*, *psbF*, *spbH*, *spbL*, *psbM*, *psbN*, *petG*, *petL* и *infA* и най-висока изменчивост при *rps12* и *rpl23*. Тя счита, че тези особености на протеин-кодиращите гени може да имат отношение към толеранса на *H. rhodopensis* към засушаване.

Заслужават внимание еволюционните изследвания базирани на първичната структура на пластидния геном на *H. rhodopensis*. Те включват анализ за синонимни и несинонимни замени (Ka/Ks анализ) в кодиращата част на генома, както и филогенетичен анализ. При Ka/Ks анализа докторантката е водена от определението на Kimura, съгласно който съотношението Ka/Ks <1 е индикативно за пречистваща селекция, Ka/Ks >1 - за позитивен отбор, а Ka/Ks = 1 - за неутрална селекция. Сравнявайки хлоропластия геном на *H. rhodopensis* с геномите на *B. hygrometrica*, *S. indicum*, *S. Miltiorrhiza* и *Coffea arabica*, тя установява, че съотношението Ka/Ks при *H. rhodopensis* за 72 протеин-кодиращи гена за 5 генома (Ka/Ks = 0.2139) не е регион-специфично, а ген-специфично. За два от гените обаче (*rps12* и *rpl23*, определящи структурата на хлоропластната рибозома) Ka/Ks >1, което е индикатор за позитивен отбор. Тъй като стойностите на Ka/Ks за повечето гени са в границите на 0.02 - 0.49, е направен извода, че повечето гени в хлоропластния геном на *H. rhodopensis* са подложени на пречистващ отбор.

За целите на филогенетичния анализ пластидният геном на *H. rhodopensis* е сравнен (sequence alignment) с геномите на 32 други растителни вида. На базата на 35 подбрани протеин-кодиращи и РНК гени е построено филогенетично дърво чрез програмата IQTree. То илюстрира еволюционните взаимоотношения между сравняваните геноми, но не е коментирано в дисертацията.

Като цяло, резултатите свързани с дисертационния труд са отлично документирани и добре интерпретирани в светлината на литературните данни, което показва уменията на докторантката да борави творчески с литературните източници и да оценява обективно своя собствен принос в разработваната научна област.

7. Приноси и значимост на разработката за науката и практиката

Дисертационният труд на Здравка Иванова има подчертан приносен характер за растителната молекулярна генетика. Тя осъществява за първи път секвениране на хлоропластния геном на ендемичното възкръстващо растение *Haberlea rhodopensis* и определя неговия генен състав и молекулярна организация. Депозирайки получените ДНК секвенции в NCBI, тя обогатява световната ДНК база данни, като по този начин предоставя възможност и на други изследователи да ги използват в бъдещи изследвания.

На този етап изследванията на З. Иванова имат фундаментален характер, но в тях е заложена и перспективата за приложност. С голяма вероятност може да се допусне, че уникалната способност на *H. rhodopensis* да съхранява интактен своя фотосинтетичен апарат е свързана с особеностите на структурата на пластисния геном и в частност на някои от съдържащите се в него гени. Когато тази връзка се докаже и гените бъдат идентифицирани, това ще разкрие нови възможности за създаване на сухоустойчиви сортове културни растения.

8. Преценка на публикациите по дисертационния труд

Резултатите от дисертационния труд на З. Иванова са включени в **2 научни статии** в реферирани списания, от които едната е публикувана в реномираното международно списание **Frontiers in Plant Science** с **ИФ = 4.495**, а другата е под печат в списанието на ПУ „П. Хилендарски“ **Journal of BioScience and Biotechnologies**. И в двете статии докторантката е водещ автор.

9. Лично участие на докторанта

Водещото място на З. Иванова в авторския колектив на публикуваните статии е атестат за водещата ѝ роля при осъществяване на проведените изследвания.

10. Автореферат

Запознат съм с проекта за автореферат и намирам, че той отразява адекватно съдържанието и постиженията на дисертацията.

11. Критични бележки и препоръки

Дисертационният труд на З. Иванова е написан на ясен и точен научен език и по отношение на стила, и оформянето на труда нямам забележки по същество. В литературния обзор обаче откривам някои пропуски: 1) При представянето на методите за секвениране на ДНК на стр. 31, не е упоменат пирофосфатния метод, по който вече са секвенирани стотици геноми, включително и този на Джеймс Уотсън; 2) В списъка на цитираната литература не открих нито една статия от колектива на проф. Д. Джилянов (АБИ-София), докато Google Scholar показва десетки негови статии посветени на молекулярната биология и молекулярната генетика на *H. rodopensis*, при това широко цитирани в световната литература.

Към докторантката имам и един въпрос: Трябва ли да считаме първичната структура на хлоропластната ДНК на *Haberlea rodopensis* за окончателно доказана или тя трябва да бъде верифицирана и чрез други секвенционни методи?

12. Препоръки за бъдещо използване на дисертационните приноси и резултати

Препоръчвам на докторантката да продължи своите изследвания върху възкръстващото растение *Haberlea rhodopensis*, като обхване и ядрения геном.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Редовният докторант Здравка Иванова осъществява за първи път пълно геномно секвениране на пластидния геном на ендемичното възкръсващо растение *Haberlea rhodopensis*. Изследванията са проведени с помощта на най модерната секвенционна техника (NGS) и най-добрата биоинформатична методология за асемблиране, аотиране и установяване на генния състав на генома. Част от резултатите са публикувани във водещото списание в областта на растителната биология - **Frontiers in Plant Science** с ИФ = **4.495**. Със своите научни постижения докторантката се представя като зрял и перспективен изследовател, който напълно удовлетворява изискванията на Закона за развитие на академичния състав в Република България, Правилника за неговото прилагане и вътрешния Правилник на ПУ „Паисий Хилендарски“ за придобиване на ОНС „Доктор“. Всичко това ми дава основание **убедено да препоръчам** на уважаемото научно жури да **присъди на З. Иванова образователната и научна степен „Доктор“** по научната специалност „*Молекулярна биология*“.

19.06.2017 г.

Рецензент:

/Акад. Иван Г. Иванов/