

РЕЦЕНЗИЯ

от проф. дсн Росица Борисова Бъчварова

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. Биологични науки

докторска програма: Молекулярна биология

Автор: Ина Димитрова Кирилова

Тема: Търсене на ключови гени, регулиращи ранните етапи на взаимодействие на растения - гостоприемници с паразитни растения от сем. *Orobanchaceae* (Воловодецови)

Научен ръководител: проф. д-р Илия Денев

1. Общо описание на представените материали

Със заповед № Р33-4365 от 23.07.2019 г. на Ректора на Пловдивския университет „Паисий Хилендарски“ (ПУ) съм определена за член на научното жури за осигуряване на процедура за защита на дисертационен труд на тема „**Търсене на ключови гени, регулиращи ранните етапи на взаимодействие на растения - гостоприемници с паразитни растения от сем. *Orobanchaceae* (Воловодецови)**” за придобиване на образователната и научна степен ‘доктор’ в област на висше образование 4.Природни науки, математика и информатика, професионално направление 4.3. Биологични науки, докторска програма Молекулярна биология.

Автор на дисертационния труд е **Ина Димитрова Кирилова** – докторантка в редовна форма на обучение към катедра "Физиология на растенията и Молекулярна биология" с научен ръководител проф. д-р Илия Денев от ПУ „П. Хилендарски” гр. Пловдив.

Представеният от докторантката комплект материали на хартиен носител е в съответствие с Чл.36 (1) от Правилника за развитие на академичния състав на ПУ и включва пълен набор от необходимите документи за законосъобразно протичане на защитата.

2. Кратки биографични данни за докторанта

Докторантката Ина Кирилова е родена на 07.04.1988 г. в гр. Шумен.

През 2007 г. е приета за редовна студентка в ПУ „П. Хилендарски”, бакалавърска програма „Молекулярна биология”. През 2008 г. започва кръжочна работа в научноизследователската група на проф. д-р Илия Денев, като разработката ѝ прераства в дипломна работа, касаеща молекулярна таксономия и механизми на взаимодействие на паразитни растения от сем. Воловодецови (*Orobanchaceae*) с растения гостоприемници.

Дипломната работа е защитена с отличен успех през юли 2011 г. и през същата година Ина Кирилова записва магистратура по магистърска програма „Медицинска биология”. През 2012 г. завършва с отличие магистратурата.

През периода 10.04. 2011 г. до 31.12.2013 г. е назначена на временен трудов договор като специалист и участва в проектите на проф. И. Денев.

От март 2014 г. започва работа като редовен докторант в кат. „Физиология на растенията и молекулярна биология”.

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

Устойчивостта на растенията към болести и паразити представлява изключително сериозен проблем. В основата ѝ стоят сложни взаимоотношения между растението гостоприемник и паразитното растение. В процеса на еволюцията растителните организми формират сложни защитно-възстановителни системи срещу различни патогени. Проучването им е от важно значение за повишаване устойчивостта към болести и неприятели и внедряване в производството на висококачествени и с комплексна устойчивост сортове културни растения.

Паразитните растения от сем. *Orobanchaceae* нападат повече от 73 милиона хектара площи с културни растения и решаването на сложния проблем е предизвикателство пред учените.

Проучванията за изясняване механизмите на взаимодействие в системата паразит-гостоприемник и разработване на ефикасни методи за борба със синята китка, в това число и създаване на устойчиви сортове от селскостопанските култури са изключително актуални.

Поставената цел на дисертационния труд е да се направи молекулярно-генетичен анализ на мутантни генотипове *Arabidopsis thaliana*, съдържащи pSKI015 T-ДНК инсърти с

устойчивост към паразитни растения от групата на синята китка (*Phelipanche ramosa*/ и *P. mutelii*). За постигането на тази цел са формулирани пет задачи, които включват:

- Изпитване за устойчивост към синя китка на мутанти от *Arabidopsis thaliana* и отбор на устойчиви растения.
- Анализ на отбраните растения за продуциране на стимуланти за покълване
- Изолиране на хромозомна ДНК и на иРНК от устойчивите на синя китка линии
- Определяне на броя на Т-ДНК инсъртите в устойчивите линии чрез Southern blot
- Провеждане на TAIL – PCR, RT-PCR, qRT-PCR и Differential display анализи за идентифициране на повлияните гени

4. Познаване на проблема

В литературния обзор на дисертационния труд са цитирани литературни източници от 1890 г. (Beck Von Managetta, G.R., 1890) до 2019 г., като голяма част от тях са публикувани през последните 10-15 години.

Направеният литературен преглед от докторантката показва, че тя е много доре запозната с проблема и може да реализира поставените задачи.

5. Методика на изследването

Избраните методи на изследване позволяват постигане на поставената цел и получаване на адекватен отговор на задачите, които са поставени за решаване в дисертационния труд. Основните дейности по дисертацията свързани със скринирането на колекцията CS 31000 в опаразитена със *P. ramosa* почва, които са проведени в оранжерията на кат. „Физиология на растенията и Молекулярна биология” към ПУ „П. Хилендарски” и в оранжерите на СГЦ, София.

Молекулярно таксоничните изследвания за видовата принадлежност на семената от синя китка да проведени в лабораториите на Проф. Антония Пухеадас и д-р Бегония Перес, Кордоба, Испания, по време на две от специализациите на докторантката през 2012 и 2013 г.

Основните изследвания касаещи транскриптомните анализи са проведени в лабораторията на проф. James Westwood, лаборатория по молекулярна фитопатология, Virginia Polytechnic Institute and State University, Blacksburg, VA, USA.

6. Характеристика и оценка на дисертационния труд

Дисертационният труд е оформен по възприетия в България класически модел на 116 страници и включва 27 фигури, 5 таблици и 219 цитирани литературни източника (207 английски, 7 на руски и 5 на български).

Структурата на дисертацията е добре балансирана, като литературният обзор е 24 стр., материали и методи – 19 стр.(много подробно описани), резултати и обсъждане – 43 стр., изводи - 1 стр.

Литературният обзор включва разпространение и екология на видовете от сем. *Orobanchaceae*, жизнен цикъл, систематика, таксономия, взаимодействие паразит/гостоприемник и молекулярно таксономични изследвания.

Докторантката успешно се е справила с усвояването на необходимите за целта на дисертационния труд методи на изследване: изолиране на ДНК от синя китка и арабидопсис, PCR амплификации, екстракция на PCR фрагменти от гел, Southern blot хибридизация, изолиране на РНК от устойчиви линии с идентифицирани места на Т-ДНК конструктите и контрола от див тип Col-0, количествен RT-PCR и Differential display.

Получените данни от секвенирането са подложени на биоинформатичен анализ по алгоритмите Maximum likelihood и Neighbor joining с прилагане на молекулен часовник посредством софтуер MEGA 7.

Дискусията, направена от докторантката показва едно задълбочено познаване на проблематиката и получените резултати от разработката отговарят на поставената цел и задачи, като правилно са обобщени в 6 извода.

7. Приноси и значимост на разработката за науката и практиката

Основните приноси на дисертационния труд са:

- Събрани са 34 образци от паразитните видове *P. mutelli* и *P. ramosa*. Доказано е с молекулярни маркери, че при видове *P. mutelli* няма сходни с тези, обитаващи останалите европейски държави.
- Скринирани са 62 000 активационни мутанти на *Arabidopsis thaliana* L. за устойчивост към синя китка. Доказано е, че в генома на мутанти от *Arabidopsis thaliana* L. присъстват гени, които определят устойчивост срещу *P. Ramosa*. Установени са 32 единични локации на Т-ДНК инсърти, които имат връзка с устойчивостта на гостоприемника към паразита.
- Установена е промяна в експресията и продуцирането на стимуланти за покълване при седем мутантни линии *Arabidopsis thaliana* L. чрез биохимичен и експресионен анализ, като при три от тях тя е свързана с активиране на ядрено кодираната, хлоропластно локализирана E-beta-caryophyllene синтаза, която участва в биотинтетичния път на изопреноидите.

- Идентифицирани са и активационни мутанти на ядрено кодирана, хлоропластно базирана терпеноид циклаза, която също участва в хлоропластния биосинтетичен път на терпеноидите. Наличието на повишено количество стиголатони е доказано и чрез HPLC-MS.
- Селектирани са четири линии, които проявяват устойчивост без промяна в продукцията на СП, при които е активиран генът, кодиращ цитохром P450 монооксигеназа. Това е един от ензимите на брасиностероидната биосинтеза – ензим активиращ се при процеси свързани с клетъчната диференциация и защита от стрес, което води до повишаване устойчивостта на *Arabidopsis* към опаразитяване с *P. ramosa*.
- В други от линиите, който регулира формирането на кореновата гугла и клетъчната диференциация. Мутанти в които този ген не се експресира са невъзприемчиви към опаразитяване.
- Установено е, че при включване на T-ДНК в секвенцията на Auxin Response Factor 16 (регулиращ формирането на кореновата гугла и клетъчната диференциация) и блокирането му води до устойчивост на мутанти от *Arabidopsis* към синя китка.

Всички горепосочени приноси с научен и научноприложен характер могат да се използват като стратегия за проучване и търсене на гени за устойчивост към паразитни растения при важни селскостопански култури.

1. Преценка на публикациите по дисертационния труд

Докторантката е публикувала две научни статии, свързани с резултати от разработения дисертационен труд. И двете публикации са в списание с IF - *Biotechnology & Biotechnological Equipment* (2014 и 2019 г.).

Освен това тя е съавтор в 5 други научни публикации и 3 доклада на международни научни конференции.

9. Лично участие на докторантката

Получените резултати са лично дело на докторантката, на база на които много точно са формулирани изводите и приносите в дисертационния труд.

10. Автореферат

Авторефератът напълно отразява основните резултати, изводи и приноси отразени в дисертацията.

11. Критични забележки и препоръки

В текста на дисертационния труд са допуснати някои технически грешки като:

- СП – означава „стимуланти за покълване”(germination stimulants), а не “стимуланти за прорастване”

- липсват стойностите за кълняемост на семената от синя китка на фиг. 8

- на фигури с електрофорези на различни продукти липсват размерите на фрагментите от маркерите, което не дава представа за големината на получените РНК, ДНК и PCR продукти.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Дисертационният труд съдържа научни и научно-приложни резултати, които представляват оригинален принос в науката и отговарят на всички изисквания на Закона за развитие на академичния състав в Република България, Правилника за прилагане на ЗРАСРБ и Правилника на ПУ „Паисий Хилендарски“. Представените материали и дисертационни резултати съответстват на специфичните изисквания на Факултета по биология, приети във връзка с Правилника на ПУ за приложение на ЗРАСРБ.

Дисертационният труд показва, че докторантката Ина Димитрова Кирилова притежава задълбочени теоретични знания и професионални умения по научна специалност Молекулярна биология като демонстрира качества и умения за самостоятелно провеждане на научно изследване.

Поради гореизложеното, убедено давам своята положителна оценка за проведеното изследване, представено в рецензираните по-горе дисертационен труд, автореферат, постигнати резултати и приноси, и предлагам на почитаемото научно жури да присъди образователната и научна степен „доктор” на Ина Димитрова Кирилова в област на висше образование: 4.Природни науки, математика и информатика; Професионално направление: 4.3 Биологически науки, докторска програма: Молекулярна биология,.

20. 08. 2019 г.

Рецензент:

проф. дсн Росица Борисова Бъчварова