

РЕЦЕНЗИЯ

от проф. д-р Иван Илиев Атанасов, Агробиоинститут – ССА, 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, докторска програма Молекулярна биология, с автор: Ина Димитрова Кирилова, редовен докторант в Катедра „Физиология на растенията и молекулярна биология”, Биологически факултет, ПУ „Паисий Хилендарски”, тема „Търсене на ключови гени, регулиращи ранните етапи на взаимодействие на растения - гостоприемници с паразитни растения от сем. *Orobanchaceae* (Воловодецови)” и научен ръководител проф. д-р Илия Димитров Денев, Биологически факултет, ПУ „Паисий Хилендарски”

1. Общо описание на представените материали

Със заповед № Р33-4365 от 23.07.2019 г. на Ректора на Пловдивския университет „Паисий Хилендарски” (ПУ) съм определен за член на научното жури по 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. Биологически 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 Димитров Денев от Биологически факултет на ПУ „Паисий Хилендарски”.

Представеният от Ина Димитрова Кирилова комплект материали по процедурата за защита 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 процедурата за защита на дисертационен труд; автобиография в европейски формат; нотариално заверено копие от диплома за ОКС магистър; заповед за записване в докторантура; заповед за провеждане на изпит от индивидуалния план и съответен протокол за издържан с отличен успех изпит по специалността; протоколи от катедрени съвети, свързани с докладване на готовност за откриване на процедурата и с предварително обсъждане на дисертационния труд; дисертационен труд; автореферат; списък на научните публикации по темата на дисертацията; копия на научните пуб-

ликации; декларация за оригиналност и достоверност на приложените документи; и справка за спазване на изискванията на Биологически факултет на ПУ „Паисий Хилендарски”. Представените документи във връзка със защитата показват, че процедурата по зачисляване, обучение и отчисляване е спазена и документацията е изготвена съгласно изискванията на ЗРАСРБ и Правилника за неговото приложение.

2. Кратки биографични данни за докторанта

Ина Димитрова Кирилова е родена на 07.04.1988 г. в гр. Шумен, където завършва средното си образование. През 2011 г. завършва бакалавърската програма „Молекулярна биология” в Биологически факултет на ПУ „П. Хилендарски”, а през 2012 г. завършва с отличие магистърската програма „Медицинска биология” и придобива диплома за Магистър от ПУ „П. Хилендарски”. През периода на обучение в бакалавърската програма Ина Кирилова започва кръжочна работа в научноизследователската група на проф. д-р Илия Денев и получените резултати относно молекулярната таксономия и механизмите на взаимодействие на сини китки от сем. Воловодецови (*Orobanchaceae*) с растенията гостоприемници са включени в дипломна работа, защитена отлично през 2011 г. През периода 2011 - 2013 г. работи като специалист „молекулярен биолог” на временен трудов договор по проекти на проф. И. Денев. От март 2014 г. Ина Кирилова е зачислена като редовен докторант в катедра „Физиология на растенията и молекулярна биология”, Биологически факултет на ПУ „П. Хилендарски” с научен ръководител проф. д-р Илия Денев. През периода на обучение в ПУ „П. Хилендарски” Ина Кирилова провежда общо три успешни специализации свързани с приложения на молекулярно-генетични методи в изследвания на паразитни растения: една в САЩ – в Лаборатория по молекулярна фитопатология на prof. James Westwood, Virginia Polytechnic Institute and State University, Blacksburg, VA и две в Испания – в лабораториите на проф. Антония Пухеадас и д-р Бегония Перес, University of Cordoba, Cordoba. Част от резултатите получени в рамките на специализациите са включени в дисертационния труд.

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

Паразитните растения от родовете *Orobanche* и *Striga* и причиняват ежегодно огромни щети на селското стопанство на редица страни по света, вкл. страните от Средиземноморието, Югоизточна Европа, Средния Изток и Северна Африка. В България голямо разпространение имат няколко вида синя китка, паразити от рода *Orobanche*, които паразитират върху широк кръг от отглежданите културни видове растения и причиняват сериозни икономически загуби. Редица характеристики на видовете от сем. *Orobanchaceae* (формиране на голям брой семена които запазват кълняемостта си за продължителен период и др.) и високата степен на замър-

сяване на обработваемите площи правят борбата със синята китка изключително трудна и все още недостатъчно ефективна. От друга страна все още няма достатъчно информация и разбиране на механизмите на взаимодействие между тези паразитни растения и растенията гостоприемници. Всичко това обуславя големия брой научни и научно-приложни изследвания, провеждани през последните години в редица страни и лаборатории, върху механизми и молекулярна генетика на взаимодействията в системата паразит-гостоприемник и опитите за използване на получените резултати за разработване на по-ефективни методи за борба със синята китка и/или създаване на нови линии и сортове културни растения с висока устойчивост към тези паразитни растения. Всичко това показва, че тематиката и включените в дисертационната работа изследвания са актуални, насочени към важни стопански проблеми и с очакван значим принос към молекулярната генетика на взаимодействието паразит-растение гостоприемник.

4. Познаване на проблема

Представеният цялостен дисертационен труд и отделните части от него ясно демонстрират и свидетелстват, че Ина Кирилова е запозната задълбочено и в детайли с проблемите и публикуваните досега експериментални резултати от изследвания върху синята китка / паразити от рода *Orobanchae*, както и взаимодействията в системата паразит – растение гостоприемник като цяло. Литературният обзор на дисертационния труд включва добре структурирана, значителна и в необходимия обем информация относно: 1. Ботаническото разнообразие и гостоприемници на синята китка; 2. Разпространение на стопанско значимите видове синя китка; 3. Систематика и таксономия на сем. *Orobanchaceae*; 4. Представи за произход и еволюция на паразитните представители на сем. *Orobanchaceae*; 5. Жизнен цикъл на синята китка и взаимодействие паразит/гостоприемник; както и 6. *Arabidopsis thaliana*, като моделна система за изследване на *Orobanchaceae*. В обзора са включени и две допълнителни глави (7. Механизъм на агробактериалната трансформация и 8. Устройство на pSKI015) отнасящи се и пряко свързани с използваните експериментални подходи и методи. Литературният обзор включва общо 220 литературни източника от които 209 на английски, 7 на руски и 5 на български. Значителна част от литературните източници са научни публикации по теми на обзора от последните 2-3 година, но също има посочени и ,класически‘ публикации свързани с ключови ранни изследвания върху синята китка и паразитните растения. Посоченото демонстрира отлично познаване от страна на докторантката на многостранната и комплексна проблематика свързана с дисертационния труд.

5. Методика на изследването

Раздел „Материали и методи“ включва детайлно представен широк набор от разнообразни съвременни експериментални методи ползвани в дисертационната работа вкл.: тестове за жизненост и покълване на семена от синя китка; анализ на нуклеотидни последователности и молекулярна таксономия; PCR анализ на трансгенни растения и приложения на TAIL-PCR за амплифициране и характеризиране на геномни участъци прилежащи към дясната граница на T-ДНК инсърти, нерадиоактивен Southern блот анализ на трансгенни растения; количествен RT-PCR и differential display. Разглеждайки методичната част на дисертационния труд специално внимание трябва да бъде обърнато на правилния и много ефективен избор на основен експериментален подход за идентифициране на гени свързани с реакцията / толерантността на *Arabidopsis* към опаразитяване със синя китка, включващ скриниране на голяма колекция от активационни мутанти *Arabidopsis*, подбор и следващо характеризиране на индивидуални мутантни линии устойчиви срещу опаразитяване със синя китка. Отчитайки трудностите свързани коректната оценка на реакцията на индивидуалните растения към опаразитяване със синя китка докторантката и научния ръководител на дисертационната работа, проф. И. Денев, заслужават поздравления за успешното систематично скриниране на огромна по обем колекция (62 000 броя) активационни мутантни линии, което е ключов етап за успешното реализиране на включените в дисертационната работа изследвания и постигане на поставените цели. Като цяло дисертационната работа показва, че докторанта успешно ползва и прилага широк набор от специализирани експериментални методи за реализиране на комплексни изследвания в областта на растителната молекулярна биология и генетика.

6. Характеристика и оценка на дисертационния труд

Дисертационният труд е представен в общоприетия класически стил върху 116 страници разпределени като Увод (2 стр.), Литературен обзор с включени в края на раздела цел и задачи на дисертационната работа (24 стр.), Материали и методи (19 стр.), Резултати и обсъждане (43 стр.), Изводи (1 стр.), Списък на публикации свързани с дисертацията (2 стр.), Научни приноси (1 стр.), и Литература (18 стр.). Дисертационния труд включва общо 27 фигури и 6 таблици.

Уводът успешно запознава с комплексния характер на проблемите и изследванията свързани с паразитните растения и взаимодействието паразит-гостоприемник, и въвежда в тема на дисертационната работа.

Литературният обзор представя стегнато голяма по обем и много комплексна информация и литературни данни по всички основни теми свързани с дисертационната работа.

Целта и задачите на дисертационната работа са представени в края на раздела „Литературен обзор“ на дисертационния труд (и като отделен раздел в автореферата). По мое мнение целта на дисертационната работа може да бъде по-добре формулирана като се постави фокуса върху идентифицирането на гени свързани с толерантността и реакцията на растения *Arabidopsis* към опаразитяване със синя китка, вместо на преден план да се посочва експерименталния подход за това („молекулярно-генетичен анализ на мутантни генотипове *Arabidopsis*...“). Подобно на целта, задачите свързани с постигане на поставената цел са формулирани с акцент върху експерименталната работа която трябва да бъде извършена и/или основните експериментални методи които ще бъдат използвани. Посочените задачи не включват отделна задача за събиране, анализ на жизнеността и кълняемостта и молекулярно генетично определяне на видовата принадлежност на семената от синя китка, въпреки че тези дейности са важни за успеха на дисертационната работа и резултати от тези дейности са представени в първите два под-раздела на „Резултати и обсъждане“. Представянето на поставените задачи е в логичната им последователност.

В раздела „Материали и методи“ са представени всички експериментални методи ползвани в дисертационната работа. Представянето на отделните методи е в детайли, позволяващи успешното им ползване в други сходни изследвания, както и сочещо отличната методична подготовка на докторантката. Редица от представените и ползвани експериментални методи включват специфични модификации и адаптиране от докторантката и научния ръководител за целите на конкретните изследвания, което сочи личния принос и висока методична подготовка на докторантката. Използваното скриниране на колекция активационни мутантни на *Arabidopsis*, изолирането и повторното тестване на устойчиви на синя китка линии е представено основно в частта „Резултати и обсъждане“, съпроводено със съответната дискусия позволяващо успешното ползването на цялата схема на тестиране и в други сходни изследвания включващи тестове на реакция към синя китка.

Раздела „Резултати и обсъждане“ включва под-раздели с добре обособени отделни групи изследвания. Дискусията на резултатите във всеки под-раздел е разположена веднага след представянето им, което значително улеснява четенето и ползването на дисертационния труд и автореферата. Основните групи изследвания представени в раздела „Резултати и обсъждане“ включват: събиране, анализ на жизнеността и кълняемостта и молекулярно генетично определяне на видовата принадлежност на семената от синя китка (под-раздели: IV.1 и IV.2); скриниране на колекция от активационни мутанти и отбрани индивидуални линии за реакция / устойчивост срещу опаразитяване със синя китка (под-раздели: IV.3, IV.3 и IV.4); молекулярно-генетични анализи на отбрани линии мутантни линии *Arabidopsis* устойчиви срещу

опаразитяване със синя китка, включително идентифициране на местата на включване на Т-ДНК инсъртите което е ключово за успеха на дисертационната работа (под-раздели: IV.6, IV.7 и IV.8) и анализи на генната експресия включващи полуколичествен RT-PCR, количествен real-time PCR и differential display предоставящи допълнителни данни и независимо експериментално потвърждение на участието на гени с повлияна експресия в отбраните мутантни линии в реакцията на *Arabidopsis* при опаразитяване със синя китка (под-раздели: IV.9, IV.10 и IV.11). Като цяло представянето на получените в тези изследвания резултати е детайлно, съпроводено с необходимата аналитична дискусия и представено в логична последователност.

Изводите и приносите на дисертационната работа са представени в два отделни раздела. Раздел ,V.Изводи‘ включва общо 6 извода представящи основни резултати получени в дисертационната работа, основно фокусирани върху идентифицираните гени с повлияна експресия в отбраните мутантни линии и участващи в реакцията на *Arabidopsis* към опаразитяване със синя китка (изводи 3-6). Раздел ,VII.Научни приноси‘ включва общо 7 приноса включително: един потвърдителен (принос 1) относно липса на идентифицирани български представители на вида *P. Mutelli* сходни с такива откривани в други европейските страни; четири оригинални приноса свързани с идентифициране на гени с повлияна експресия обуславящи устойчивост към опаразитяване със синя китка в *Arabidopsis* и анализирани мутантни линии (приноси 2-5); един методичен принос свързан с разработването и успешното използване на нов комплект от праймери за идентифициране местата на инсърция на вектора pSKI015 (принос 6); и един научноприложен принос, че гени повишаващи устойчивостта срещу опаразитяване могат да бъдат търсени и повлияни в генома на ценни селскостопански култури‘. Въпреки че посочените приноси 2-5 донякъде възпроизвеждат изводите 3-6, подкрепям тяхното формулиране в дисертационната работа отчитайки, че те отразяват основни изводи и достижения в нея. Доколкото в дисертационната работа няма представен по-детайлен анализ на присъствието в геномите на културните видове (единични, гени, генни фамилии, брой копия, хомоложност с гени от различни растителни видове и др.) на идентифицираните гени свързани с повишаване на устойчивостта срещу опаразитяване със синя китка, както няма детайлно обсъждане на насоки за реалното използване на получената информация за създаване на линии културни растения устойчиви на синя китка, считам че формулирания научно-приложен принос не е подкрепен от достатъчно конкретни представени данни, информация и дискусия в дисертационната работа. Като цяло считам, че формулираните изводи и приноси (отчитайки коментара по-горе) са адекватни и представят коректно постигнатите резултати в дисертационната работа.

7. Приноси и значимост на разработката за науката и практиката

По мое мнение постигнатите в дисертационната работа резултати представляват значима и ключова стъпка и основа за преминаване към следващ етап на изследвания върху молекулярните механизми на взаимодействието и комплексната реакция на растения-гостоприемници към опаразитяване със синя китка. Заедно с това постигнатите резултати представляват реална основа за следващо практическо приложение и стартиране на молекулярно-генетични изследвания, селекционни и биотехнологични програми за създаване на линии културни растения с повишена толерантност / устойчивост към опаразитяване със синя китка. Посоченото определя много високата научна и научно-приложна значимост на постигнатите в дисертационната работа резултати, както и високите очаквания за успешно продължение на тези изследвания и в двете посоки. Тук е мястото да изкажа поздравления на докторантката Ина Кирилова и научния ръководител проф. Илия Денев за цялостното реализиране на целия набор от изследвания и систематичното и успешно извършване на огромен обем експериментална работа по скриниране и характеризиране на мутантни линии *Arabidopsis* основа за постигнатите положителни резултати, както и да им пожелаем успех в продължаване на тези изследвания.

8. Преценка на публикациите по дисертационния труд

В комплекта документи по процедурата Ина Кирилова е представила списък с общо 7 научни публикации две от които, в издания с импакт фактор и общ IF от 1.53, са пряко свързани с дисертационната работа. Докторантката е първи автор и в двете публикации, потвърждаващо приноса ѝ в представените изследвания и резултати. В рамките на докторантурата е Ина Кирилова участва с доклади в 3 международни конференции на които са представени резултати от дисертационната работа. В допълнение докторантката участва в изпълнението и на общо пет научно-изследователски проекта което съществено допринася за нейната методична подготовка и развитие като млад учен.

9. Лично участие на докторантката

Към дисертационната работа са представени две научни публикации и три участия с доклади на международни конференции, на които докторантката е първи автор. Това заедно с цялостното представяне на получените резултати и дискусиата им в дисертационния труд ясно демонстрират личното участие на докторантката в проведените изследвания, обсъждане на получените резултати и формулиране на представените изводи и приноси.

10. Автореферат

Представеният автореферат отразява в пълнота получените резултати и научните приноси на дисертационната работа и отговаря на изискванията на ЗРАСРБ, Правилника за прилагане на ЗРАСРБ, както и на Правилника на ПУ „Паисий Хилендарски“ и изискванията на Биологическия факултет.

11. Критични забележки и препоръки. Лични впечатления.

Нямам критични бележки и препоръки към представения комплект материали и проведеното изследване като цяло. По мое мнение отделянето на представените цел и задачи в отделен раздел „Цел и задачи“ на дисертационния труд (както е направено в автореферата) би било по-добро ,техническо‘ решение, акцентиращо върху значимостта на поставените цел и задачи и улесняващи запознаването с тях (при ползване на дисертационния труд). Нямам преки лични впечатления от лабораторната работа и научно-изследователската дейност на Ина Кирилова.

12. Препоръки за бъдещо използване на дисертационните приноси и резултати

Получените резултати и основните приноси в дисертационната работа могат и трябва да бъдат използвани като основа за следващ етап на научни изследвания върху молекулярните механизми на взаимодействие и реакция на *Arabidopsis*, моделно растение-гостоприемник към опаразитяване със синя китка, както и за стартиране на дългосрочни програми за създаване на линии културни растения с повишена толерантност / устойчивост към опаразитяване със синя китка. Във връзка с подготовката и иницирането на такива изследвания бих желал да поставя следните въпроси на докторантката свързани с гените (E-beta-caryophyllene синтаза, терпеноид циклаза, цитохром P450 монооксигеназа, Auxin Response Factor 16), идентифицирани в рамките на дисертационната работа:

1. Наблюдавани ли са промени в други фенотипни характеристики на отбраните мутантни линии, вкл. и такива хомозиготни по отношение на Т-ДНК инсърта, и/или има ли в наличната литература информация относно такива специфични фенотипни характеристики (освен наблюдаваните промени в отговора към опаразитяване със синя китка).

2. Има ли в достъпната литература информация относно характеризирани гени при основни култури, ортоложни/ хомоложни на идентифицираните гени.

3. Може ли докторантката да предложи насока(и) за практическо приложение на получените резултати за създаване на линии устойчиви към опаразитяване със синя китка при основни за страната култури.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Считам че предложения за разглеждане дисертационен труд, получените резултати и публикации ясно показват, че **Ина Кирилова е изграден млад учен с задълбочени експериментални умения и теоретични познания в редица области на растителните науки, включително в растителната молекулярна биология и биотехнология. С радост и удовлетворение от представената дисертационна работа ще подкрепя присъждането ѝ на ОНС „доктор“.**

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 (ЗРАСРБ), Правилника за прилагане на ЗРАСРБ и съответния Правилник на ПУ „Паисий Хилендарски“.** Представените материали и дисертационни резултати **напълно** съответстват на специфичните изисквания на Биологическия факултет, 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 от 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 област на висше образование 4. Природни науки, математика и информатика, професионално направление 4.3. Биологически науки, докторска програма Молекулярна биология.**

09.09. 2019 г.

Рецензент:П.....

Проф. дбн Иван Атанасов