

СТАНОВИЩЕ

от д-р Илия Димитров Денев, професор по молекулярна биология към кат. „Физиология на растенията и молекулярна биология” при ПУ „П. Хилендарски”

(н.ст., име, презиме, фамилия – акад. дл. в научна организация)

за дисертационен труд за присъждане на образователната и научна степен „Доктор”

в област на висше образование

професионално направление **4. Природни науки, математика и информатика;**

Професионално направление: 4.3 Биологически 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 Д. Денев, кат. „Физиология на растенията и молекулярна биология” при ПУ „П. Хилендарски

(акад. дл., н. ст., име, презиме, фамилия – научна организация)

1. Общо представяне на процедурата и докторанта

Представеният от Ина Д. Кирилова комплект материали на хартиен носител е в съответствие с Чл.36 (1) от Правилника за развитие на академичния състав на ПУ, включва следните документи:

- молба до Ректора на ПУ за разкриване на процедурата за защита на дисертационен труд;
- автобиография в европейски формат;
- нотариално заверено копие от диплома за висше образование (ОКС ‘магистър’)
- заповеди за записване в докторантура, прекъсване на обучението (поради майчинство) и за продължаване на обучението;
- заповеди за провеждане на изпити от индивидуалния план и съответен протокол за издържани изпити по специалността с успехи 6.00;
- 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 публикации;
- декларация за оригиналност и достоверност на приложените документи;
- справка за спазване на специфичните изисквания на съответния факултет;

Докторантът е приложил 2 броя публикации и удостоверение за участие в международна научна конференция.

Докторантката ИНА ДИМИТРОВА КИРИЛОВА е родена на 07.04.1988 г. в гр. Шумен, където завършва средното си образование. През 2007 г. е приета за редовна студентка в ПУ „П. Хилендарски”, бакалавърска програма „Молекулярна биология”. През 2008 започва кръжочна работа в научноизследователската група на проф. д-р Илия Денев. През 2009 г. тази кръжочната работа прераства с дипломна работа, касаеща молекулярната таксономия и механизмите на взаимодействие на сините китки от сем. Воловодецови (*Orobanchaceae*) с растенията гостоприемници. Дипломната работа е защитена отлично през юли 2011 г. Същата година 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 „Молекулярен биолог” по проектите на проф. И. Денев. В рамките на работата си тя извършва основно проучвания на взаимодействията между *P. gamosa* и арабидопсис.

От март 2014 г. започва работа като редовен докторант в кат. „Физиология на растенията и молекулярна биология” на тема: „Търсене на ключови гени, регулиращи ранните етапи на взаимодействие на растения - гостоприемници с паразитни растения от сем. *Orobanchaceae* (Воловодецови)” с научен ръководител проф. д-р Илия Денев.

Специализирала е три пъти в лабораториите на Проф. Антонио Пухеадас и Др. Бегония Перес, Кордоба, Испания, през 2012 г. 2013 г. и 2014 г. Основните изследвания, касаещи транскриптомните анализи, са проведени по време на специализация в лабораторията на проф. James Westwood, лаборатория по молекулярна фитопатология, Virginia Polytechnic Institute and State University, Blacksburg, VA, USA.

Докторантката има публикувани общо седем научни статии, пет от които са с импакт фактор, а една със SJR. От тях пряко отношение към дисертацията имат две статии, като и двете са с импакт фактор.

Освен това докторантката е участвала в три международни научни конференции, имащи отношение към дисертационния труд и в пет научно изследователски проекта, свързани с темата на дисертацията.

2. Актуалност на тематиката

Растенията от сем. *Orobanchaceae* (синята китка) се облигатни коренови паразити по редица цветни растения. Те са загубили в хода на еволюцията способността си да синтезират

хлорофил и да формират фотосинтетично активни хлоропласти и жизнения им цикъл изцяло зависи от водата, минералните соли и асимилатите, които те извличат от растението госто-приемник. Семейството включва 16 рода с над 200 вида. В България са представени от два рода *Phelipanche* и *Orobanche*. Те обединява около 150 вида сред които са и най-опасните за културните растения паразитни видове: *P. ramosa* (L.); *P. mitelii* (Schultz); *O. minor* (Sm.); *O. cernua* (Loefl.); *O. crenata* (Forsk.) *O. cumana* (Wallr.).

Над 70% от земеделските площи в Южна Европа и Средиземноморието са заразени със семена на тези няколко вида синя китка, които паразитират по слънчоглед, домати, картофи, тютюн, бобови и др. и причиняват огромни икономически загуби. В този смисъл изследванията описани в настоящата дисертация са изключително необходими и актуални.

3. Познаване на проблема

Литературният обзор е с размер 24 стандартни машинописни страници и е базиран на 220 литературни източника от които 209 на английски, 7 на руски и 5 на български. Съдържа следните осем подраздела:

1. Ботаническо 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
6. *Arabidopsis thaliana*, като моделна система за изследване на *Orobanchaceae*
7. Механизъм на агробактериалната трансформация
8. Устройство на pSKI015

Литературните източници обхващат както класически трудове от средата на двадесети век, така и публикации от 2018 и 2019 година. Всичко това говори за добро познаване от страна на докторанта на проблематиката, на която е посветен дисертационния труд.

4. Методика на изследването

Избраните методи за провеждане на научните изследвания са съвременни и много разнообразни. Те варират от класическа таксономия, базирана на морфологията на семената на *P. ramosa* през молекулярна таксономия, forward генетика и транскриптомика. Всичко това е позволило на докторантката да постигне уникални резултати, откриващи нови възможности за борба с кореновите паразити от групата на сем. *Orobanchaceae*.

5. Характеристика и оценка на дисертационния труд и приносите

Дисертационният труд е с общ обем 115 страници и съдържа следните раздели:

1. Увод – две страници; литературен обзор 24 страници, съдържа 3 таблици и шест фигури. Целта е правилно формулирана. За постигането и са поставени пет задачи. Особено

внимание заслужава задача № 3 – „Изолиране на хромозомна ДНК и на иРНК от устойчивите на опаразитяване линии”. Тя е формулирана кратко, но тук не става дума за класическо изолиране на ДНК и РНК по методи, използвани от дипломантите на катедрата. Всяко замърсяване на пробите би имало ефект в по-късен етап на получените резултати. Затова е разработена система за отглеждане на селектираните активационни мутанти в стерилни и стриктно контролируеми условия. Това е особено важно за транскриптомните анализи, защото всеки фитопатоген или животно, което се храни с тъкан от изследваното растение, променя профила на експресия на РНК в устойчиви линии, а за да установим точно кои гени са повлияни от активационния инсърт е нужно да се отстранят всякакви странични фактори и условията да са напълно контролируеми и да позволяват статистически достоверен брой повторения. Подбраните материали и методи са адекватни за постигане на поставените цели и задачи. Използвани са деветнадесет различни метода и подходи за постигане на целта и задачите.

Получените резултати са разделени спрямо етапите на изпълнение на поставените задачи. При описание на резултатите и дискутирането им най-често се използват два алтернативни подхода:

- 1) Първо се описват получените резултати, а след това се обособява отделна глава „Дискусия”
- 2) Може след изпълнението на всяка задача да има дискусия.

Тук е избран нестандартен подход, като дискусиите са непосредствено след резултатите, но без да се отделят като раздел след всеки резултат. Това е направено заради големия брой използвани методи. Извеждането на дискусията като отделен раздел след резултатите би затруднило читателите и журито, защото трябва постоянно да се връщат назад към резултатите. От друга страна, отделянето на дискусията като отделни точки в резултатите би фрагментирало силно този раздел, заради осемнадесетте отделни метода. Избрания подход позволява плавен преход към отделните етапи на изследването, аргументирайки защо трябва да бъде предприета следващата конкретна стъпка. Считаю, че този начин на структуриране само повишава достойнствата на предложения за разглеждане дисертационен труд.

На базата на получените резултати са формулирани шест основни извода, които са добре подплатени с получените научни резултати.

Дисертацията има седем основни научни приноса, четири от които са оригинални, един потвърдителен, един методически и един научноприложен:

1. **Доказано** е с молекулярни маркери, че сред събраните образци няма български представители на вида *P. mutelli* сходни с тези обитаващи останалите европейски държави (**потвърдителен принос**).
2. Доказано е, че в генома на *Arabidopsis thaliana* L. присъстват гени които могат да осигурят устойчивост срещу *P. ramosa* (**оригинален принос**)
3. Установени са два ядрено кодирани гена (E-beta-carotophyllene синтаза и терпеноид циклаза), чиито продукти са локализиращи в хлоропластите и активирането им води до повишаване устойчивостта на *Arabidopsis* към опаразитяване със *P. ramosa* (**оригинален принос**).
4. Установено е, че активирането на цитохром P450 монооксигеназа ензим активиращ се при процеси свързани с клетъчната диференциация и защита от стрес също води до повишаване устойчивостта на *Arabidopsis* към опаразитяване със *P. ramosa* (**оригинален принос**).
5. Установено е, че блокирането на Auxin Response Factor 16, който регулира формирането на кореновата гугла и клетъчната диференциация прави *Arabidopsis* невъзприемчив към опаразитяване (**оригинален принос**).
6. Разработена е нов комплект от праймери за идентифициране местата на инсерция на pSKI015 в геномът на *Arabidopsis* и за Southern blot (**Методически принос**)
7. Гени, повишаващи устойчивостта срещу опаразитяване могат да бъдат търсени и повлияни в генома на ценни селскостопански култури (**научноприложен принос**).

В светлината на развитието на методите за секвениране от второ и трето поколение, изследването има широк хоризонт за по-нататъшно развитие и ще допренесе без съмнение за нови открития, касаещи взаимодействията в системата растение – гостоприемник/растение – паразит.

6. Преценка на публикациите и личния принос на докторанта

Две от общо седемте публикации, както и трите участия в международни конференции имат пряко отношение към дисертационния труд. Във всички тях докторантката е първи автор, което показва нейното активно участие и значителен принос за постигане на отразените в публикациите резултати.

Публикациите посочени в дисертацията са две и двете са с импакт фактор, което напълно съответства на ЗРАСРБ, Правилника за прилагане на ЗРАСРБ и съответния Правилник на ПУ „Паисий Хилендарски“, както и на специфичните изисквания на Биологическия факултет. Статиите на които е базирана дисертацията са публикувани в международно списание, собственост на издателство Taylor & Francis Group

7. Автореферат

Автореферата отговаря на изискванията на ЗРАСРБ, Правилника за прилагане на ЗРАСРБ и съответния Правилник на ПУ „Паисий Хилендарски“, както и на специфичните изисквания на Биологическия факултет. Той отразява в пълнота получените резултати и научните приноси.

8. Препоръки за бъдещо използване на дисертационните приноси и резултати

Критични забележки и препоръки НЯМА.

9. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Дисертационният труд *съдържа научни, научно-приложни и приложни резултати, които представляват оригинален принос в науката* и отговарят на всички изисквания(та) 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 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 от 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.... г.

Изготвил становището:

Проф. д-р Илия Денев

(ак. дл. н. ст. име фамилия)