

РЕЦЕНЗИЯ

От доц. д-р Благвеста Тодорова Гочева, Биологически факултет на СУ "Св. Климент Охридски"

На дисертационен труд за получаване на образователна и научна степен "доктор" в професионално направление 4.3. Биологични науки (Микробиология)

Автор на дисертационния труд: Йоана Красимилова Кижева

Тема на дисертационния труд: "ФИТОПАТОГЕННИ БАКТЕРИИ ОТ РОД *XANTHOMONAS* ПО *SOLANUM LYCOPERSICUM*"

1. Лична информация за докторанта

Йоана Красимилова Кижева е родена през 1985 г. в Бургас. Висшето си образование завършва през 2010 г. като магистър по микробиология и микробиологичен контрол в Биологическия факултет на Софийския университет "Св. Кл. Охридски". През 2011 година е зачислена като редовен докторант към катедра "Обща и промишлена микробиология" в Биологическия факултет на СУ "Св. Кл. Охридски".

2. Актуалност и значимост на дисертационната тема

В България отглеждането на зеленчукови култури има дългогодишни традиции. Доматите са едни от най-употребяваните продукти, с незаменими полезни и вкусови качества. Икономическият ефект от производството им е силно компрометиран от атакуващите ги популации на видове от рода *Xanthomonas*, които причинявайки бактериен струпясване, влошават качеството и намаляват добива. Това е световен проблем, с огромен приоритет за решаване както от учените, така и от производителите. Контролът на това заболяване по селскостопанските култури, както и борбата с него, изисква разработването на подходящи стратегии, съобразени с европейските изисквания, за характеризиране на видовия състав и вътревидовото диференциране на регионално разпространените видове, изолирани от конкретни местообитания. Това би довело както до създаване на устойчиви сортове, така и до извършване на бърза диагностика, управление и ограничаване на болестта чрез предприемане на адекватни мерки. В България задълбочените изследвания в тази посока започват след 1989 г. До този момент обаче, те се базират на характеристики, които са недостатъчно информативни и съответстващи на съвременните молекулярно-генетични подходи в изучаването на таксономичния статус на тези патогени.

В смисъла на казаното до тук, оценям високо стойността на разработената теза в дисертационния труд на Йоана Кижева като много актуална и значима. Тук искам да отбележа авторитета и компетентността на научните ръководители проф. д-р Пенка Мончева и проф. д-р Невена Богацевска, признати изследователи в областта на фитобактериологията у нас и в чужбина, които са си поставили толкова сериозна научна задача, решаването на която би представлявало значителен теоритичен и

приложен принос за страната. Представената дисертация е първата разработка в тази област, третираща проблем, представляващ сериозен интерес, с реален потенциал за практическо приложение.

3. Оценка на структурата на дисертационния труд

Дисертационният труд е структуриран по общоприетия модел за научен труд от такъв тип и съдържа 9 основни раздела, както следва: Увод (2 стр.), Литературен обзор (48 стр.), Цел и задачи (1 стр.), Материали и методи (15 стр.), Резултати и обсъждане (52 стр.), Обобщение (7 стр.), Изводи (1 стр.), Литература (26 стр.) и Приноси (1 стр.).

Разделите са правилно структурирани и са спазени препоръчителните оптимални съотношения между тях. Прави добро впечатление приложението на няколко списъка, които ориентират и въвеждат читателя към работата – списък на използваните съкращения, на таблиците, на фигурите и краткото, но съдържателно резюме. Общият обем на труда е 155 стандартни А4 формат страници.

3.1. Литературен обзор

Литературният обзор е целенасочен, подробно изчерпателен, логично структуриран и се базира на значително количество литература, която докторантката е използвала много умело и творчески. Той предоставя специализирана информация по дадената тема като отразява коректно и цялостно състоянието на проблема в исторически план и понастоящем. Обзорът разкрива широката теоретична подготовка на докторантката, познаване на проблема, както и умение за обобщаване и анализ на литературните данни. Списъкът на използваната литература съдържа 284 заглавия, от които само 9 на кирилица. От цитираните изключително голям брой автори, над 43 % са на съвременни публикации, считано от 2000-та година насам.

Литературният обзор включва няколко раздела, в които последователно се акцентира върху общата характеристика на фитопатогените от род *Xanthomonas*, като са разгледани особеностите в жизнения им цикъл. Обърнато е внимание на факторите на патогенността – секреторни системи, адхезини, ензими разграждащи клетъчната стена и екстрацелуларни полизахариди. Специално място е отделено на таксономията на рода като е разгледана класификацията на база патогенност и полифазния подход. Разгледани са методите за определяне на фенотипните признаци, както и молекулните методи за определяне на генетичните свойства. В обзора е представена информация за методите и средствата за борба с фитопатогенните бактерии от род *Xanthomonas*. Интересна информативност носи раздела, посветен на причинителите на бактериалното струпяване по домати, историята на откриване на причинителите, както и съвременното състояние на проблема. Накрая е разгледано изучаването на този въпрос

в нашата страна и основанието той да бъде включен като основна теза на настоящото изследване.

3.2. Цел и задачи

На база направения анализ в литературния обзор е изведена основната насоченост в настоящата дисертационна работа. Целта е ясно формулирана, както и логично произтичащите от нея шест задачи, някои от които (3) с подзадачи, поставени за решаване от докторантката. Задачите са конкретни, ясно дефинирани, изцяло обвързани и отговарящи на целта, както и достатъчно обхватни за решаването ѝ.

3.3. Материали и методи

В дисертационния труд са използвани голям набор от микробиологични, молекулярни, молекулярно-генетични и биохимични методи, кластерен анализ и различни компютърни програми за обработка на данните. Класическите микробиологични и фитобактериологични методи са приложени при изолирането на бактериалните щамове, определяне чувствителността към различни антибиотици и медни йони, потвърждаването на патогенността на изолатите и расовата идентификация на доматения патотип, както и при изследване взаимоотношенията между расите на щамовете. Наред с тях, докторантката е използвала биохимични методи за характеризирание на метаболитния профил на щамовете (системата BIOLOG GN) и определяне на амилолитична активност. Прилагането на съвременни молекулярно-генетични методи се отнася за изолиране на ДНК, PCR-RFLP анализ на 16S-23S ITS, PCR амплификация с видово-специфични праймери за отделните видове, макрорекстрикционен анализ на тотална ДНК с ендонуклеази и секвениране на 16S-23S ITS фрагмент на типовата култура *X. euvesicatoria*.

Избраният методичен подход и използваните методики са адекватни на поставените задачи и позволяват получаването на достоверна информация, която да послужи като основа за анализи и сравнения. Искам да подчертая, че усвояването на тези методи и умелото им прилагане, предполага солидна теоритична и практическа подготовка на докторантката, която тя успешно реализира в работата си.

3.4. Резултати и обсъждане

В този раздел е отразен внушителен експериментален материал, разработен последователно и методично, следвайки поставените задачи. Обхващането на значителен брой земеделски райони в България за няколкогодишен период, от които са събрани и обработени проби, е предпоставка за мащабността на проведените изследвания и обективността на получените резултати. Целият раздел създава впечатление за едно завършено изследване, в което отделните етапи следват логически един след друг и гарантират последователното решаване на поставените задачи.

Получените резултати от докторантката са в следните основни направления:

А) *Изолиране на фитопатогенни бактерии от род Xanthomonas от домати и тяхната характеристика*: на отбраните 101 изолата е потвърдена патогенността, определени са патотипа (Т и РТ) и расите (Т₁, Т₂ и Т₃). Описани са 3 морфологични типа колонии. Физиолого-биохимичната характеристика е направена като е използвана системата BIOLOG GN за изследване на метаболитния профил. Кластерният анализ показва фенотипно разнообразие, което дава основание на докторантката да разпредели изолатите в 6 групи при 80% подобие и да докаже хетерогенният характер на патогенната популация.

Б) *Диференциране и идентификация на щамове с молекулни методи*: чрез използваните две молекулни техники - PCR-RFLP анализ на 16S-23S ITS и PCR амплификация с видово-специфични праймери, авторката неоспоримо доказва съществуването на 4 вида в българската популация, като видът *X. Gardneri* се съобщава за първи път.

В) *Фенотипна характеристика на изолираните щамове от видовете X. Vesicatoria и X. Gardneri*: установено е, че популациите на първия са значително по-хетерогенни в сравнение с втория, който пък е с по-ограничени метаболитни възможности. Изследването на чувствителността към медни катиони, предвид широкото им използване в препаратите за растителна защита доказва резистентност при концентрации 0.1 – 0.2 % и чувствителност при концентрация 0.3 %. Тази информация е полезна и с практическа стойност предвид контрола на патогена чрез химически средства в реални условия. Изследваната чувствителност към антибиотици от различни групи допълва информацията за типизирането на щамове, макар че няма пряко отношение към изработването на стратегии за борба с бактериозите.

Г) *Вътревидово генетично разнообразие чрез макрорекстрикционен анализ на геномна ДНК*: Изследванията в този раздел са проведени с цел да се разкрие генетичното разнообразие на двете изолирани популации патогени по домати. На базата на получената информация е построена дендограма, отразяваща разнообразието сред формиращите се профили и показваща тяхната близкородственост.

Целият раздел е написан на много добър научен стил и резултатите са отразени изключително ясно и коректно. Авторката е коментирала данните си в светлината на публикуваните факти в научната литература, като е обсъдила и направила убедителна дискусия на съвременно ниво. Приветствам идеята за обособяване на раздел "Обобщение", който улеснява читателя в по-доброто възприемане на анализирания данни.

Получените резултати в дисертационния труд представляват изключително полезна и в голяма степен нова информация, която допълва базата данни за патогените, причиняващи бактерийното струпяване по домати. По този начин, изследванията за видовия състав на род *Xanthomonas* в България се изясняват и се привеждат в съответствие с актуалния му таксономичен статус. Познаването на вътревидовото разнообразие в този род дава възможност да се търсят подходящи индивидуални средства за адекватна борба с патогенните му представители.

Резултатите от работата са презентирани по подходящ начин и оформени илюстративно в 13 добре форматирани таблици и 54 фигури и снимки с отлично качество. Дисертацията е написана в отличен стил и похвален научен език. Проблематиката изисква използването на голям брой термини, като някои от тях са със съответните аббревиатури, за които е приложен списък.

3.5. Изводи

Изводите (6 на брой) съответстват на поставените задачи, направени са логично и следват от получените в настоящото изследване резултати. Добре формулирани, те отразяват стойността на проведените експерименти.

3.6. Справка за приносите

Подкрепям изготвената справка от докторантката за приносите в дисертационния труд. Те са сериозно обмислени, в голяма степен оригинални и със значителна теоритико-практическа стойност за фитобактериологията.

4. Участие на докторанта в изработването на дисертацията

Имам впечатления от г-жа Кижева през цялото време на работата ѝ като докторантка. Тя е взела лично участие в реализирането на всички изследвания, предвидени в работната хипотеза и цел на доктората. Обобщаването, анализирането, дискутирането и представянето на получените резултати в дисертационния труд в основната си част са нейно дело, за което ѝ давам отлична оценка.

5. Препоръки, забележки и въпроси

Някои дребни забележки бяха направени от мен в предварителната рецензия и с удоволствие констатирам, че докторантката се е съобразила с тях, както и с направените препоръки.

6. Публикации във връзка с дисертационния труд

Част от резултатите убедително са представени в 4 научни публикации, 3 от които в списания с импакт фактор. Кижева е първи автор в 75 % от тях. За отбелязване е участието на докторантката в 6 научни форума, един от които е проведен в чужбина, като в 66 % от тях тя отново е водещ автор. По време на обучението си Йоана Кижева е взела участие в 5 научно-изследователски проекта.

7. Автореферат

Авторефератът е структуриран и оформен отлично, с обем 68 страници. Той отразява адекватно съдържанието на дисертационния труд и е съобразен с изискванията.

8. Придобита компетентност и съответствие с изискванията на научна степен „доктор”

Докторантката Йоана Кижева е един напълно изграден и конкурентно способен млад учен с отлична подготовка за реализация в областта на фитобактериологията. Израстването ѝ в научното поприще се дължи до голяма степен на личните ѝ качества: мотивация, организираност и последователност, огромна работоспособност. Тя притежава необходимите компетентност и умения, покриващи изискванията на научната степен "доктор".

9. Заключение

Представеният дисертационен труд на Йоана Кижева е добре замислено и проведено научно изследване, посветено на изясняването на видовия състав на причинителите на болестта бактериено струпясване по домати в България в съответствие с техния съвременен таксономичен статус. В този смисъл, работата представлява сериозен научен принос с фундаментален и приложен характер в областта на фитобактериологията.

Убедено мога да дам отлична комплексна оценка на дисертационния труд на г-жа Кижева. Получени са достатъчно доказателства в полза на изходната хипотеза. Авторът е успял много аналитично да представи основните резултати от експерименталната си работа. Направеното задълбочено тълкуване и дискусия свидетелства за умението на докторанта аналитично и творчески да интерпретира данните, да проявява критичен подход и да поставя нови въпроси, което е ценно за всяка една научна разработка. Докторантката има водеща роля и лично творческо участие в научните разработки. Тя показва задълбочени познания по специалността, отлична методична и биологична подготовка.

На база изложените в рецензията положителни качества на дисертацията, обемът на извършената работа, отличното оформление и стила на написване, както и съответствието с нормативните изисквания, предлагам на уважаемите членове на научното жури, сформирано със заповед No РД 38-103/06.03.2014 г. на Ректора на Софийски университет "Св. Кл. Охридски", да присъдят на Йоана Красимилова Кижева образовалната и научна степен "доктор" по професионално направление 4.3. Биологични науки, научна специалност 01.06.12. Микробиология.

16.02.2014 г.
София

Рецензент:
(доц. д-р Благвеста Гочева)