

РЕЦЕНЗИЯ

от проф. д-р Снежанка Цветанова Дончева, Институт по физиология на растенията и генетика при БАН, член на научното жури, определено със заповед № РО20-36-0/05.02.2015 на Ректора на СУ „Свети Климент Охридски“, на процедура за провеждане на защита на дисертационен труд на тема „Хормонална регулация на устойчивостта към нискотемпературен стрес на *Arabis alpina* от френските Алпи и Рила планина“

на редовен докторант Марко Илиев Колаксьзов за получаване на образователната и научна степен „Доктор“ по направление 04.03. Биологически науки (Физиология на растенията)

Редовен докторант Марко Илиев Колаксьзов е роден на 05.12.1985 в гр. Плевен. Завършил е Математическата гимназия „Гео Милев“ в гр. Плевен. Бакалавърска степен по биотехнологии и магистърска степен по растителни биотехнологии е получил в СУ „Св. Кл. Охридски“. Участвал е в програмата за студенска мобилност Erasmus, като е реализирал 6-месечна специализация в Университета в Кошице, Словакия. В софтуерната академия Телерик е осъществил 6-месечен курс по програмиране. По време на следването и на докторантурата е работил в системата на Speedy и SGS (Société Générale de Surveillance).

Дисертационният труд е оформен в съответствие с изискванията на Закона за развитие на академичния състав в Република България и на Правилника за прилагането му. Той обхваща 131 страници, като литературната справка включва 180 заглавия на латиница и 3 на кирилица. Дисертацията е изработена в Катедра „Физиология на растенията“ ,

Биологически факултет на СУ „Св. Кл. Охридски“. Част от изследванията са извършени с финансовата подкрепа на Френско-Български проект за двустранно сътрудничество РИЛА 01/7, 21.06.2013 към Фонд „Научни Изследвания“ при МОН, и по изследователски проект в подкрепа на докторанти № 20 / 28.04.2014 на СУ „Св. Кл. Охридски“.

Дисертационният труд е посветен на изследването на ефекта на нискотемпературния стрес върху растенията и хормоналната регулация, която лежи в основата на механизмите на толерантност към този вид стрес. Въпреки глобалното затопляне, нискотемпературната устойчивост на растенията е особено актуална, тъй като се наблюдават все по-чести ранни затопляния през зимата, които водят до прекъсване на зимния покой на стопански значимите културни насаждения и поражения при тях след рязко връщане на ниските температури. Известно е, че в условия на ниски температури, растежът на растенията спира, фотосинтезата намалява, корените спират да поглъщат вода и минерални вещества, в резултат на което листата губят тургора си и се индуцира хлороза. Основна мишена на ниските температури са биологичните мембрани, и най-вече хлоропластните мембрани. Белтъците губят своята хидратационна обвивка, а водородните им връзки се прекъсват, което води до нарушаване на структурата на клетъчните мембрани, чиято основна функция е клетъчната пропускливост. Освен това, белтъците в качеството си на ензими, са важна част от почти всеки биологичен процес и тяхното увреждане влияе негативно върху интензивността на жизнените функции на клетката. В тази връзка, разработваната тема за механизмите на регулация на устойчивостта на растенията към нискотемпературен стрес е актуална, както като принос от фундаментален характер, така и като възможност за възстановяване на растенията.

Дисертационният труд е написан според класическата схема.

- Литературният обзор е написан компетентно и балансирано и се състои от 5 раздела, посветени на характеристиката на нискотемпературния стрес, реакцията на фотосинтетичния апарат към ниските температури и

образуването на ROS като главен увреждащ фактор, принципите на метода на хлорофилната флуоресценция за оценка на структурното и функционално състояние на ФСI и ФСII, растителните пигменти и антиоксиданти (терпеноиди) като протектори срещу нискотемпературен стрес, абсцизиевата киселина и цитокинините, като главните фитохормони, които участват в хормоналната регулация на толерантността към нискотемпературен стрес.

- Целта и задачите на дисертационния труд са формулирани ясно и точно и са свързани с изследване на механизмите на регулация на устойчивостта на *Arabis alpina* към нискотемпературен стрес.

- В раздела „Материали и методи“ е описан растителният материал, използван в настоящето изследване, както и методите за проведените анализи.

Изследвани са три популации на многогодишното високопланинско растение *Arabis alpina* (Brassicaceae): две от френските Алпи - от прохода Galibier (надм. в. 2600 m) и от планината Vercors (надм. в. 1300 m), и една популация от Рила планина, които имат различна толерантност към отрицателни температури. Растенията са отгледани и третирани с ниски положителни (т. нар. стрес от преохлаждане /chilling stress/ при температура около 4°C) и отрицателни температури (т. нар. стрес при измръзване /freezing stress/ при температура -7°C) в лабораторни условия. Третирането на растенията при ниски положителни температури в продължение на 4 дни и минусови температури за 12 ч. през тъмната част на денонощието е проведено в климатична камера. В зависимост от експерименталната методика са спазени периоди на адаптация при определени физиологични условия.

- За анализ на растителния материал са използвани молекулярни и биохимични методи, които са напълно адекватни на поставените задачи. Приложени са методи за определяне на изтичането на свободни електролити, определено е съдържанието на растителните пигменти и антиоксиданти (терпеноиди, сред които са каротеноидните пигменти,

хлорофилите, както и токоферолите), направен е анализ на отговора на фотосинтетичния апарат към ниските температури, определено е ендегенното съдържание на фитохормоните абсцизиева киселина и цитокинини. Използвани са методи за изолиране на тотална клетъчна РНК и qRT-PCR анализ на експресията на гени на специфични белтъци от фотосинтетичния апарат и от метаболизма и сигналната трансдукция на изследваните фитохормони.

Всички методи са описани професионално и достатъчно подробно във всички етапи. Това е една от гаранциите за достоверност на резултатите и дава възможност за възпроизвеждането им в други лаборатории.

Първата част от „Резултати и обсъждане“ представя данните от фенотипния анализ на растения *A. alpina* от трите изследвани популации по отношение на тяхната толерантност към минусови температури. Резултатите от този анализ определят първата популация от френските Алпи, прохода Col du Galibier (надм. в. 2600 m) като толерантен към -7°C (GAL/T), а растенията от планината Vercors (надм. в. 1300 m) като нетолерантни към -7°C (F005/NT). Популацията *A. alpina* от Рила планина (RILA), описана от дисертанта за първи път, е с висока толерантност към минусови температури.

Във втората и третата части от тази глава на дисертационния труд са представени резултатите от физиологичния, биохимичния и молекулярния анализ на трите изследвани популации *A. alpina*.

Различната чувствителност на трите популации към минусови температури докторантът определя посредством изтичането на електролити, което е мярка за нарушение на интегритета на мембранната система в условия на стрес и е съществено повишено само при нетолерантната популация (F005/NT) от планината Vercors.

Нискотемпературният стрес предизвиква най-големи поражения върху процеса фотосинтеза. Затова, напълно логично, значителна част от дисертацията е посветена на фотосинтезата, като е направена задълбочена характеристика на този интегрален процес. Установено е, че

промените в съдържанието на хлорофилните пигменти в листата на *A. alpina* след въздействие с ниски температури е типично за абиотичен стрес, при който първоначално много по-силно намалява съдържанието на хлорофил *a* в сравнение с хлорофил *b*, което е по-силно изразено в нетолерантната (NT) популация. От каротеноидните пигменти, най-високо е съдържанието на лутеин, което е два пъти по-голямо от това на β -каротена, което се запазва непроменено при толерантната (Т) популация, докато при NT популацията силно намалява още след третиране при 4°C. Ксантофиловите пигменти (зеаксантин, виолаксантин, неоксантин) са в значително по-малко количество и претърпяват съществени промени след нискотемпературния стрес. Trans-виолаксантинът намалява след минусовия стрес за сметка на повишението в количеството на зеаксантина както при растенията от Т популацията, които оцеляват, така и при тези от NT популацията, които загиват след третиране при -7°C. Този резултат е от особено значение, тъй като зеаксантинът участва в протекцията от абиотичен стрес. Паралелно е определено и съдържанието на различни форми на токоферола като основни компоненти на неензимната антиоксидантна защитна система, които предпазват фотосинтетичния апарат от увреждащия ефект на активните кислородни форми. Количеството на основната форма α -токоферол, както и на β -токоферол, се запазва и при двете популации *A. alpina*.

Отрицателният ефект на минусовите температури върху нетната фотосинтеза на трите популации на *A. alpina* е най-силно изразен при NT популацията, като растенията от толерантните популации възстановяват скоростта на фотосинтезата след минусовия стрес. Направен е подробен анализ на функционалното състояние на ФСII и ФСI, добре онагледен с 6 фигури. Параметрите на флуоресценцията - т.нар. квантови добиви (ϕ), изчислени на базата на резултатите на транзиентните JIP-криви, индексите на производителност, както и вероятността за електронен пренос отвъд QA (ψ_0) са свързани с активността на ФСII, докато разсейването на модулираната 820 nm светлина - индукционни криви на модулираното

разсейване, са мярка за активността на ФСI. Данните дават основание на автора да предположи, че ФСI е по-чувствителна към ниски температури, отколкото ФСII, която понася по-голям дял от нискотемпературния стрес. Инхибирането при двата вида нискотемпературен стрес е по-силно изразено при NT популацията, като растенията от Рила планина показват по-висока толерантност спрямо нискотемпературния стрес в сравнение с T популацията от френските Алпи (GAL/T).

Хормоналният анализ включва промените в съдържанието на АБК, който е най-важният стресов фитохормон, който осигурява адаптацията на растенията към нискотемпературен стрес, както и цитокините (СК), които участват в регулацията на основни физиологични процеси в растенията, като фотосинтеза и стареене. Изследвани са промените в съдържанието на АБК и продуктите на нейния катаболизъм – 9' хидрокси АБК (9'ОН-АВА), фазеева киселина (РА), дихидрофазеевата киселина (DPA) и глюкозния естер на АБК (АВА-GE). Установено е нарастване на АБК и нейните окислени производни РА и DPA след нискотемпературен стрес при 4°C и по-нататъшно запазване на съдържанието им след третиране при -7°C както при T, така и при NT популацията на *A. alpina*. Съдържанието на последния продукт от инактивацията на АБК чрез окисление – DPA, е най-високо при T популацията, и практически отсъства при NT популацията, което вероятно е признак за по-високата метаболитна активност на АБК в растенията от T популацията. Тези резултати потвърждават участието на АБК като стресов медиатор в механизмите на толерантност към нискотемпературен стрес.

В литературата, данните за ролята на цитокинините в регулацията на отговора към нискотемпературен стрес са недостатъчни и поради това, особено важни са представените в дисертацията резултати от анализа на промените във всички функционални групи СК. Установено е, че само при T популацията концентрацията на биологично активните СК, представени главно от транс-зеатин, транс-зеатин рибозид и изопентениладеднин рибозид, намалява след нискотемпературния стрес на преохлаждане при 4°C, като се запазва непроменена и след третиране при -7°C. При NT

популацията, обаче, съдържанието на биологично активните СК прогресивно намалява, особено след минусовия стрес. Количеството на *cis*-зеатините, което доминира в общия ендогенен цитокининов пул, намалява след двата вида нискотемпературен стрес и при двете изследвани популации на *A. alpina*, като следва хода на промените в съдържанието на биологично активните СК. През периода на последователно възстановяване, съдържанието на СК постепенно нараства, като този процес е много по-силно изразен при Т популацията. Динамиката на промените в ендогенното съдържание на СК дава основание на автора да заключи, че при *A. alpina* цитокинините вероятно играят важна роля при формирането на устойчивостта към ниски температури (охлаждане и замръзване), като е възможно *cis*-зеатините да имат много по-голямо значение изобщо в жизнения цикъл на това растение, отколкото при другите растения от сем. Brassicaceae. В допълнение, третирането с отрицателни температури води до намаляване на съдържанието и на стресовия медиатор жасмонова киселина и нейното производно жасмонат-изолевцин, което предполага, че тези растежни регулатори също така участват в процеса на аклимация на *A. alpina* към ниски температури.

Анализът на транскрипцията на гени от метаболизма на АБК и СК показва корелация с промените в ендогенното съдържание на тези фитохормони. Особено силно активираният ген за импорт на АБК в клетката след ниски температури при Т популацията, за разлика от NT, предполага, че АБК може да има сигнална функция, освен тази на стресов медиатор. И двата типа нискотемпературен стрес предизвикват потискане на транскрипцията на гените *IPT1* и *IPT3* за биосинтез на биологично активните СК. Генът *IPT2*, отговорен за биосинтеза на *cis*-зеатини е стимулиран след нискотемпературния стрес само при растенията от Т популацията, което корелира с по-високото съдържание на тази група СК. Особен интерес представляват данните за транскрипцията на гените от фамилията на СКХ, които кодират ключовия ензим от катаболизма на СК – цитокинин оксидаза/дехидрогеназа. Наблюдаван е различен отговор в

експресията на тези гени при Т и NT популациите, което потвърждава твърдението за различната метаболитна регулация на ендогенния СК пул при двете изследвани популации и възможността СК да участват в механизмите на адаптация на растенията към нискотемпературен стрес.

Анализът на транскрипцията на гени за фотосинтетични белтъци от двете фотосистеми показва по-силно инхибиране на гените, кодиращи белтъци от реакционния център и антенния комплекс на ФСІ още след охлаждане (4°C) при растенията и от двете популации, което което демонстрира значително по-високата чувствителност на ФСІ към ниски температури в сравнение с ФСІІ.

Въз основа на получените резултати са формулирани 7 извода и 5 приноса. Резултатите от изследванията са публикувани в 3 публикации в наши издания. В 2 от публикациите Марко Илиев Колаксьзов е водещ автор, а в една – втори автор. Резултатите са докладвани и 4 наши научни форуми, като в 2 от тях докторантът е водещ автор. Той има участия в 2 научно-изследователски проекта.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Дисертационният труд на Марко Илиев Колаксьзов е посветен на важен научен проблем в областта на физиологията на растенията, свързан с изясняване на факторите, които определят толерантността към ниски температури при високопланинското растение *A. alpina*, с акцент върху хормоналната регулация, която лежи в основата на механизмите на адаптация на растенията към нискотемпературен стрес. Важен принос на дисертацията е приложеният комплексен подход към изследвания проблем, който е отразен в схема, която обобщава физиологичните, биохимични и молекулярни процеси, които се развиват в растенията от толерантната популация на *A. alpina*, и които в своята съвкупност обуславят устойчивостта на тези растения към нискотемпературния стрес. Този

подход би могъл да се използва като тест за оценка на степента на толерантност на растенията към този вид стрес.

Дисертационният труд е изработен на високо методично ниво и разкрива автора като квалифициран и компетентен физиолог. Спазени са всички изисквания на Закона за развитие на академичния състав и Правилника за приложението му. Всичко това ми дава основание убедено да препоръчам на уважаемото жури да присъди на Марко Илиев Колаксьзов образователната и научна степен „Доктор” по научната специалност „Физиология на растенията”.

26.03.2015 г.

Изготвил рецензията:

/проф. д-р С. Дончева/