

РЕЦЕНЗИЯ

От проф.д-р Венета И. Грудева

Върху представената дисертация на тема „**Фитопатогенни бактерии от род *Xanthomonas* по *Capsicum annuum***” за придобиване на образователната и научна степен „**доктор**„ от Таца Атанас Ванчева

1. Актуалност и значимост на дисертационната тема

Родът *Xanthomonas* включва бактерии, които инфектират различни видове растения. Причинителите на бактериен струпясване по пипера, които се отнасят към този род и са обект на настоящата дисертация, се изучават активно, но постиженията в борбата с това заболяване са с ограничен успех. Причините за това са различни, но една от най-съществените е недостатъчната информация относно биологията на патогенните, механизмите на взаимодействието им с гостоприемника както и методите за ефективно доказване и идентификация на причинителите на това заболяване.

Наличните в литературата данни относно методите за доказване и идентификация на причинителите на заболяването са доста разнопосочни и противоречиви. Самият род *Xanthomonas* както и видовете отнесени към него претърпяват сериозни рекласификации в последните години на базата на използването на разнообразни методи на молекулната таксономия. В този смисъл представената дисертация е по **особено актуален проблем** с важно фундаментално значение и възможности за практическо приложение в борбата с това заболяване.

2. Оценка на структурата на дисертационния труд

Дисертационният труд е написан на 262 стандартни страници като резултатите са обобщени и представени в 110 фигури и 28 таблици. Дисертацията е структурирана по класическата схема - увод, литературен обзор, цел и задачи, материали и методи, резултати и обсъждане, обобщение, изводи, приноси, литература.

Трудът е написан на добър научен стил, с точно използване на терминологията което показва, че докторантката познава професионално

материята. Представената литературна справка (388 литературни източници, от които 11 на кирилица и останалите на латиница, главно от последните години, включително и такива от 2015 г.) говори за задълбочен анализ на състоянието на проблема и е очевидно, че дисертантката го познава изключително добре.

2.1 Литературен обзор

Литературният обзор има пряко отношение към целта на дисертацията и поставените задачи. В него се разглежда подробно биологията на род *Xanthomonas* и видовете, причиняващи струпяването на пипера, механизмите на взаимодействието им с растението гостоприемник, въпроси, свързани с диагностицирането на причинителите, епидемиологията на заболяването както и методите за борба с тези причинители. Задълбочено и критично са разгледани проблемите, свързани с таксономичния статус на причинителите на заболяването и възможностите на съвременните методи на молекулната таксономия за диагностиката им. Посочени са и спорните и неизяснени въпроси по проблема. Целенасочената информация в литературния обзор докторантката е представила в резултат на задълбочено познаване на значителен брой научни публикации по проблема, които правилно анализира и обсъжда.

2.2. Цел и задачи

Целта е ясно и точно поставена. Тя е свързана с изучаването на видовия състав, вътревидовото разнообразие на причинителите на струпяването на пипера. За реализирането ѝ са формулирани 8 основни задачи, следващи логично. Някои от тях са детайлизирани със съответни подзадачи.

2.3. Материали и методи

Това е важна част от дисертационния труд, която показва нивото на проведените научни изследвания. Представени са съвременни микробиологични, биохимични и особено генетични методи, които са адекватни на поставената цел и които осигуряват едно прецизно изпълнение на задачите. Методите са описани точно, ясно без излишни подробности. Комбинирането на различни методи дава възможност докторантката не само да получи нови знания, но и да придобие умения за комплексно решаване на поставените научни задачи.

2.4. Резултати и обсъждане

Получените резултати докторантката представя последователно съгласно поставените задачи. Логично първият раздел е изолацията и идентификацията на

причинителите на струпяването по пипера от различни региони на България и Македония. Изолирани са 161 щамове, които са обект на следващи анализи, свързани с потвърждаване на патогенността, определяне на патотипа, физиолого-биохимична характеристика, чувствителност към антибиотици и медни йони. Данните от метаболитните профили на изолираните щамове, както и тези на типовите култури, използвани като контроли, са подложени на йерархичен кластерен анализ, който показва очевидно фенотипно разнообразие сред щамовете. Установени са интересни резултати. Изолатите се групират в 5 кластера като първият обединява най-голям брой щамове – 75, изолирани както от България, така и от Македония. Вторият по големина кластер групира 59 щамове, също изолирани от България и Македония, както и типовата култура на вида *X. euvesicatoria*. Кластерният анализ показва, че патогенната популация се състои от повече от един вид. Седемдесет и четири от щамовете показват подобие с вида *X. perforans*, 58 – с вида *X. euvesicatoria* и 30 щамове с вида *X. vesicatoria*. На базата на това групиране на щамовете по 95 фенотипни докторантката допуска наличието на три вида в патогенната популация по пипера в България и Македония.

Значителна част от резултатите е свързана с идентификацията на изолатите, която е осъществена с методи на класическата таксономия и такива на молекулярната таксономия. В резултат на това мащабно изследване докторантката стига до извода, че 131 изолата принадлежат към вида *X. euvesicatoria* и 30 изолата към вида *X. vesicatoria*. Проведеният PFLP анализ на 16S - 23S спейсърна последователност на рДНК с три ендонуклеази и получените рестрикционни профили потвърждават този метод като подходящ за диференциране и идентификация на видовете, причиняващи струпяването на пипера.

В следващият раздел на резултатите са представени данни от фенотипната характеристика и разнообразието на популациите на причинителите на струпяването по пипера. Подробно е изследван метаболитния профил на установените видове и са направени интересни наблюдения относно тези профили на изолатите, изолирани от регионите в България и Македония като са констатирани известни различия.

За генотипната характеристика и вътревидово разнообразие на причинителите на бактериално струпяване по пипера е проведен RAPD - PCR

анализ на геномна ДНК и ERIC-PCR анализ. Установени са 2 генотипа сред щамовете на вида *X. euvesicatoria*. За първия генотип е характерен профил I, който се формира от 98% от щамовете – всички македонски и по-голямата част от българските и е съставен от три амплификационни продукта. Двата вида анализи потвърждават хомогенността на македонската популация, установена и с RAPD-анализа, която формира еднакъв генотип с преобладаващата част от българските изолати. Въпреки, че и двата метода разкриват разнообразие сред щамовете на *X. euvesicatoria* е приложен и BOX-PCR метод, който е с по-голяма дискриминативна способност (HGDI 0.06) в сравнение с ERIC-PCR (HGDI 0.03). Най-надежден резултат е получен при комбинация на двата анализа.

Изследването на вътревидовото разнообразие сред популациите на видовете *X. euvesicatoria* и *X. vesicatoria* дисертантката продължава със секвенционен анализ на различни локуси в генома на бактериите (Multi locus sequence analysis and typing (MLSA/MLST)). За MLSA са секвенирани четири „housekeeping” гени - *gyrB*, *groD*, *dnaK* и *fyuA* на шест щамове от вида *X. vesicatoria*. След скрининг и сравнение на секвенциите на щамовете е установено, че всички имат еднакъв секвенционен тип както помежду си, така и с този на референтния щам. В резултат на проведеня анализ вътревидово разнообразие сред изследваните щамове от двата вида не се установява, но се наблюдават различия в последователността на секвенциите на гените между двата вида. Чрез този метод докторантката потвърждава наличието на два генетично и фенотипно различни патогена в двете държави и успешно би могъл да се използва за идентификация и диференциране на двата вида.

Следващият етап от работа на докторантката е свързан с анализ на локуси от генома, съдържащи вариабилен брой тандемни повтори MLVA (multi-locus variable number tandem repeat analysis). Разработената от докторантката на MLVA схема има висока дискриминативна способност за характеризиране на щамове на *X. euvesicatoria*. Щамовете, които имат идентичен MLVA профил или се отнасят към един клонален комплекс често са изолирани от един и същи регион, през същата година или в интервал от 2 години. Това предполага епидемиологична връзка между тези изолати. Този анализ показва, че бактериеното струпясване е ендемично, т. е. присъства и в двете държави дълъг период. Аналогична схема е

разработена и за вида *X. vesicatoria*. Тези схеми могат да бъдат успешно използвани за типизиране на популациите.

Следващите изследвания на докторантката са свързани с изучаването на взаимоотношенията патоген-гостоприемник чрез определяне наличието на гени, кодиращи TAL ефекторните белтъци в популациите на патогените. Докторантката конструира три двойки праймери и провежда скрининг на 131 щамове *X. euvesicatoria* чрез PCR с двойките праймери и установява, че присъствуват и двата ефектори белтъка като само 18 от щамове не притежават гени за тези белтъци. Ефекторните белтъци показват висока специфичност по отношение расата и култивара на дадения гостоприемник.

Проведеният в следващите изследвания анализ за определяне на чувствителността на различните сортове пипер спрямо представителите на причинителите на бактериен струпясване и по специално спрямо *X. euvesicatoria* разкрива различна чувствителност, но не е открита устойчивост на нито един сорт.

Съществен елемент от работата на докторантката са изследванията върху алтернативни средства за борба с причинителите на бактериен струпясване по пипера. В това отношение са проверени чувствителността на щамове към етерични масла в условия *in vitro* и *in vivo* и чувствителността към антибактериални вещества от актиномицети в условия *in vitro*

Изследвани са 12 етерични масла и осем техни компоненти за антибактериална активност. Резултатите показват, че всички изследвани масла и компоненти оказват инхибиторен ефект върху използваните тестове. За изпитване на чувствителността към антибактериални вещества от актиномицети са използвани 30 актиномицетни щамове, изолирани от Антарктически почви, които са скринирани за антибактериална активност срещу избрани щамове на видовете *X. vesicatoria* и *X. euvesicatoria*, изолирани от пипер от България и Македония. В резултат на проведения скрининг е установено, че пет от изпитаните 30 актиномицетни щамове проявяват активност спрямо всички тест-бактерии, независимо от техния патотип и раса. Активността на актиномицетните щамове е различна, което предполага както различен състав от една страна, така и различна чувствителност на тест-бактериите.

Логично продължение на изследванията на докторантката са тези, свързани с изпитване на устойчивостта на различни сортове пипер към причинителите на бактериен струпясване. В тази връзка е изследвана устойчивостта на 23 сорта пипер (17 български, 5 сръбски и един италиански) към два щама на причинителите на бактериен струпясване по пипер в България и Македония - *X. euvesicatoria* 1M (P патотип) и *X. vesicatoria* 3b (PT патотип, раса T2) след изкуствено заразяване на растенията. Като основен извод от тези анализи е фактът, че отделните сортове проявят деференцирана реакция към патогените - от слаба до силно чувствителна. Проведеното изследване показва, че сред изследваните сортове, които се използват в страната, не се откриват имунни и устойчиви. Разделът резултати завършва с обобщение, което е направено с голямо умение и дава основание да се заключи, че причинителите на бактериен струпясване по пипер в България и Македония – *X. euvesicatoria* и *X. vesicatoria* са широко разпространени, присъстват дълго време и ежегодно нанасят големи щети на селскостопанската продукция. Голямата вариабилност, която се открива сред причинителите на бактериен струпясване и липсата на информация за разнообразието сред патогените е основна пречка за ефективна борба с това заболяване. Това са важни заключения, които могат да имат съществена стойност за разработване на стратегия за борба с това заболяване.

2.5. Изводи и приноси

На базата на проведените експерименти по поставените задачи са формулирани 13 извода. Те са логично следствие от проведената експериментална работа и напълно отразяват получените резултати. Единствената ми забележка е свързана с извод № 13, който не е поставен на правилното място.

Посочени са и 5 приноси, които освен фундаментален характер могат да бъдат основа за разработване на стратегия за борба със заболяването.

3. Участие на докторанта в изработването на дисертацията

Докторантката е разработвала дисертацията в катедрата. Контактите ми с нея, участието ѝ в различни научни форуми и докладване на резултати от дисертацията ми дават основание да считам, че изпълнението на дисертационния труд е напълно нейно дело.

4. Публикации

Дисертантката е представила внушителен списък с публикации по темата както следва: **две публикации** в български нереферирани списания, **три**

публикации в международни реферирани списания и **три публикации** в списания с импакт фактор. Резултати от дисертацията са докладвани на 14 научни форума (7 международни и 7 национални) под формата на доклади и постерни съобщения. Докторантката е участвувала в пет научни проекта, свързани с темата на дисертацията.

Представен е и списък на цитирания на трудове на докторантката (общо 4 цитата), което още веднъж потвърждава значимостта на проблема и актуалността резултатите, които докторантката е получила.

5. Препоръки, забележки и въпроси

Дисертационният труд е оформен перфектно, не са допуснати дори и технически грешки поради което е трудно да се направят забележки. С удоволствие трябва да отбележа, че докторантката се е съобразила с направените препоръки и забележки на предварителната защита както и че е отстранила допуснатите макар и малко технически неточности. Към докторантката имам следните въпроси :

1. Защо разработената от вас MLVA схема има висока дискриминативна способност за характеризиране на щамове на *X. euvesicatoria* в малък мащаб ?

2. Сред представителите на вида *X. euvesicatoria* (*X. campestris* pv. *vesicatoria*) са открити два вида ефекторни белтъци AvrBs3 и AvrBs. При проведения скрининг част от щамовете не притежават гени за тези ефекторни белтъци. Как може да се обясни този факт и какво е влиянието му върху патогенността на тези щамове. Какви други фактори могат да бъдат ангажирани както се твърди в извод № 9 ?

3. Как виждате използването на етеричните масла, които сте изпитвали за антибактериален ефект за борба с причинителите ?

4. На базата на анализа на популациите на изследваните патогени и използваните методи за тяхното типичане какъв алгоритъм бихте предложили за контрол на заболяването по пипера?

6. Придобита компетентност в съответствие с изискванията на образователната и научна степен „доктор”

Представеният дисертационен труд е едно завършено изследване, което предоставя ценна научна информация и разкрива възможности за практическо приложение. Смятам, че обемът на тази дисертация далеч надхвърля изискванията, направени са много анализи, направени са важни изводи,

получените резултати имат фундаментални и научно-приложни приноси. Авторефератът е изготвен съгласно изискванията и отразява вярно основните резултати и изводи на дисертационния труд.

Изхождайки от изложеното мога да обобщя, че са изпълнени основните цели на докторантурата – образователна и научна. Дисертацията е разработена на изключително високо научно ниво и изцяло отговаря на изискванията. Очевидно е, че докторантката е придобила значителни компетенции, усвоила е широк набор от съвременни методи, изградила се е като отличен експериментатор и млад специалист с големи потенциални възможности за развитие. Имам лични впечатления от докторантката още като студентка и това ми дава право да отчета нейното експоненциално израстване в процеса на докторантурата.

Дисертационният труд има сериозни приноси. Като по-съществени считам тези, свързани с идентификацията на щамове, разнообразните методи на молекулната таксономия за изучаване на вътре видовото разнообразие, разработената MLVA схема за типирание на двата вида, използването на високо надеждни молекулни методи за генотипиране. Тези методи се прилагат за пръв път от докторантката и съм сигурна, че ще представляват голям интерес за специалистите в тази област. С немалка стойност са и данните относно разпространението, видовият състав, патотипа, расите на причинителите на струпяването, които могат да бъдат използвани в селекционни програми за създаване на устойчиви сортове пипер.

Изложеното по-горе ми дава основание да считам, че дисертацията е на високо ниво, придобити са компетенции в съответствие с изискванията и горещо препоръчвам на научното жури оцени достойнствата на дисертационния труд и да присъди на Таца Атанас Ванчева образователната и научна степен „доктор”.

22.11. 2015.

Рецензент :