

РЕЦЕНЗИЯ

върху дисертационен труд, представен пред научно жури, сформирано със заповед № РД РО 38-649/30.10.2015 г. на Ректора на Софийски Университет „Св. Климент Охридски” за получаване на образователната и научна степен “доктор”

Автор на дисертационния труд: Таца Атанас Ванчева

Тема на дисертационния труд: “Фитопатогенни бактерии от род *Xanthomonas* по *Capsicum annuum*”

Рецензент: проф. Мария Ангелова, дбн

Видовете от род *Xanthomonas* са включени в топ листата на 10-те най-опасни растителни патогени, които могат да предизвикат тежко компрометиране на реколтата от различни земеделски култури. Това от своя страна заплашва глобалната продоволствена сигурност. Според информация на EFSA от 2014 г., загубите от домати и пипер в резултат на бактериалната инфекция са повече от 30%. Освен чисто икономическите загуби, биологичната атака може да доведе до съществени промени в биоразнообразието, промени в околната среда и благосъстоянието на хората. Ето защо род *Xanthomonas* е обект на повишен интерес както на изследователи, така и на производители и дори е част от програмата Европейската комисия за разработването на нови стратегии за контрол и превенция на заболяването. Това на първо място касае идентифициране и охарактеризиране на регионално разпространените видове. В България и съседна Македония не са провеждани анализи на патогенните по пипера щамове по фенотипни и генотипни признаци, което може да даде информация за тяхното вътревидово разнообразие, за идентифициране и охарактеризиране на огнищата на заболяването, за изясняване механизмите на взаимодействие с гостоприемника, за начините за ограничаване на разпространението на болестта и др. Отбелязвам всичко това с презумпцията да подчертая актуалността на дисертационния труд на Т. Ванчева. Докторантката и нейните научни ръководители, проф. П. Мончева и проф. Н. Богацевска, са намерили неизследвана ниша в областта на фитопатогенните бактерии с изключително важно значение за икономиката и изхранване на населението. По своята актуалност дисертационният труд се вписва много точно в основните приоритети на страната и Европа. Това е една от първите разработки в България и първата за Македония, която цели да приведе видовата структура на разпространените в региона представители на род *Xanthomonas*, патогенни по пипера, в съответствие със съвременния таксономичен статус на тези бактерии.

Наред с несъмненото теоретично значение на такъв род проучвания, поставената задача има и сериозно приложно звучене. Основната насоченост на изследването е свързана с получаване на нови знания относно причинителите на бактерийното струпяване по пипера в теоретичен и приложен аспект. Всъщност това е първата задължителна стъпка от процеса за разработване на стратегия за борба с бактериозите.

Дисертационният труд е конструиран в традиционна форма със съответните раздели. Написан е на 262 стандартни компютърни страници, които включват 226 страници текст и 36 страници литература. Литературният обзор е изготвен целенасочено и конкретно и включва всички аспекти на изследването. В него са отразени 388 публикации (11 на кирилица и 377 на латиница), кореспондиращи с всяка една от поставените задачи. Над 25% от статиите са публикувани след 2008 г., а над 65% - след 2000 г. Обзорът представя състоянието на проблема в исторически план и по настоящем, включва информация за проведените в България и Македония изследвания и доказва необходимостта от разработването на дисертационната теза.

Въз основа на анализа в литературния обзор е изведена целта на настоящата дисертация: да се получат нови знания относно причинителите на бактерийното струпяване по пипера, разпространени в България и Македония със съвременни методи и подходи, които да предложат нови, алтернативни средства за борба с тях. За реализирането на тази цел са формулирани 8 конкретни, взаимно обвързани и логически следващи задачи, които включват всички задължителни критерии за многостранното охарактеризиране на фитопатогенни бактерии.

Разделът "Материали и методи" демонстрира внушителен набор от методи, съобразени с конкретните изисквания на експеримента. Те са както рутинни, така и съвременни, микробиологични, биохимични, молекулярно-биологични и др. Описани са достатъчно подробно, за да могат да бъдат възпроизведени. Освен това са разбираеми и дават възможност за коректно провеждане на експериментите и получаване на достоверни резултати. Много силно впечатление прави включването на PCR, RFLP-PCR, REP-PCR, PCR амплификация с видово специфични праймери, MLSA и MLVA секвенционен анализ, скрининг за наличие на TAL ефекторни белтъци, антибактериална активност и др. Искам да подчертая, че подходът на Ванчева да използва няколко метода, за да получи съпоставима информация в съответен експеримент, внася в разработката доказателство за достоверност и прецизност. Докторантката е усвоила умения да работи с фитопатогенни бактерии на молекулярно ниво.

В раздел „Резултати и дискусия” е включен огромен експериментален материал, който е представен на 140 стр. и демонстрира широко-машабна изследователска дейност. Важно е да се отбележи, че разработката се характеризира с логическа последователност, отделните етапи са разработени обстойно и всеки от тях е база за следващия. В експерименталната работа са обхванати голям брой райони от България и Македония, занимаващи се с производство на пипер. Периодът на проучване също е впечатляващ: 1999-2013, това дава възможност анализът на резултатите да бъде направен на базата на голям брой данни.

В първия етап докторантката получава повече от 160 изолата от род *Xanthomonas* и детайлно ги охарактеризира по отношение на патогенност, фенотипни особености, чувствителност към антибиотици и медни йони. Резултатите от тази изключително трудоемка микробиологична дейност дават нова информация за разпространението на бактериалното заболяване в двете съседни страни. Използвайки методите за класическата идентификация, Ванчева установява фенотипното разнообразие на изолатите, принадлежащи към *X. euvesicatoria*, *X. vesicatoria*, *X. perforans* и *X. gardneri*. Видовоспецифичната PCR-амплификация и RFLP анализът на 16S-23S рДНК доказват, че причинителите на болестта, изолирани от проучваните проби са от видовете *X. euvesicatoria* и *X. vesicatoria*. Интерес представляват експериментите за вътревидовото разнообразие в популациите на тези два вида. Тук Ванчева прилага най-съвременни молекулни методи и подходи като RAPD-PCR с 4 праймера, REP-PCR с ERIC- и BOX-праймери, MLSA на 4 „housekeeping” гени и MLVA на микросателитите, което е гаранция за достоверността на резултатите. Тя успешно разграничава щамовете вътре във вида, доказва ефективността на използваните методи и дискутира високата степен на генетична идентичност сред щамовете, характерни за България и Македония. BOX- и ERIC-PCR, използвани съответно за популацията на *X. euvesicatoria* и *X. vesicatoria*, дават информация за формирането на еднакъв генотип в изолатите от различни местообитания. Резултатите от MLVA анализа ѝ позволяват да предложи хипотеза за произхода на щамовете от вида *X. vesicatoria* от различни региони и години и да оцени значението на еволюцията за разнообразието сред популациите.

Използването на MLSA анализа, характерен с високата си резолюционна способност, задълбочава разработката по отношение на разнообразието във видовете *X. euvesicatoria* и *X. vesicatoria* и наличието на полиморфизъм. Доказанг са два генетично и фенотипно различни патогена сред причинителите на бактериоза по пипера в двете държави. Според авторката, този метод успешно може да се използва за бърза идентификация и диференциране на двата вида. В същата посока са и експериментите с

MLVA, които също характеризират филогенетичното родство между щамовете. Докторантката много детайлно дискутира получените резултати за щамовете от двете местообитания и обосновава епидемиологичната връзка между тях.

В логическата последователност на дисертационната тема намира своето място и проучване на взаимоотношението патоген-растение. Ванчева и тук прилага съвременни молекулярни методи, резултатът от които дава информация за съществуването на гени, кодиращи синтеза на TAL ефекторни белтъци. Този подраздел от експерименталната работа е насочен към изясняване механизма на резистентност на растението към бактериалното заболяване и разработването на методи за управление експресията на тези гени и повишаване устойчивостта към патогена.

Като завършек, дисертацията предлага проучване на възможностите на използване на алтернативни методи за борба с бактериалното струпяване по пипера:

- използването на етерични масла. Проучените 12 етерични масла показват висок индекс на антимикробна активност, но едновременно с това оказват отрицателен ефект върху кълняемостта на обработените семена.

- замяната на често използваните синтетични химични агенти с нови антибактериални вещества. Ванчева установява, че 30 актиномицетни щама, изолирани от Антарктика продуцират такива съединения и като най-подходящи се оказват тези от щамове 2М и 7М.

- създаване на устойчиви сортове пипер. Докторантката доказва, че използваните в момента в България и Македония сортове пипер не се характеризират с изявена устойчивост, което е причина за широкото разпространение на болестта.

Получените резултати са база за следващи конкретни разработки.

Към достойнствата на дисертацията трябва да се добави и умението на Ванчева да отразява извършеното много ясно и коректно, да обсъжда получените резултати на фона на постигнатото от други автори. Дискусията е направена убедително въз основа на голям брой съвременни данни. Трябва да се подчертае стремежът на автора да търси обяснение на данните, да предлага хипотези, да отразява и дискутира и отрицателните резултати, да дава насока за нови изследвания. Това, разбира се, е възможно благодарение на много доброто познаване на проблема и задълбочената научна разработка. Много добра идея е в края на дисертационния труд да бъде представен подраздел „Обобщение“. Всъщност това е анализ на най-важните резултати, което улеснява читателя при възприемане на постиженията на разработката.

Изводите са логично следствие от проведените експерименти. Според мен са формулирани в съответствие с постигнатото.

Трябва да се подчертае още, че дисертацията е написана в много добър научен стил и коректно отразява получените резултати. Доказателственият материал е оформен професионално в 28 таблици и 110 фигури (повечето комплексни и цветни). Снимките, дендрограмите и електрофорезите са с отлично качество. Таблиците, макар и някои от тях да включват голямо количество информация, са ясни и добре форматираны. Всички тези фигури и таблици още веднъж доказват мащабния характер на разработката.

Към докторантката имам следните забележки и въпроси:

1. В списъка на литературата са включени статии, които са представени и като публикации, свързани с дисертацията (№№ 110 и 306).

2. Препоръчвам на докторантката да оформи обзора и най-важните за практиката резултати и да ги публикува за да се запознае широката общественост с проблемите на това производство.

3. Като един от най-запознатите в момента специалисти по бактериеното струпяване по домати, какви стратегии за борба с патогенните видове на род *Xanthomonas* бихте препоръчали на производителите?

4. Кой от засегнатите в дисертацията аспекти трябва да има приоритет при следващи научни разработки?

Според мен, извършените изследвания дават възможност да се открият сериозни теоретични приноси, както оригинални, така и потвърдителни, а именно:

1. За първи път е проведено мащабно сравнително изследване на причинителите на бактериеното струпяване от род *Xanthomonas* по пипер (*Capsicum annuum*) в България и Македония.

2. За първи път е постигнато детайлно генотипиране на щамовете от видовете *X. euvesicatoria* и *X. vesicatoria* с подходящи молекулно-биологични методи.

3. За първи път е разработена схема за MLVA анализ на представители от видовете *X. euvesicatoria* и *X. vesicatoria* и са конструирани праймери за идентификацията им.

4. Оригинален характер имат резултатите за доказване наличието на гените, кодиращи синтеза на TAL ефекторни белтъци в патогенни видове от региона и конструирани за тази цел праймери.

5. Направени са първи стъпки в разработването на нови стратегии за борба с патогените от видовете *X. euvesicatoria* и *X. vesicatoria*.

Част от резултатите са включени в 8 научни публикации, 3 от тях са в списание с IF (две са в ВВЕq и една в Bulg. J. Agric. Sci.), 3 са в международни реферирани списания и 2 – в български нереферирани списания. Представени са резултати и на 12

научни форума, от които 5 международни. Таца Ванчева е на първо място в 4 статии и 8 доклада. Тези данни ми дават основание да направя извода, че в основната си част, резултатите са дело на докторантката и научната общност е запозната с тях.

Авторефератът отразява достоверно най-съществените резултати, получени при разработката на дисертационния труд.

В заключение искам да подчертая, че: материалът е дисертабилен, разработена е много актуалната тема, която предлага нова информация за създаване на стратегия за борба със загубите на земеделска продукция. Експериментите са поставени методично правилно, получените резултати са достоверни и са солидна база за следващи научни и приложни разработки. Извършена е огромна експериментална работа, като поставеният проблем е многостранно и детайлно проучен на съвременно ниво, направени са съществени приноси, получени са резултати, които пряко са адресирани към практиката.

Докторантката е усвоила голям брой съвременни методи, запознала се е основно с важен за науката и практиката проблем, получила е опит при интерпретиране на научни данни и всичко това ѝ дава квалификация на млад учен, достоен конкурент на колеги от известни лаборатории.

Въз основа на направения разбор и на доказаното израстване на докторантката, предлагам на уважаемите членове на научното жури, сформирано със заповед № РД 38-649/30.10.2015 г. на Ректора на Софийския Университет „Св. Климент Охридски”, да присъдят на Таца Атанас Ванчева образователната и научна степен “доктор” по професионално направление 4.3 Биологични науки, специалност 01.06.12 Микробиология.

28. 11. 2015 г
София

Рецензент:.....
/проф. М. Ангелова, дбн