

РЕЦЕНЗИЯ

на дисертационния труд на **Владимир Павлов Александров** от Катедра „Биофизика и радиобиология“ при Биологически факултет на СУ „Св. Кл. Охридски“

Рецензент: проф. д-р **Евгени Ананиев**, Катедра Физиология на растенията”, Биологически факултет, СУ „Св. Кл. Охридски”

Тема на дисертацията: „Използване на математически подходи за анализ на стресови реакции на фотосинтетичния апарат при висшите растения”

Научен ръководител: проф. д-р **Василий Голцев**, БФ при СУ

Предмет на дисертационния труд се явява изследването на отговора на фотосинтетичния апарат на различни по своята таксономична класификация растения към липсата/дефицита на минерални елементи. Растенията са уникални по своята ефективност организми. Те са способни, въпреки неподвижния си начин на живот, да се развиват и възпроизвеждат на базата на усвояването само на три физически компонента – вода от почвата, енергията на слънчевата светлина и минерални елементи, които те получават от земната кора. Уникална способност на клетките на корена е да концентрират минерални елементи в ксилемния сок против концентрационния градиент само благодарение на силата на водния /масов/ поток в почвата. В този смисъл е много уместно сравнението на Епщайн, 1999 г., че в тази си роля растенията се изявяват като „миньорите“ на земната кора, единствено способни да доставят на целия останал организъм свят ценни минерални елементи. В светлината на този феномен, избраната от дисертанта цел да бъде изследван отговора на растенията спрямо отсъствието и/или недостига поотделно на някои от 7-те макро- и 9-те микроелемента е много актуален. От всички видове абиотичен стрес, стресът спрямо минерални хранителни елементи е най-малко изучен в съвременната физиология на растенията. Основната цел и поставените конкретни експериментални задачи да се изследват в пълнота активността на ФСII и частично ФСI посредством метода на хлорофилната флуоресценция с помощта на съвременния флуорометър M-PEA е напълно оправдана от фундаментална научна и от приложна гледна точка. На последно, но не по значение място, актуалността на

дисертационния труд силно нараства и от прилагането на модерни математически методи за квалифициран анализ на биоданни, при които да бъдат организирани и „обучени“, изкуствени мрежи от неврони /ИМН/, които да могат да разпознават и да „предсказват“ отговора на фотосинтетичния апарат и растението като цяло спрямо избран минерален стрес.

Дисертацията е построена по класическия за такъв тип научен труд образец. Състои се общо от 157 стр. вкл. Увод /2 стр./, Литературен обзор /31 стр./, Цел и задачи /2 стр./, Методи и материали /18 стр./, Резултати и дискусия /75 стр./, Изводи /2 стр./, Приноси /1 стр./, Литература /12 стр./ Към дисертацията са включени 3 Приложения /5 стр./, които съдържат програмните кодове на Matlab за обработка на информацията от индукционните криви на бързата флуоресценция, както и за конструиране на изкуствени невронни мрежи /ИНМ/.

Литературният обзор е много богат и включва широк спектър от публикации, /295 бр./, вкл. от последните 5 години. Обзорът може формално да бъде разделен на две части. В първата се прави много подробна и задълбочена характеристика на структурата и функцията на четирите основни белтък-пигментни комплекси участващи във фазата на тилакоидните реакции на ФС - на двете фотосистеми – ФС II и ФС I, ЕТВ с пластохиноновия пул, Цитохром b_6/f комплекса, както и на АТФ-синтазния комплекс. Информацията е илюстрирана с 5 цветни схеми /фигури/ от обзори на авторитетни учени от последните години. Към обзора спада и детайлната функционална характеристика на флуоресценцията на хлорофил „а“ в нейните проявления – бърза /БФ/ и забавена флуоресценция /ЗФ/, както и параметрите на JIP-теста и сигнала на MP820. Този набор от методи представлява и основната експериментална база, върху която се надграждат различни съвременни математически подходи – статистически методи и числови решения, които от своя страна представляват и основния теоритичен принос на дисертационния труд. Втората част на обзора разглежда проявите на абиотичен стрес при растенията /физиология на стреса/. Главно внимание е отделено на стреса, предизвикан от липсата на единични представители на основните хранителни /минерални/ елементи. Разгледани са физиологичната роля и фенотипните прояви при отсъствие на 6 /азот, фосфор, сяра, калий, калций, магнезий/ от общо 7 макроелемента, както

и на 6 /манган, бор, хлор, цинк, мед, желязо/ от общо 9-те микроелемента на растителната клетка.

Разделът „Методи и материали“ включва описание на физиологичната част на опитите с 5 вида растения /фасул, царевица, домати, грах и живовляк/. Постановката е сложна, защото за ефекта на засушаването са използвани почвени култури /за фасула и живовляка, при последния с почва от естествените местообитания/, докато при опитите с недостиг на минерални елементи са използвани водни хранителни разтвори. **Към този раздел възниква един принципен въпрос: след като отсъствието на 1 минерален елемент е прилагано в течение на 14 дни върху млади 13 -дневни растения, развити в нормална минерална среда, може ли да се приеме термина „дефицит“ в строгия смисъл на думата и ако да, в каква степен е той изразен – слаб, умерен или силен. Не би ли могло да бъде използвани термините „отсъствие“ или „липса“ на минерални елементи /дисертантът на много места прилага тези термини/? Имате ли данни /собствени или литературни/, при тази схема на опита, какво е остатъчното ендогенно съдържание на дадения елемент в растителната клетка, тъкан или орган?**

В същия раздел се прави много подробен анализ с всички параметри на измерването на индукционните криви на БФ и ЗФ, както и на модулирания сигнал при 820 nm. За целта дисертантът е използвал най-съвременния флуориметър М-РЕА (Hansatech Instruments, UK), който дава възможност за едновременното изследване на активностите на ФСII и ФСI. Дисертантът е имал възможността да се възползва от всички достижения на научното звено и ръководителя му, които определено са с водеща роля в този тип флуорисцентни изследвания.

Много важна част от дисертационния труд представлява използвания сложен статистически анализ в неговата математическа сложност и пълнота. За основа е послужил метода за анализа на главните компоненти (РСА), който се явява най-разпространения метод за квалификационен анализ на резултатите от биологичните експерименти. Този анализ е използван не само като част от статистическия анализ на данните, но е надграден в ролята му на класификатор на данни при изграждането на т.н. изкуствени невронни мрежи /ИНМ/. Тези съвременни

компютърни модели за качествен анализ на данни са разгледани с достатъчна пълнота и дълбочина от дисертанта в тяхната по-опростена форма и като многослойна функция. В допълнение са разгледани и самоорганизиращите се невронни мрежи /СOM/, които се прилагат по-рядко във флуоресцентния анализ.

В заключение към анализа на този раздел, считам, че основният методичен принос на дисертацията е паралелното използване на физиолого-биохимични и математически методи за анализ и предвиждане на реакцията на фотосинтетичния апарат към стрес, породен от минерален липса/дефицит.

В разделът „Резултати и обсъждане“ са представени в съответната последователност резултатите от проведените изследвания. Считам, че по-важните от физиологичните експерименти могат да бъдат систематизирани както се следва:

Резултати с минерален дефицит/липса върху БФ

- 1. Отсъствието на един от 6-те макроелемента в течение на 14 дни в хидропонни култури на млади фасулеви растения води до потискане на активността на ФСЦ, което се изразява най-отчетливо чрез индекса на производителността (PI_{total} ; PI_{ABS}). Този ефект е съпроводен от усилено затваряне на реакционните центрове на ФСЦ /Mo-параметър/ и нарастване на енергията на възбуждане на един реакционен център (TRo/RC). Най-силен инхибиторен ефект се наблюдава при недостиг/липса на Ca^{2+} и S, когато се засягат повече параметри, вкл. тези, които се отнасят и до активността на ФСЦ.**
- 2. Липсата на микроелементи също предизвиква намаляване на активността на ФСЦ (PI_{total} ; PI_{ABS}) при фасулевите растения с изключение на елементите В и Cl, при които този показател не намалява, а даже нараства.**
- 3. Сравнителният анализ на липсата/недостига на отделни макроелементи при фасул, царевица и грах показва, че най-чувствителен към този стрес се явяват фасулевите растения. В условията на експеримента граховите растения демонстрират най-**

висока степен на толерантност, изразена даже в увеличаване на индекса на производителност на ФСП (PI_{total} ; PI_{ABS}).

Тези резултати ясно подчертават силния инхибиторен ефект на недостига/липсата на основните макро- и микроелементи върху функционалната активност на ФС. Възниква въпроса как би могло да бъде обяснено нарастването на индекса на производителност на ФСП при фасула и граха, в случаите респективно на недостиг на микро /бор, хлор/ и макроелементи /калций, магнезии/, /Фиг. 24 и 26 и Фиг. 28 и 29/. Каква е възможната корелацията на тези резултати с общото състояние на растенията, вкл. степента на техния растеж и развитие. Разполага ли дисертанта с морфометрични данни /височина на растенията, свежо и сухо тегло на отделни органи/, които да подкрепят тези интересни резултати.

Резултати с минерален дефицит/липса върху ЗФ

4. **За разлика от индукционните криви на БФ, кривите при ЗФ показват по-отчетливи различия по отношение на липсата на минерални елементи. Най-силен инхибиторен ефект върху параметрите на ЗФ оказва отсъствие на макроелементите N, Ca и P. При микроелементите най-силно е потискането на ЗФ в отсъствие на Fe и Cl. Спецификата на ИК на ЗФ може да се използва като индикатор за недостиг/отсъствие на минерални елементи.**

Получените резултати дават основание да бъдат посочени и следните по-важни приноси на дисертационния труд.

1. **За първи път е направен паралелен физиолого-биохимичен и математически анализ на индукционните криви на бързата и забавена флуоресценция като мярка за интензивността на фотосинтезата в условията на липса/недостиг на макро и микроелементи при различни по своята класификация растения. Чрез използване статистическия метод на анализ на независимите компоненти (ICA) е постигнато по-детайлно изследване на ИК на БФ и ЗБ. Тези резултати са използвани за създаване на невронни мрежи с по-висока ефективност на работа.**

2. Чрез прилагане на утвърдения статистически метод за анализ на данни от биологични експерименти PCA /анализ на главните компоненти/ е показано, че ИК на БФ могат да бъдат успешно прилагани за предварително разпознаване и предсказване на ефекта на дефицити/липса на основни макро- и микроелементи.
3. С помощта на параметрите на JIP-анализа е изследван отговора на различни по таксономическа принадлежност растения към липсата на отделни макро- и микроелементи. Най-чувствителна е фотосинтетичната активност при отсъствието на макроелементите Ca^{2+} и S.
4. Постигнато е „обучение“ на изкуствена невронна мрежа (ИНМ) с висока степен за разпознаване (95%) на дефицити на макро- и микроелементи при широк кръг растения.
5. Чрез предварителна статистическа обработка на данните по метода на независимите компоненти (ICA) е създадена и „обучена“ ИНМ от типа „самоорганизираща се мрежа“ като е постигнат максимално висок процент за предварително разпознаване на минерални дефицити (95.5%)

По дисертационния труд има излезли от печат 3 публикации – и трите в списания с Импакт Фактор /2 в *Bulg. J. Agr. Sci.* и 1 в *Biochem. Biophys. Acta.*, 2012/. Последната статия в ВВА е с много висока научна стойност и е в съавторство с проф. Рето Щрасер, Швейцария, учен от световна величина. Във връзка с темата на дисертацията, дисертантът е участвал с постерни или устни съобщения в 7 международни и национални научни конференции и симпозиуми.

Заключение: Дисертационният труд на Владимир Александров представлява широкомащабно и задълбочено изследване на реакцията на фотосинтетичния апарат на различни по своята таксономическа принадлежност растения към абиотичен стрес, вкл. липсата или недостига на растенията към единични представители на основните макро- и микроелементи в растенията. Анализът на фотосинтетичната активност в условия на минерален дефицит само

по себе си е много актуален проблем и всяко подобно изследване е с висока научна стойност. Резултатите от дисертационния труд на В. Александров могат да бъдат оценени много високо тъй като представляват комбинация от съвременни физиолого-биофизични методи за изследване на фотосинтетичния апарат с висока разрешителна способност (М-РЕА флуоресцентен анализ) и модерните методи на математическата статистика и анализ. **Всичко това ми дава основание убедено да препоръчам на Научното жури, както и на Факултетния научен съвет на БФ, да даде исканата образователна и научна степен «ДОКТОР» на Владимир Павлов Александров.**

София, 25.04. 2016 г.

Изготвил рецензията:

/Е. Ананиев/