Р Е Ц Е Н З И Я

на дисертационен труд за присъждане на образователната и научна степен „доктор“

професионално направление 4.3. Биологически науки,

докторска програма „Биохимия“

Автор: ас. Стефан Светославов Савов

Тема: „Биотични фактори, модулиращи отношенията между паразитни цветни растения от род Cuscuta и техните гостоприемници“

Научни ръководители: доц. дн Любен Загорчев и доц. д-р Деница Теофанова

Рецензент: проф. д-р Красимир Русанов

Настоящата рецензия е изготвена във връзка с процедурата за защита на дисертационния труд на ас. Стефан Светославов Савов за придобиване на образователната и научна степен „доктор“. Представеният труд е разработен в Катедра „Биохимия“ на Биологическия факултет на Софийския университет „Св. Климент Охридски“. Дисертацията е в обем 119 страници и включва въведение, литературен обзор, цел и задачи, материали и методи, резултати, дискусия, изводи и приноси. Трудът е онагледен с 39 фигури и 4 таблици и се основава на 114 литературни източника. Част от изследванията са извършени в Университета на Катания, Италия, и Университета на Инсбрук, Австрия.

1. Кратки биографични данни за докторанта

Ас. Стефан Светославов Савов е възпитаник на Биологическия факултет на Софийския университет „Св. Климент Охридски“. През 2021 г. завършва бакалавърска степен по „Молекулярна биология“, а през 2023 г. придобива магистърска степен по „Биохимия“. От 2024 г. е докторант по докторска програма „Биохимия“, професионално направление 4.3. Биологически науки. От 2021 до 2023 г. работи като преподавател по биология, а от 2023 г. заема академичната длъжност „асистент“ в Департамента за езиково обучение и продължаваща квалификация на Софийския университет.

Професионалните му интереси са насочени към молекулярния отговор на растенията към биотичен стрес, хроматографските методи за анализ на нискомолекулни съединения и генетичните анализи на растителни популации. В рамките на докторантурата е провел специализации в Университета на Инсбрук, свързани с HPLC анализ на хормонални,

антиоксидантни и пигментни изменения при растения в следствие на биотичен стрес, и в Университета на Катания, насочени към изследване на почвения и ендофитния микробиом при растения в следствие на биотични фактори. Участва в шест научноизследователски проекта финансирани от Националния план за възстановяване и устойчивост, Фонд „Научни изследвания“, СУ „Св. Климент Охридски“ и е представял резултати на национални и международни научни форуми посредством 12 постера и един доклад. Представената научна продукция, свързана с дисертацията, включва две публикации в реферирани международни списания, като в едната докторантът е първи автор. Научната статия представяща резултати от дисертационния труд е публикувана в списание PhytoKeys с квартил Q2, а втората публикация представляваща обзорна статия в списание Pathogens с квартил Q1.

2. Научна актуалност

Темата на дисертационния труд е актуална и се вписва в съвременните направления на растителната биохимия, молекулярната физиология и екологията на взаимодействията между организмите. Паразитните покритосеменни растения и по-специално представителите на род *Cuscuta*, имат съществено стопанско значение, но едновременно с това представляват ценен биологичен модел за изследване на междувидовата сигнализация, преноса на молекули и адаптивните промени, съпътстващи паразитния начин на живот.

В труда е възприет по-широк подход от традиционното разглеждане на двойката паразит - гостоприемник. Анализирани са два допълнителни биотични компонента: галообразуващите фитофаги от род *Smicronyx* и асоциираните с паразита и гостоприемниците микробни съобщества. Така обектът е разгледан като сложна биологична система, в която физиологичното състояние на паразитното растение се определя от взаимодействието на няколко организма. Особена актуалност има включването на епигенетичен анализ, тъй като данните за ролята на ДНК метилирането при взаимодействията между паразитни растения и фитофаги са все още ограничени.

Изследването има фундаментална значимост за изясняване на механизмите на биотичния стрес и може да има бъдещо приложно значение при разработването на екологично съобразени подходи за ограничаване на паразитните растения и за оценка на потенциала им като резервоари или вектори на микроорганизми.

3. Познаване на проблема

Литературният обзор обхваща основните аспекти, необходими за мотивиране на експерименталната работа: разнообразието и биологията на паразитните растения, молекулярните маркери за стрес, реактивните кислородни видове, нискомолекулните водоразтворими и липоразтворимите антиоксиданти, антиоксидантните ензими, фитохормоните, PR-белтъците, епигенетичните изменения, ролята на *Cuscuta* като възможен вектор на патогени и инсектома на рода. Структурата му следва научната логика на дисертацията и подготвя формулирането на двете работни хипотези.

Авторът показва добро познаване на съвременната литература и правилно идентифицира области, в които наличните знания са непълни: физиологичните последствия от галообразуването при *Cuscuta*, епигенетичната регулация на този процес и връзките между ендофитните съобщества на паразита и гостоприемника. Литературният обзор е информативен и достатъчен по обем. Обзорът доказва, че докторантът познава проблема и може да постави собственото си изследване в контекста на международните научни разработки.

4. Цел и задачи

Целта е формулирана като идентифициране на биохимичните и молекулярните механизми, стоящи в основата на промените, предизвикани от биотични фактори при *Cuscuta campestris*. Тя е развита чрез две научни хипотези. Първата допуска, че галообразуването предизвиква стресов отговор, подложен на хормонална и епигенетична регулация. Втората предполага двупосочни отношения между паразита, ендофитните съобщества и ризосферния микробиом на гостоприемника.

Поставените седем задачи са конкретни, логически свързани и проверими. Те включват оценка на редокс и антиоксидантния отговор, анализ на фитохормоните, експресията на гени за PR-белтъци, анализ на ДНК метилирането, както и характеризиране на ендофитния и почвения микробиом. Последователното изпълнение на задачите осигурява проверката на формулираните хипотези.

5. Методика на изследването

Приложеният широк набор от експериментални методи съответства напълно на интердисциплинарния характер на труда. Използван е растителен материал от *C. campestris*,

събран от различни находища, както и лабораторна система с гостоприемниците *Arabidopsis thaliana* и *Thellungiella salsuginea*. Видовата принадлежност на представителите на *Cuscuta* е оценена чрез RAPD профили. За количествено определяне на водоразтворими антиоксиданти, токохроманоли, пигменти и фитохормони са приложени HPLC и LC-MS методи. Относителната експресия на избрани гени за PR-белтъци е определена чрез qPCR.

Епигенетичните промени са изследвани чрез бисулфитно секвениране и биоинформатичен анализ на диференциално метилирани региони с последващо функционално обогатяване. Ендофитните и почвените бактериални съобщества са характеризирани чрез ампликонно секвениране на V3-V4 областта на 16S рДНК и обработка в QIIME 2. Използвани са подходящи статистически процедури за сравнение на биохимичните показатели, генната експресия, метилирането и микробиомното разнообразие.

Съчетаването на количествена хроматография, qPCR, метиломен и микробиомен анализ позволява биотичният отговор да бъде проследен на метаболитно, транскрипционно, епигенетично и екологично ниво. Това е съществено предимство. Методите са описани в достатъчна степен и са подкрепени с литературни източници. Като ограничения могат да се посочат използването на RAPD като маркерна система с по-ниска възпроизводимост спрямо секвенционно базирани подходи, както и фактът, че 16S ампликонното секвениране характеризира надеждно различията в таксономичния състав и разнообразието на бактериалните съобщества, но функционалната роля на установените таксони, механизмът на предполагаемия им пренос и причинно-следствените им отношения с паразита и гостоприемника остават предмет на допълнително валидиране. Тези ограничения са приемливи спрямо конкретните задачи и не поставят под съмнение основните резултати.

6. Оценка на получените резултати и тяхната дискусия

Резултатите са организирани в две взаимно свързани тематични направления: отговорът на *C. campestris* към галообразуващите насекоми и взаимодействията на паразита с ендофитния и почвения микробиом. Предварителното създаване на референтни RAPD профили за четири вида *Cuscuta* осигурява контрол върху видовата идентичност на материала и има самостоятелна методична стойност.

При галообразуването са установени съществени промени в глутатионовия метаболизъм. Концентрацията на редуциран глутатион е по-висока в галите и заразените

стъбла, а високото съотношение GSH/GSSG и по-редуциращият потенциал показват ефективно поддържане на редокс хомеостазата. Данните подкрепят тезата за активиран превантивен антиоксидантен отговор, а не за неконтролирано оксидативно увреждане. Промените в прекурсорите и продуктите на глутатионовия обмен, както и селективното натрупване на α-токоферол, дават допълнителни аргументи за метаболитно пренастройване на засегнатите тъкани.

Пигментният профил разкрива необичайно активиране или реорганизиране на фотосинтетични компоненти в галите. Увеличените концентрации на хлорофил a, лутеин и виолаксантин, появата на α-каротен и измененията в ксантофилния цикъл са интерпретирани като състояние, функционално наподобяващо адаптация към слаба светлина. Тази интерпретация е интересна и оригинална, макар че нейното окончателно доказване би изисквало преки фотохимични измервания, например флуоресценция на хлорофила, газообмен или анализ на фотосистемните белтъци.

Хормоналният анализ показва координиран отговор, при който растежните процеси, необходими за формиране на галата, се съчетават със защитна сигнализация. Данните насочват към водещо участие на абсцисиевата и жасмоновата киселина и са подкрепени от повишена експресия на част от изследваните PR-гени. Съчетаването на метаболитни и транскрипционни данни придава по-голяма убедителност на извода, че галата не е просто патологично образувание, а регулирана система, в която се балансират интересите на растението и развиващата се ларва.

Най-оригиналната част на труда е анализът на метиломните изменения. Установени са глобални различия в профила на метилиране между стъбла и гали, идентифицирани са диференциално метилирани региони и са анализирани свързаните с тях гени и метаболитни пътища. Резултатите подкрепят хипотезата, че галообразуването е съпроводено с епигенетично препрограмиране на метаболизма на *Cuscuta*. Важно е обаче да се разграничат установените асоциации от пряка причинност: функционалната роля на отделни DMR и връзката им с експресията на съответните гени предстои да бъдат потвърдени чрез интегриран метиломно-транскриптомен анализ.

Микробиомните изследвания показват, че съставът на ендофитните бактериални съобщества на *C. campestris* зависи в значителна степен от вида на гостоприемника.

Установеното припокриване на таксони е съвместимо с потенциален обмен на микроорганизми през хаусториалната връзка, като предполагаемият потенциал за пренос се различава между гостоприемниците. Същевременно ампликонните данни сами по себе си не могат да докажат посоката или механизма на преноса, поради което формулировката за векторна роля следва да се приема като добре аргументирана хипотеза, която изисква проследяване на конкретни щамове или експериментално маркирани микроорганизми.

При почвения микробиом водещ фактор е идентичността на растението-гостоприемник, докато ефектът на *Cuscuta* е по-слаб и се проявява основно чрез промени в относителното представяне на отделни таксони, без общо нарушаване на алфа-разнообразието. Тази умерена интерпретация е научно коректна и показва, че авторът не преувеличава ефекта на паразита. Разделът „Дискусия“ съпоставя резултатите с наличната литература и обсъжда потенциалните биологични процеси, стоящи в основата на наблюдаваните ефекти. Дискусията е задълбочена и демонстрира самостоятелно научно мислене.

7. Изводи и научни приноси

Формулирани са шест основни извода, които съответстват на поставените задачи и на двете работни хипотези. Те са кратки и следват от резултатите. Приносите на труда могат да бъдат систематизирани като оригинални, допълващи и научно-приложни.

Към оригиналните фундаментални приноси отнасям: доказването, че галообразуването при *C. campestris* е съпроводено с координирани редокс, хормонални и транскрипционни изменения; установяването на диференциално метилирани региони и епигенетично препрограмиране при взаимодействието с галообразуващи насекоми; характеризирането на ендофитните бактериални съобщества на *C. campestris* в България и демонстрирането на силен гостоприемник-зависим ефект върху техния състав; установяването на фини промени в почвения микробиом, свързани с паразитизма.

Допълващ характер имат количествените данни за глутатионовия метаболизъм, токохроманолите, пигментите, фитохормоните и PR-гените, които разширяват познанията за защитния отговор на паразитните растения. Методичен и научно-приложен принос е валидирането на RAPD подход за разграничаване на изследваните видове *Cuscuta* и

натрупването на данни, релевантни към оценката на паразитните растения като потенциални резервоари и преносители на ендофитни микроорганизми.

Считам, че авторските приноси са реални и съответстват на представения материал. Най-значим между тях е епигенетичният анализ, който открива възможности за бъдещо функционално изследване на регулацията на галообразуването.

Общата ми оценка е, че дисертацията съдържа достатъчен брой оригинални научни резултати, които надхвърлят обичайното ниво, очаквано при разработка за придобиване на образователната и научна степен „доктор“.

8. Автореферат

Авторефератът е в обем 38 страници и отразява адекватно структурата и основното съдържание на дисертацията. Представени са актуалността, целта и задачите, използваните методи, основните резултати, изводите, приносите и публикациите. Фигурите дават възможност да бъдат проследени най-съществените експериментални резултати. Обемът му съответства на изискванията за подобен вид разработка, а изложението е ясно и последователно. Не установих съществени несъответствия между автореферата и дисертационния труд.

9. Критични бележки и въпроси

Критичните ми бележки са предимно препоръчителни. Първо, липсва единна обобщаваща схема, която да свърже редокс измененията, фитохормоналната сигнализация, експресията на PR-гени и метиломното препрограмиране в общ модел на взаимодействието *Cuscuta* - *Smicronyx*. Второ, заключенията от 16S ампликонния анализ следва да бъдат формулирани предпазливо, тъй като таксономичната принадлежност не е равнозначна на доказан пренос или функционална роля. Трето, част от изводите за активирана фотосинтеза в галите са основани на пигментния състав и биха били по-убедителни при наличие на преки физиологични измервания. Четвърто, връзката между DMR и промени в генната експресия остава асоциативна и заслужава последващо експериментално валидиране.

Към докторанта поставям следните въпроси:

1. Кои диференциално метилирани региони или свързани с тях гени бихте избрали с най-висок приоритет за функционално валидиране и на какви критерии се основава този избор?

2. Какъв експериментален дизайн бихте предложили, за да разграничите директен пренос на ендофитни бактерии през хаусториите от независимо заселване на паразита и гостоприемника от общата среда?

10. Заключение

Дисертационният труд на ас. Стефан Светославов Савов представлява завършено и оригинално научно изследване върху актуален и недостатъчно разработен проблем. Използван е широк набор от съвременни биохимични, молекулярни, епигенетични и микробиомни методи. Получените резултати разширяват знанията за отговора на паразитните растения към галообразуващи фитофаги и за отношенията между паразита, гостоприемника и асоциираните микробни съобщества. Докторантът демонстрира способност за самостоятелно планиране, изпълнение и интерпретиране на сложни експериментални изследвания.

Резултатите са представени в две публикации в международни реферирани списания и на редица научни форуми. Представената справка показва изпълнение на минималните национални изисквания за придобиване на образователната и научна степен „доктор“. Направените критични бележки не поставят под съмнение достоверността и научната стойност на основните резултати.

Въз основа на цялостната ми оценка считам, че дисертационният труд отговаря на изискванията на Закона за развитието на академичния състав в Република България, Правилника за неговото прилагане и съответните вътрешни правила на Софийския университет „Св. Климент Охридски“. Давам положителна оценка и убедено препоръчвам на уважаемото научно жури да присъди на ас. Стефан Светославов Савов образователната и научна степен „доктор“ в професионално направление 4.3. Биологически науки, докторска програма „Биохимия“.

гр. София

05.08.2026г. /проф. д-р Красимир Русанов/