Рецензия

върху дисертационен труд за придобиване на образователната и научна степен "доктор" по професионално направление 4.3 "Биологически науки", докторска програма "Биохимия".

Тема на дисертационния труд: "Биотични фактори, модулиращи отношенията между паразитни цветни растения от род *Cuscuta* и техните гостоприемници"

Автор на дисертационния труд: Стефан Светославов Савов, задочен докторант към Катедра „Биохимия", Биологически факултет, Софийски университет „Св. Климент Охридски"

Рецензент: Георги Николаев Бончев, доцент в ИФРГ-БАН, лаборатория "Геномна динамика и стабилност", доктор по научната специалност Генетика

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

Данни за докторанта

Стефан Светославов Савов е завършил висше образование през 2023 г. и придобил магъстърска степен по Биохимия към Биологически факултет на СУ„Св. Климент Охридски". Зачислен е като задочен докторант през 2024 г. към Катедра „Биохимия", като в същото време е асистент по биология към Департамент за езиково обучение и продължаваща квалификация, СУ „Свети Климент Охридски". Научните интереси на докторанта са в областта на молекулярните отговори на растения срещу биотичен стрес, хроматографски методи за анализ на нискомолекулни съединения в растения, генетични анализи на растителни популации.

От направената автобиографична справка на Стефан Савов Създава се създава представата за активен и целенасочен млад човек, активно въвлечен в научни разработки с участие в 6 проекта (от които два са свързани с докторантурата), 13 участия в конференции от които в 5 се представят резултати от изследванията по докторантурата, както и е осъществил две специализации в Италия и Австрия. За защита на дисертационния си труд Стефан Савов е представил необходимите документи в съответствие с Правилника за условията и реда за придобиване на научни степени и заемане на академични длйжности в СУ „Св. Климент Охридски".

Обща характеристика на дисертационния труд – обем и структура

Дисертационният труд е написан на 119 стр. и е структуриран според изискванията на Закона за развитие на академичния състав на Република България (ЗРАСРБ) за придобиване на

образователната и научна степен „доктор”. Дисертацията включва разделите: Въведение (2 стр.), Литературен обзор (23 стр.), Цел и задачи и работни хипотези (1 стр.), Материали и методи (14 стр.), Резултати (38 стр.), Дискусия (10 стр.), Изводи и Приноси произтичащи от постигнатите резултати (2 стр.), както и Литературни източници (12 стр.) с цитирани 114 източника. Дисертационният труд е онагледен с 4 таблици и 39 фигури. Даден е подробен списък на използваните съкращения. В края на дисертационния труд е дадена библиографска справка за две научни публикации на докторанта по темата на дисертацията – една обзорна статия в списание Pathogens и една научно-експериментално в списание PhytoKeys, като и двете са реферирани и индексирани в Scopus с Q1 и Q2 съответно. Дисертационният труд е добре структуриран и оформен прегледно.

Актуалност и значимост на научната проблематика

Изясняването на видовете взаимодействия между организмите и екологична динамика в живата природа е от значение както от чисто научен аспект касаещ познанията ни за динамиката на биоразнообразието, но и като основа за приложения за нуждите на човека в различни сфери включително селскостопанската практика. Темата на дисертационния труд касае проучването на едно по-детайлно генетично-молекулярно и биохимично ниво на биотичните взаимодействия при паразитното растение *Cuscuta campestris* (кукувича прежда) в две експериментални постановки: а/ взаимодействие с насекомо *Smicronyx* sp. при образуване на гали по растението и б/ анализ на ендофитния и ризосферен микробиом в кукувича прежда и различни гостоприемници в процеса на тяхното взаимодействие.

Въпреки наличните в литературата данни по отношение на различни биотични фактори, влияещи върху взаимоотношенията паразит-гостоприемник, все още ненапълно са изяснени механизмите, стоящи в основата на модулиращия им ефект. Именно разкриването на промените, предизвикани от биотични фактори, е залегнало в целите на настоящия дисертационен труд. Тематиката е актуална и поради това, че доколкото е известно все още няма подробни изследвания за динамиката в състава и преноса на микроорганизми между *Cuscuta* sp. и негови гостоприемници. Получените данни имат научно-приложно значение за разработване на потенциални методи, включително с използване на ендофитни патогени, за създаване на биохербициди за ограничаване на разпространението и заразяването с кукувича прежда и други паразитни растения, особено в случаите, когато са засегнати културни растения.

Анализ и оценка на дисертационния труд

Литературният обзор на дисертационния труд е представен в 4 раздела, даващи изчерпателна обща картина за разнообразието и характеристиките на паразитните растения с фокус върху род *Cuscuta* - физиология, растения-гостоприемници, взаимодействие с насекоми специфично използващи *Cuscuta* sp. като източник на хранителни ресурси (напр. насекоми от род *Smicronyx*). Подробно са описани молекулни маркери (антиоксидантни молекули, фитохормони и PR белтъци със специфични функции за защита срещу патогенеза, промени в епигенома) за оценка на биотичния и абиотичен стрес при растенията.

> ***Забележка:*** Във тази част не е наблегнато на актуалността на научната проблематика, както и липсва литературна справка за наличие на конкретни предходни изследвания в България и по света, насочени по тематиката на докторантурата. Например що се отнася до приложението на ДНК метабаркодиране за изучаване на взаимодействия растение паразит- гостоприемник.

В раздел ***Цели и Задачи*** докторантът е изложил ясно основната цел, а именно да се *идентифицират биохимичните и молекулярни механизми, стоящи в основата на промените, настъпващи в следствие на влияние на биотични фактори върху паразитното растение Cuscuta campestris.*

Постигането на тази цел е планирано чрез два експериментални подхода:

1. Анализ на стресовия отговор при растение *Cuscuta* при галообразуване индуцирано от насекомо от род *Smicronyx*. Изказана е хипотеза, че галообразуването от *Smicronyx* sp. води до стресов отговор при паразитното растение на хормонално и епигенетично ниво.

2. Анализ на микробната динамика при взаимодействие на растение *Cuscuta* с растение-гостоприемник на ниво ендофитен и ризосферен микробиом. Предложена е хипотеза за съществуване на тесни връзки и взаимодействия както между *Cuscuta* sp. и ризосферните микроорганизми на гостоприемника и между ендофитните съобщества на паразит-гостоприемник .

Поставените задачи за верифициране на поставените хипотези в рамките на научните изследвания са адекватни.

> ***Забележка:*** Смятам, че Хипотеза 2 не е формулирана достатъчно ясно и коректно относно типовете взаймодействия които се планират за проучване: а/ взаимодействие между паразитното растение и неговия микробиом (като не се подразбира какъв очакван модулиращ ефект се има предвид и върху какво); б/ Не е коректно да се говори за ризосферен микробиом само на един от играчите (растение-паразит или гостоприемник). Ризосферният микробиом е съвкупност от този на двата вида растения и трябва да се отчита и микробиома на *Cuscuta*.

В раздел ***Материали и методи*** е описан ясно растителния материал като произход, подход на пробовземане и съхранение, комбинации растение-патоген/растение-гостоприемник.

Използваните методи са адекватни и позволяват осъществяване на поставените задачи. Силна страна на дисертационния труд е широкият арсенал от използвани методи в различни области като изолиране на геномна ДНК и РНК, RAPD, LC-MS, HPLC, qPCR, метилационен анализ чрез бисулфитно секвениране, метабаркодиране, биоинформатични анализи. Това позволява постигането на интердисциплинарен характер на изследванията в дисертационния труд. Отделните методи са описани подробно включително и статистическите и биоинформатични подходи за анализ: *4.2 HPLC анализ* на растителни хормони, пигменти (хлорофили и каротеноиди) и токофероли, антиоксиданти; *4.3 RAPD* анализ като подход за генотипиране на различни видове *Cuscuta*; *4.4 qPCR методи* за анализ на диференциална експресия на PR белтъци; *4.5 Метиломен анализ чрез бисулфитно секвениране*; *4.6 Микробиален анализ - 16S ампликонно секвениране* на ендофитния и почвен микробиом при различни комбинации паразит-гостоприемник.

Забележки: В т. 4.6.1 Ендофитен микробиом, е написано „Качествена оценка на изолираната бактериална ДНК е направена……..“. Според мен изказът бактериална ДНК не е точен в контекста, защото в действителност изолираната ДНК от галите е тотална и съдържа и растителна и микробиална ДНК. Желателно е да бъде представено по-подробно описание на метода ДНК метабаркодиране.

В раздел ***Резултати*** са представени в хронологичен ред резултатите по основните изследвания, като са унагледени с 34 фигури. Показано е, че RAPD маркерите позволяват разграничаване на отделните видове *Cuscuta* и са полезни за създаване на референтни ДНК профили за таксономично определяне. Първа основна тема в дисертационния труд е *анализ на стресовия отговор при растение Cuscuta при галообразуване индуцирано от насекомо от род Smicronyx* при три вида проби – гали (Г), стъбла от кукувича прежда в близост до галите (КГ) и стъбла от *Cuscuta* sp. без гали (КБГ). Наблюдава се диференциална експресия на антиоксидантни ензими при биотичен стрес индуциран от ларвите на галообразуващи насекоми *Smicronyx* sp.: повишена концентрация на редуциран глутатион (GSH) в галите; по-нисък редукционен потенциал при заразените растения; по-висока концентрация на α-токоферол в галите, предполагащо засилена нужда от липидна антиоксидантна защита. Наблюдава се и повишение в концентрацията на „хлорофил а“ в галите, което сочи в посока увеличен капацитет за първични фотохимични реакции. Наблюдава се понижение при различни видове каротеноидни пигменти, като съединението α-каротен е открито само при гали. Наблюдават се разлики в хормоналния профил между заразена тъкан и контроли: повишаване на синтезата на гиберелини (GA) и стресови хормони абсцисиева киселина (ABA) и жасмоновата киселина (JA), Тези хормони водят до активирането на защитни механизми срещу увреждане от биотичен стрес, стимулиране на клетъчното удължаване и органогенезата,

разрастване на галите и регулиране на водния баланс. Тези процеси повлияват благоприятно развитието на ларвата. Докторантът прави извод за наличие на комплексен адаптивен отговор при кукувичата прежда осигуряващ поддържане на клетъчната хомеостаза и създаване на условия за продължително поддържане на взаимодействието между растение и насекомо. Анализирани са промени в епигенетичната регулация чрез провеждане на метиломен анализ за две групи проби - незаразени стъбла и гали. Изменения в общия профил на метилиране, предизвикано от фитофаги, показват ясно разграничение между галите и контролните растения, като при галите се отчита повишено ниво на метилиране във всички геномни региони, но най-силно изразено в промотори и CpG острови. Болшинството изследвани PR гени проявяват повишаване в експресията си особено тези, участващи в биосинтеза на вторични метаболити, биосинтез на кутин, суберин и восъци. Докторантът прави предположение за евентуално влияние на хиперметилирането и потискането на експресията на някои PR-свързани гени (хитинази, цистатини) за ограничаване на директния защитен отговор срещу ларвите. Изказва се заключение, че промените свързани с галообразуването са поне частично подложени и на епигенетична регулация. Тя може да е свързана както с диференциален метиломен профил, така и с промени в РНК метаболизма включващ малки некодиращи РНК. Смятам, че двата процеса трябва да се разглеждат взаимно свързани и промени в профила на метилиране се обуславят и от малките некодиращи ДНК. Втора основна част от дисертационния труд е посветена на проучване на динамиката на микробиалните съобщества в растения (ендофитен микробиом) и почва (ризосферен микробиом) при различни комбинации *Cuscuta campestris* /гостоприемник, като е представен анализ на структурата и разпределението микроорганизмите, както и възможни посоки на техен пренос между растения. Оценка на ендофитните микробиални съобщества е направена на кукувича прежда и пет нейни гостоприемника от 8 локации в района на София. Показани са най-разпространените типове микроорганизми - *Actinomycetota* (30.6%), *Pseudomonadota* (26.9%), *Methanobacteriota* (14.8%). Установена е различна степен на сходство, съотношение и степен на припокриване на микробиоми достигаща до 21% при комбинация *Cuscuta campestris* и *A.patula*. При някои проби кукувича прежда се наблюдават значително повече таксони в сравнение с гостоприемника им, но според индексите Shannon и Sipson таксоните в гостоприемниците са по-разнообразни и с по-равномерно разпределение. Докторантът коментира влиянието на вида на гостоприемника върху разнообразието при паразита с представени различни профили при различни комбинации двойки и се прави извод за наличието на диференциални промени в микробиалния състав между паразита и гостоприемника, индуцирани и по-скоро зависими от гостоприемника. В дисертацията е проучена структурата на микробиома в ризосферата на растения *Arabidopsis thaliana* и

Thellungiella salsuginea заразени с кукувича прежда и при съответни контролни незаразени растения. Така например, наблюдава се увеличение с 3% на *Pseudomonadota* при заразени растения *A. thaliana* или намаляване с 4% при *T. salsuginea*, като *Actinomycetota* намалява и при двата заразени гостоприемника. При *T. salsuginea,* почвеният микробиом се характеризира с по-високо разнообразие и по-равномерно разпределение на таксоните в сравнение с *Arabidopsis*. Прави се извод, че това вероятно се дължи на известната по-висока устойчивост на *Thellungiella* към стрес и различен профил на коренови ексудати, които поддържат по-разнообразна микробна общност. На основата на вътрегруповото разнообразие при обединени проби е видно, че като цяло заразяването не води до значими промени в богатството и равномерното разпределение на микробиалните общности. Прави се извод, че почвеният микробиом е относително независим от присъствието на паразити. От друга страна, при разглеждане на отделните групи се наблюдават разлики по отношение на тип гостоприемник, като *Thellungiella salsuginea* показва по-високо разнообразие и по-равномерно разпределение на таксоните. PCoA диаграма на бета разнообразието на почвените бактериални съобщества показва групиране на пробите според типа гостоприемник. Докторантът прави извод, че основният фактор, определящ структурата на микробиома, е видът на гостоприемника, а не наличието на заразяване и микробиомът проявява относителна устойчивост към външни въздействия (присъствието на паразит) на ниво общо разнообразие. Изказва се твърдение, че растението-гостоприемник модулира микробната общност чрез специфични метаболитни и физиологични характеристики, но това становище не е подкрепено с конкретни данни за такива характеристики.

В раздел ***Дискусия*** докторантът е направил максимално подробна дискусия върху получените резултати. Въпреки това, считам, че цитираните публикации свързани с интерпретирането на резултатите засягат основно базови изследвания и данни (например съпоставка с налична информация за метаболитни и генетични процеси и механизми, съединения, маркери за стрес). Липсва съпоставка на получените резултати със сходни изследвания и налични данни върху молекулярно-генетични взаимодействия паразит-гостоприемник при конкретни обекти растения, дори и да отсъстват такива проучвания конкретно за род *Cuscuta*.

В дисертационния труд са представени шест ***Извода*** на базата на изследванията на взаимоотношения растение-паразит *Cuscuta campestris* и гостоприемник, както по отношение на отговор на растението при галообразуване като стрес, така и за промени в микробиома при тези взаимоотношения. Извод 1 е методологичен, другите касаят потвърждаване на Хипотеза 1 (изводи 2, 3, 4) и Хипотеза 2 (изводи 5, 6).

Забележки: *Извод 3, 4, 5 и 6* могат да бъдат представени в повече детайли. В изводите се използват изрази като "вероятно" (за наличие на оксидативен стрес), "донякъде" (за влияние на растение-паразит), които би трябвало да се избягват особено що се касае за лични резултати.

Извод 3: може да се споменат ключови гени, чиято експресия се променя.

Извод 4: може да се споменат установени процеси свързани с препрограмиране на метаболизма на *Cuscuta* спрямо нуждите на ларвите.

Извод 5: Изводът е формулиран неясно. Ако съществува определен тип пренос на микробиом, то в каква посока и кои са „едните взаимоотношения" и кои са „другите" такива?

Извод 6: не става ясно докъде и как влияе растението-паразит и докъде и как растението-гостоприемник на почвения микробиом. В този вариант на представяне Изводи 5 и 6 не дават конкретна представа по отношение на Хипотеза 2.

Докторантът представя 6 основни ***Приноса*** на получените резултати.

Забележки: В приносите е добре да се посочи иновативност на разработката в национален или международен план, каквато смятам, че съществува. В **принос 1** може да се поясни с какво изследванията по въпроса са иновативни и с какво назграждат известните досега данни. Изказът „поставя под съмнение негативното влияние на епипаразита" не е коректен. Резултатите от дисертацията не поставят под съмнение негативното влияние, то реално съществува. В **принос 2** за първи път ли е демонстриран анализ и наличие на епигенетична регулация в резултат на галообразуване, и ако да, то трябва да се изтъкне. В **принос 4** е неясен термина индиректно влияние и може да се поясни. Този принос има и научно-приложен характер за селското стопанство**.** В **Принос 5** трябва да се посочи метода RAPD и евентуално да първи път ли е използван при *Cuscuta*? В **Принос 6** думата „изясняващи" вероятно е по-коректно да се замени с „потвърждаващи" или „обогатяващи познанията" или друго, защото е добре известно че *Cuscuta* е резервоар и вектор на ендофитни патогенни микроорганизми.

Основни заключителни забележки и препоръки:

1. Въпреки, че са посочени две публикации свързани с темата на докторантурата, съществен минус на дисертационния труд е фактът, че нито едно от изследванията свързани директно с темата не са публикувани – антиоксидантен и метилационен профил, хормонален профил, експресия на белтъци, микробиален анализ чрез ДНК метабаркодиране. Единствената експериментална статия касае ДНК профилиране чрез RAPD, което като изследване е извън целта на дисертацията и заложените задачи за нейното достигане. Липсата на публикация/и по някои от основните задачи на дисертационния труд от една страна не валидира официално научните резултатите и изводите (което не означава, че не са верни). От друга страна, наличието на публикация би дала представа кои изследвания са провеждани от докторанта (видно по Author contributions) и съответно компетентността в дадена конкретна област или методология.

2. Липсва или е недостатъчно дискусията на базата на сравнителен анализ и съпоставяне с литературните данни от предходни изследвания по темата на дисертацията.

3. Добавяне на раздел *Заключение*, където докторантът да представи в концентриран вид най-съществената информация, получена в резултат на научно-изследователската работа, постижения и перспективи за продължаване на изследванията, би придало по-представителен завършек на дисертационната работа.

4. Изводите и Приносите могат да бъдат представени по-конкретно и подробно, особено що се касае иновативност и приложение.

Въпроси:

Основен:

1. В дисертационния труд се представя концепциата за различната степен на влияние на растението-паразит и гостоприемника в по-голяма степен на последния върху структурата на ендофитните съобщества. Като причина за това се представя наличието на процес на векторен пренос на ендофитни микроорганизми от и към паразита зависим от гостоприемника. В какво се изразява този ефект на зависимост от гостоприемника и на база на кои данни от дисертацията се прави този извод? Как се иденфицира каква част от микробиома е в процес на пренос и в коя посока? Докторантът споменава в дисертацията за липса на открита зависимост кои родове се увеличават или намаляват в паразита, в сравнение с различните гостоприемници, като процесът е по-скоро зависим от самия гостоприемник. Освен това, за да се правяг изводи за динамика, обусловена от тези взаимодействия при ендофитния микробиален анализ, не трябва ли да има и микробиом анализиран в контроли – отделни растения без контакт?

Към *Материали и Методи:*

2. Предварителното идентифициране на базата на ITS областта на четирите вида кукувича прежда - *C.campestris, C. epithymum, C.эeuropaea* и *C. approximata* е направено извън работата по дисертацията ли и какъв методологичен подход е използван?

3. За анализ на гали, материал от едно растение и локация ли е събиран или от няколко гали за статистическа представителност? Същото се отнася и за почвените проби: проба почва е вземана от едно растение (или двойка паразит-гостоприемник) или повече?

4. Какъв е бил критерият за избор на видовете *Arabidopsis thaliana* и *Thellungiella salsugineae* като растения гостоприемници от многото други видове гостоприемници на *Cuscuta* campestris?

5. Има ли изследвания за прилагането на ДНК метабаркодиране или друг генетичен подход за анализ на микробиома при взаимодействия между паразитни растения-гостоприемници?

Към *Резултати:*

6. Насекомото и предизвиканите от него гали предизвикват ли оксидативен стрес за растението? В единия извод се споменава за “евентуално” възникване на оксидативен стрес.

7. Как ще коментирате данните относно достоверността за микробиалната структура и динамика свързана със взаимодействия между конкретни видове растения когато вероятността от екзогенно замърсяване с микроорганизми е силно възможна- от околна среда, в рамките на лабораторна работа (манипулация на растения, изолиране на геномна ДНК, PCR)?

8. Какво означава повишаване на броя диференциално променени таксони?

9. Как си обяснявате наблюдението, че при една и съща двойка гостоприемник (например *Cuscuta/ Polygonum aviculare*) проби C1/C2; C5/C6; C17/C18 от различни места показват разлика на ниво таксономичен състав и микробиалното съотношение (Фиг. 21 и 22).

Заключение

Дисертационният труд на Стефан Савов е посветен на проучването на биотични фактори, модулиращи отношенията между паразитни растения от род *Cuscuta* и техните гостоприемници. Получени са оригинални резултати относно молекулните механизми на физиологично, биохимично и генетично ниво лежащи в основата на стресовия отговор при биотични взаимодействия растение-патоген/гостоприемник и насекоми фитофоги-растения с безспорна фундаментална и научно-приложна значимост. По актуалност на разработваната проблематика, обем и качество на изследванията, както и приносен характер на резултатите дисертационният труд напълно отговаря на изискванията на ЗРАСРБ и на Правилника за условията и реда за придобиване на научни степени и заемане на академични длйжности в СУ „Св. Климент Охридски“. Изказвам своето пожелание към докторант Стефан Савов и сътрудници да публикуват данните от тези важни и иновативни изследвания възможно най-скоро за да получат международна видимост. Смятам, че Стефан Савов е квалифициран учен, способен самостоятелно да провежда научни изследвания, с потенциал да продължи разработките в областта на перспективаната тема на дисертационния труд. На това основание, гласувам положително и предлагам да бъде присъдена образователната и научна степен „доктор” на Стефан Светославов Савов в област на висше образование: професионално направление 4.3 “Биологически науки”, докторска програма “Биохимия“.

Дата: 05.08.2026

Изготвил рецензията:

(доц. д-р Георги Бончев)