

РЕЦЕНЗИЯ

Върху дисертационния труд на ас. Любен Иванов Загорчев, докторант към катедра „Биохимия”, Биологически факултет, Софийски Университет „Св. Климент Охридски” за присъждане на образователната и научна степен „доктор” по научната специалност Биологически науки шифър 4.3.(01.06.10 Биохимия) на тема:

Биохимични промени в състава и структурата на клетъчната стена на ембриогенни калусни култури от *Dactylis glomerata* L. третирани с NaCl

от проф. Диана Христова Петкова, д.б.н, Институт по биофизика и биомедицинско инженерство, БАН

Значение и актуалност на проблема

Глобалното затопляне води до намаление нивата на водоемите използвани за напояване на културните растения. Изпаряването на водата предизвиква повишение на концентрацията на соли, което от своя страна повишава нивото на солите в почвата при напояване. Друга причина за засоляване на почвите е непрекъснатото наторяване с цел увеличение на добивите. Ето защо създаването на сортове растения, които са устойчиви към солеви концентрации по-високи от нормата е от голямо значение за повишаване добивите от културните растения. За да се бъде успешно създаването на такива сортове е необходимо познаването на молекулните процеси касаещи отговорите и адаптацията на растенията към солеви стрес. Поради тези съображения считам, че темата на дисертацията касае един много актуален проблем, а именно изясняване биохимичните промени в клетъчната стена на калусни култури при високи концентрации на NaCl.

За провеждане на настоящите изследвания е използвана удачно моделна система от ембриогенни калусни култури от *Dactylis glomerata* L. тъй като това е представител на семейство Житни, едни от най-широко използваните културни растения за производство на храни и фуражи. Независимо от големия брой изследвания посветени на соматичната ембриогенеза на този растителен вид все още има редица неизяснени въпроси особено за участието на растителната стена в процесите на

соматичната ембриогенеза и адаптацията на растението към стресови фактори. Растителната стена е първият компонент на растителната клетка, която се сблъсква с промените на околната среда ,но тя е малко проучена поради наложеното мнение в научната литература, че растителната среда е една пасивна структура, която служи за граница между растителната клетка и околната среда. Напоследък са започнали по-интензивни изследвания, които вече представят растителната стена като динамична структура, отговаряща бързо на абиотичен стрес, но все още молекулните механизми свързани с нейното участие не са добре проучени. Трябва да се отбележи, че целта е много точно и ясно формулирана. Считам, че поставените задачи за реализиране на целта на дисертационния труд са напълно адекватни и логично следват предвидените изследвания за изясняване на основния проблем залегнал в този научен труд.

Структура на дисертационния труд

Дисертационният труд обхваща 101 стр, от които 2 стр. Анотация, 19 стр. Литературен обзор, 1 стр. Цел и задачи, 15 стр. Материали и методи, 23 стр. Резултати , 24 стр. Дискусия, 2 стр. Заключение, 2 стр Изводи , 2 стр. Приноси и 7 стр. Списък на цитираната литература. Дисертацията е оформена отлично като за илюстрация на по-важните моменти от литературния обзор свързани с темата на дисертацията и представяне механизмите на соматичната ембриогенеза и регенерацията, гените експресиращи се по време на ембриогенезата, кривите на стрес, регулаторната мрежа на отговорите към абиотичен стрес и взаимовръзката помежду им са илюстрирани с 5 фигури и 1 таблица. Получените резултати са представени с 29 фиг. и 6 таблици. Съотношението между отделните раздели е добре спазено и отговаря на изискванията за структура на дисертационен труд.

Анализ на дисертационния труд

Литературният обзор е систематизиран в няколко глави и е изграден въз основа на 227 литературни източника. Подробно е описана соматичната ембриогенеза и характеристиките на *Dactylis glomerata L.* като удобна моделна система за изследване на този процес. Обърнато е специално внимание на абиотичния стрес, механизмите използвани от растенията за преодоляването му, толерантността на растителните видове

към различни климатични фактори . Наблегнато е на солевия стрес и на проблемите за неговото преодоляване. Описани са видовете белтъците на растителната стена – структурни и функционални, и тяхната участие при абиотичен стрес. Обзорът е написан много добре. Отделните глави следват логично една след друга. Трябва да се отбележи, че докторантът очевидно е запознат със състоянието на проблема и за това проследявайки литературата той отбелязва къде има още неизяснени факти въз основа на това да формулира конкретната цел и задачите, които да използва за решаването ѝ.

Литературният обзор е написан ясно и показва критично тълкуване на известните до сега литературни данни. Това говори, че Любен Загорчев е добре подготвен в теоретично отношение учен. По-голямата част от цитираната литература е след 2005 г., което е доказателство, че авторът познава много добре съвременното състояние на проблема.

Подробно е описан експерименталния обект и условията, при които е проведена соматичната ембриогенеза, синхронизацията на суспензионните култури и третирането с различни солеви концентрации. За изпълнение на поставената цел са използвани съвременни биохимични , молекулярно-биологични и имунологични методи. Всички методи са много подробно описани и могат да бъдат възпроизведени без да се използва допълнителна литература. Считам, че подобрите методики са абсолютно адекватни за решаване на посочените задачи. Многобройните методи, които са използвани показват , че докторантът е един много добре изграден експериментатор в областта на биохимията и молекулярната биология и не буди съмнение акуратността на проведените изследвания.

В глави Резултати и Дискусия са описани и обяснени данните от експериментите проведени за решаване на поставените задачи. Основните резултати могат да се обобщат по следния начин:

1. Проследено е развитието на *in vitro* култури от *Dactylis glomerata L.* в нормални и условия на различна степен на засоляване. Действието на ниски концентрации NaCl зависи от етапа на развитие на културите, докато високите концентрации имат еднозначно действие – инхибират растежа на културите.
2. Определено е съдържанието на L-пролин в суспензионните култури поради факта, че нивото на тази свободна вътреклетъчна аминокиселина е тест за величината на абиотичния стрес, на който са подложени културите и тяхното физиологично състояние. В понатъшните изследвания не са използвани култури показващи екстремно високи стойности на вътреклетъчните нива на пролин.

3. Установени са някои молекулни механизми лежащи в основата на неспособността на културите да се справят със солевия стрес поради, което високите солеви концентрации подтискат соматичната ембриогенеза. Изследването промените в нивата на няколко вида антиоксиданти като : намалението на токохроманолите; увеличение на вътреклетъчната концентрация на нискомолекулните тиолни съединения; увеличение на окислената форма на глутатиона; високи концентрации цистеин са пряко доказателство на отговора на културите към абиотичния стрес.
4. Чрез определяне на окислително-редукционния потенциал на двойката глутатион – окислен глутатион е определена жизнеспособността на културите при прилагане на солеви стрес и е доказано застаряване на част от културите при тези условия.
5. За пръв път е доказана регулаторната роля на окислително редукционния потенциал на двойката цистеин-цистин върху общия вътреклетъчен окислително-редукционен потенциал при абиотичен стрес на растителните култури.
6. Установена е транслокация на някои видове белтъци от клетъчната стена към хранителната среда при солеви стрес. Установени са три основни вида белтъци, но поради известните свойства и характеристики на ниско и високомолекулните кисели белтъци в литературата и значението им за соматичната ембриогенеза докторанта се е насочил към изследване на белтъци с изолелектрична точка в алкалните области. Идентифициран е специфичен белтък, за които се предполага, че е с функция на серин-треонин киназа и поради нарушение на йонните връзки на белтъка с клетъчната стена при условия на солеви стрес той се оказва в хранителната среда. Дискутирана е евентуалната двукратна роля на белтъка в процеса на соматичната ембриогенеза – директна или чрез модулиране активностите на други ензими. До сега в литературата няма цитирани данни за характеризирани алкални белтъци регулатори на соматичната ембриогенеза при *Dactylis glomerata* L.
7. Наблюдавано е повишение нивата на арабиногалактановите белтъци в хранителната среда при солеви стрес индикация на засилен въглехидратен метаболизъм и с цел предотвратяване на програмираната клетъчна смърт. В хранителната среда са доказани и повишени нива на екстензини. Използвайки три вида антитела специфични за белтъци с галактозилни, арабинозилни и рамногалактуронанови остатъци е доказано, че експресията или отделянето на такива белтъци е стресово ундуциран фактор. Интерес представляват резултатите върху каталитичната активност на пречистени експанзини, които се активират при

солеви стрес. Отделните периоди на процесите на соматична ембриогенеза добре колерилат с активността на експанзините, което е отново доказателство за тяхната съществена роля при соматичната ембриогенеза.

8. Изследванията върху ацетилестеразите и пектинметилестеразите доказват една изоформа на пектинметилестераза, увеличени нива при солеви стрес в клетъчната стена и липса на тези ензими в хранителната среда при солеви стрес, което съответства на ролята на ензима за стабилизиране на пектиновата мрежа и намаление на експанзията на културите. За разлика от пектинметилестеразите ацетилестеразите са открити в значително по-високи количества в клетъчната стена и едновременно и в хранителната среда поради по-широката си субстратна специфичност. Тези данни отново са индикация за засилен върлехидратен метаболизъм при солеви стрес.

Искам да отбележа, че представената дисертация е едно много подробно и обширно изследване в областта на растителната биохимия и дава отговори за неизвестни до сега молекулни механизми на някои основни процеси свързани с регулация на соматичната ембриогенеза и отговора на растенията при различна степен на солеви стрес. Особен интерес предизвикват резултатите свързани с окислително-редукционния потенциал на растителните клетки, за който сега се счита, че е един много важен белег за окислителния статус на всички живи клетки, който от своя страна е индикация за физиологичното състояние и посоката на развитие на всички метаболитни процеси свързани с развитие, диференциация и апоптоза на клетките.

Бих искала да задам няколко въпроса на докторанта:

1. Какви видове вещества с антиоксидантна активност се срещат при растенията?
2. Как може да се обясни факта, че активността на екзогенно приложените експанзините върху клетъчната стена зависи от филогенетичната близост на растителните култури?

Изводите са точно формулирани и правилно интерпретират основните резултати на дисертационния труд. Дисертацията е оформена много добре, но считам, че по-добре би било да се обединяват разделите Резултати и Дискусия, тъй като тогава биха се избегнали някои повторения. Срещат се малък брой печатни грешки. Използваните статистически обработки доказват, че получените резултати се отличават със статистическа значимост. Според мен заглавията на таблиците би трябвало да са над

таблицата, а не да са написани като легенди на фигури. Освен това под № 4 са представени две таблици на стр. 50 и 53 .

Основните резултати от дисертацията са публикувани в 4 научни статии с общ ИФ 3.308. Две от статиите са публикувани в списания с ИФ, една в българско списание и една е доклад публикуван в пълен текст представен на научен форум. Посочени са 8 участия на наши и международни научни мероприятия. Забелязани са и 2 цитата на публикуваните статии.

Авторефератът включва основните резултати от проведените изследвания и напълно отговаря на структурата на дисертацията.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В заключение искам да кажа, че са получени оригинални и със съществена научна стойност резултати за молекулните основи на соматичната ембриогенеза на *Dactylis glomerata L* в условия на солеви стрес, Използваните многобройни съвременни методи са индикация за отличната експериментална подготовка на докторанта и го характеризират като изграден и компетентен биохимик. Поради всичко казано до тук предлагам на членовете на уважаемото научното жури да присъди на ас. Любен Иванов Загорчев научната и образователна научна степен „доктор” по специалност Биологически науки шифър 4.3.(01.06.10 Биохимия).

13.09.2012 г.

Рецензент:

Проф.. Диана Петкова