

РЕЦЕНЗИЯ

Върху дисертационен труд за придобиване на образователна и научна степен „доктор“ по професионално направление 4.3 „Биологически науки“, научна специалност „Биофизика“

Автор на дисертационния труд: Момчил Мартинов Паунов, асистент в катедра Биофизика и радиобиология, Биологически факултет, Софийски Университет „Св. Климент Охридски“

Тема на дисертационния труд: „Разработване на биофизичен подход за фенотипиране и оценка на физиологичното състояние на фотосинтетичния апарат при растенията“

Рецензент: доц. д-р Детелин Стефанов Стаменов, Софийски Университет „Св. Климент Охридски“, Биологически факултет, катедра Биофизика и радиобиология

Представеният ми за рецензиране дисертационен труд на Момчил Паунов е изработен в катедра Биофизика и радиобиология към Биологически факултет на СУ „Св. Климент Охридски“ и е по научна специалност Биофизика, шифър 01.06.08. Дисертацията е написана на 112 страници и е структурирана по класическа схема. Уводът и литературният обзор заемат 35 страници, „Цел и задачи“ е 3 страници, разделът „Материали и методи“ е изложен на 13 страници, а резултатите и тяхното обсъждане са представени на 40 страници. Има и раздел „Обобщение на получените резултати“ в 4 страници. Илюстративният материал е представен от 30 фигури и една таблица, като съответно 8 фигури и таблицата са включени в литературния обзор и методичната част. Библиографската справка е пълна и коректна и включва списък на 161 литературни източника. Представен е списък от 4 статии по темата на дисертацията, публикувани в специализирани международни и наши издания, като две от тях са с ИФ - Frontiers in plant science (Q1) и Photosynthetica (Q2) с общ ИФ 6. 471. Докторантът е първи автор в една от публикациите, втори в две от тях и в една е трети автор. Върху публикуваните трудове по дисертационната тема до момента са забелязани 12 цитата (към 10.05.2020). Представен е и списък, удостоверяващ докладването на резултатите по дисертацията на 5 научни форума. Заедно с другите публикации (общо 10, източник SCOPUS) h – индексът на Момчил Паунов е 6.

Дисертационният труд е посветен на разработването на биофизичен подход за фенотипиране и оценка на физиологичното състояние на фотосинтетичния апарат при растенията. Този подход е приложен при четири специфични проблема като: 1) изследване на ефекта на качеството и количеството на хранителните вещества върху фотосинтетичния апарат (ФСА) при *Scenedesmus* sp.; 2) на влиянието на хербицид имазамокс и биостимулант (аминокиселинен екстракт, АКЕ) върху ФСА при слънчоглед; 3) на ефекта на засушаването и възстановяването на водното съдържание върху ФСА при два еко типа източен чинар; 4) на влиянието на качеството и количеството на светлината върху ФСА и способността за цъфтеж при грах.

Литературният обзор е съобразен с темата и дава целенасочен преглед на съвременното състояние на проблемите, разглеждани в дисертацията. Същевременно той показва, че докторантът е запознат отлично с литературата по разработваните проблематики. В обзора са разглеждани и систематизирани съществуващите в литературата данни, отнасящи се до: 1) Структура и функциониране на фотосинтетичния апарат; 2) Флуоресценция на хлорофил а в рамките на т.нар. JIP тест метод, с който се изследва фотосинтетичния електронен транспорт в интакни обекти – листа, клетки и др. 3) Разглеждани са абиотични стресови фактори, влияещи на фотосинтезата; Към раздел Литературен обзор имам някои препоръки, които не намаляват качеството му. **1)** Тъй като в настоящата дисертация е изследван процесът на нефотохимичното гасене (NPQ) на хлорофилната флуоресценция, смятам, че в литературния обзор е необходимо да се дадат малко повече детайли относно механизмите на нефотохимичното гасене спрямо тези представени на стр. 21 – 22: **а)** Липсва кратко описание на участието на каротеноидни катион радикали в нефотохимичното гасене; **б)** Липсва описание на преходите между мономерна и тримерна форма на светлина-събиращите комплекси (ССК) и участието на тези преходи във формирането на бързата и бавната фаза в индукционната крива на нефотохимичното гасене (разглеждана в детайли в резултати и обсъждане като например Фиг. 12); и **в)** макар че фотоинхибиторното гасене (qI) не е предмет на изследване в дисертацията все пак липсва информация за него би затруднила четящият текста. **2)** Моделът на Strasser включва огромен брой уравнения, изведени от ограничен брой емпирични данни. При представяне на крайните извеждания на уравненията, би било добре в крайна сметка, да се добавят експериментални величини и връзките между тях, за да се види как са получени тези уравнения. Като най-прост

пример бих дал уравнението за максималния квантов добив, ϕ_{Po} : $\phi_{Po} = TR_0/ABS$; би трябвало да бъде дописан във формата на изчислението му на базата на експерименталните данни, т.е.: $\phi_{Po} = TR_0/ABS = Fv/Fm$, което ще улесни незапознатият в детайли с модела на Strasser читател; **3)** Имам и още една бележка относно формулите в дисертацията. Те не са номерирани, а това затруднява читателя.

Целта и задачите са формулирани ясно и точно. Основната цел на настоящата дисертация е разработването на биофизичен подход, използващ метода на фотоиндуцираната кинетика на хлорофилната флуоресценция, който да се използва за фенотипиране и оценка на физиологичното състояние на фотосинтетичния апарат в различни условия. За постигането на тази цел са формулирани 6 основни задачи. Изследваните обекти и условията, в които са поставени са подходящо избрани, като това е направено така, че максимално да се използват разнообразните възможности на методът на хлорофилната флуоресценция за оценка на физиологичното състояние на изследваните интакни обекти и възможностите за фенотипиране. При разработването на дисертационния труд е използвана пълната гама от възможности на **метода на хлорофилната флуоресценция**, измервана с M-PEA и Handy PEA флуориметри и разработения за тях JIP тест. Този тест представлява моделен анализ на бързата фаза на индукционна кинетика на флуоресценцията (OJIP, преход от тъмнинно-адаптирано състояние към светлинно-адаптирано – крива на Кауцки). JIP теста е разработен от Strasser и сътрудници за изчисляване на редица структурни и функционални параметри на фотосинтетичния апарат и по-специално оценката на ефективността на фотосинтетичните електрон-транспортни реакции. Като цяло JIP-теста дава една статична картина върху изследваните процеси. Трябва да отбележа като много положителен факт, че дисертанта е излязъл и извън рамките на JIP-теста и е навлязъл успешно в разглеждането на динамични характеристики, чрез използване на методи като: 1) изследване на диференциални криви, получени на база различия между оригинално измерени индукционни криви; 2) изследване на тъмнинни спадове на флуоресценцията (TC) и 3) търсене на възможности за провеждане на т. нар. „анализ на гасенето на хлорофилната флуоресценция“ – метод разработен за другия тип основни флуориметри, използвани за фотосинтетични изследвания - PAM флуориметрите. По този начин дисертанта е навлязъл в детайли и в проблемите на регулацията на тилакоидния електронен транспорт. Във връзка с раздела Материали и методи имам следните въпроси и бележки: **1)** Не е описан подробно начина на третиране с *Terra-sorb* и имамакс (Стр. 38). Например интересно е да се знае използвано ли е повърностно

активно вещество или не при третирането; 2) При описание на местонахождението на двата екотипа чинар липсват GPS координатите (Стр 39); 3) Имам въпрос относно това, защо се приема вариантът $\text{NH}_4\text{NO}_3+2\%\text{CO}_2$ за контрола (Стр. 50), а не $\text{NH}_4\text{NO}_3+0.04\%\text{CO}_2$?

В раздел „Резултати и обсъждане“ е описана и анализирана извършената значителна по обем експериментална работа във връзка с установяване възможностите за приложение на метода на хлорофилната флуоресценция (индукционни криви), JIP-тест, оригиналният метод на изследване на ТС на флуоресценцията, използване на пригоден за М-РЕА флуориметър „анализ на гасенето“ на флуоресценцията, както и методът на диференциалните криви за оценка на физиологичното състояние на изследваните обекти и възможностите за фенотипиране. По този раздел имам следните бележки и въпроси: 1) Първо бих искал да отбележа един много интересен резултат получен от дисертанта (стр. 55), свързан с по-рядко срещан ефект върху фотосинтетичния електронен транспорт: *Единствено ФС1 (без ФС2) се активира от висока концентрация на CO_2 при среда с органичен източник на азот и от $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$ при отглеждане с 2% CO_2 .* Този ефект наподобява на друг специфичен процес на активация на ФС1 наблюдаван в условия на действие на високи температури върху ФСА. 2) Не е описано съвсем прецизно регистрирането на флуоресценцията с РАМ флуориметър (стр 56). Всъщност най-важното, което трябва да се отбележи, е, че основните различия между РАМ флуориметъра и РЕА флуориметрите се проявяват най-вече при измерване на ниво F_0 и бърза фаза на Кауцки ефекта. В тази връзка всеки от двата типа апарати има своите предимства. М-РЕА измерва с много по-висока чувствителност (по-висока времева резолюция) бързата част от индукционната крива (OJ). Тази част от бързата фаза е регистрирана и описана в детайли за пръв път от Б. Кок и сътрудници в края на 60-те и през 70-те години на 20 век, но развитието на методите за регистрация на флуоресценцията води до много по-точно регистриране на точка J от OJIP кривата. РАМ измерва по-точно F_0 , но подходът на измерване, определян от някои автори като „активна флуоресценция“ не позволява добра регистрация на OJ при РАМ флуориметрите и затова при тях е необходимо използване на методът на МТ импулсите за оценка на OJIP прехода. Подходът „пасивна флуоресценция“ (използване на непрекъсната възбуждаща светлина), използван при М-РЕА, от друга страна обаче не измерва точно индукционна крива на флуоресценцията при подаване на актинична (действаща) светлина с нисък интензитет като например интензитет, който не води до изместване на равновесието в електронния поток между хиноните Q_A и Q_B в акцепторната страна на ФС2 (под 50

$\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ PFD), т.е. светлина необходима за точна оценка на дела на затворени реакционни центрове в Q_V -нередуциращи ФС2. **3)** Тъмнинните спадове (ТС), изследвани в тази изключително интелигентно направена и написана дисертация, са според мен едно от най-важните й постижения (стр 62). Както е отбелязано от дисертанта кривите на тъмнинни спадове, представени на Фиг. 12 почти съвпадат като поведение с тези на q_P кривите (Фиг 12А и Г). Според мен обаче ТС (метод за измерване само с М-РЕА, но не и с РАМ) са дори по-добър показател от q_P (типичен показател за РАМ флуориметрията, но в тази дисертация измерен и с МРЕА флуориметър, базирайки се на оригинален протокол използван в тази дисертация). Измерването на фотохимично гасене (всъщност повторното отваряне на затворени от светлината реакционни центрове) с метода на ТС дава нови възможности за оценка на състоянието на акцепторната страна на ФС2. Причината е, че ТС са изучени в детайли, което позволява по-точна оценка на процесите на електронен пренос в сравнение с използването на q_P за тази цел. Фотохимичното гасене е „проблемен параметър“ и е „най-добрия пример“ за някои недостатъци, свързани с теорията на хлорофилната флуоресценция. Дори опитите за използване на „подобри параметри“ като q_L гасенето (друг подход за оценка на фотохимичното гасене), отчитащо нивото на свързаност между отделни ФС2 не могат да решат проблемите с моделирането на хлорофилната флуоресценция като цяло до този момент. В наличието на тези проблеми в теорията на хлорофилната флуоресценция може да се потърси и отговора на въпроса защо методът на хлорофилната флуоресценция е най-изследвания метод за оценка на фотосинтезата в интактни листа и защо има такъв голям интерес към него (например публикациите посветени на един прекалено специфичен проблем, какъвто са индукционните преходи на флуоресценцията, ефект на Кауцки, са повече от 500 за последните 5 години, по данни на Scopus). Нещо повече, флуоресцентният метод има голям потенциал от практическа гледна точка поради сравнително лесният начин за използването му. Моделите, описващи листния газообмен (асимиляция на CO_2 и O_2 отделяне), както и методите на листната оптика, а и в известна степен методът на забавената флуоресценция (включително термолуминисценцията), дават добро описание на процесите на листната фотосинтеза, базирайки се на съответните експериментални данни получени от тези методи. Другите основни методи за оценка на фотосинтезата в интактни обекти като тези на индукцията на флуоресценцията и фотоакустичната спектроскопия са все още в началното си ниво на развитие по отношение на теорията, независимо от дългата си история (особено индукцията на флуоресценцията, метод бурно равиващ се вече почти 90 години и свързан с големите усилия за развитието му на

едни от най-утвърдените изследователи на фотосинтезата). За съжаление засега има поне четири основни, но и в голяма степен взаимно изключващи се теоретични модели на флуоресценцията: 1) Моделът на ФС2 свързаност, формулиран от Joliot и в детайли развит от J. Lavergne и H. Trissl; 2) Моделът на експоненциалното нарастване на флуоресценцията на Wim Vredenberg с ранна версия на Louis Duysens; 3) Моделът на Zhu, Govinjee, Baker et al. базиран на кинетичен подход за описание на електронния транспорт на база флуоресцентна индукция и 4) Моделът на Schreiber – Krieger, разглеждащ хлорофилната флуоресценция като тип забавена флуоресценция. Като един от най-добрите примери показващи несъвършенствата на моделите е точно проблемът с дефинирането на фотохимичното гасене на флуоресценцията qP , от което следват проблеми и с интерпретацията на данните. Но и в четирите модела няма съгласуваност между теоретични предсказания от една страна и реални експериментални данни по отношение на qP . Намирането на корелация в поведението на qP и ТС дава идея за развитие на нови подходи на описанието на фотохимичната компонента на гасенето на хлорофилната флуоресценция. ТС измерванията за пръв път са направени с фосфороскопска техника в лабораторията на Карапетян и Бухов в края на 80-те и началото на 90-те години на 20 век. ТС по своята същност представлява спад на хлорофилната флуоресценция след възбуждане със светлинни импулси предизвикващи „множествени превръщания“ в реакционните центрове на ФС2. В тази дисертация е показан подход с повтарящи се във времето ТС, което позволява оценка на процесите, които са в основата на qP . Така докторантът е използвал според мен значително по-добър подход за оценка на нивото на реокисление на акцепторът Q_A в сравнение с подходът изискващ оценка на qP . Обобщавайки резултатите върху ТС, достигам до заключението че трябваше тези изследвания да бъдат включени в приносите на тази дисертация. 4) Анализът на ефектите на имазамокс и биостимуланта *Terra-sorb foliar* разкрива един важен факт относно биофизичните *in vivo* подходи за изследване на физиологични аспекти на интактни листа (стр. 66 – 71). И този факт е, че с методът на диференциалните криви, въведен от Strasser, се дава възможност да се избегне прекалената параметризация, свързана с ЛП теста, въведен от същия изследовател. По мое мнение методът на диференциалните криви дава богата и специфична информация върху промените на фотосинтетичния електронен транспорт, която има потенциал за приложение в растителната физиология. Имазамокс не е „фотосинтетичен хербицид“ и досега не съм намерил в литературата такова детайлно изследване на ефектите на хербицид, несвързан пряко с фотосинтетичния метаболизъм на ниво фотосинтеза и по-

специално изследване с флуоресцентни методи. В базата данни Scopus се откриват само 6 статии посветени на специфични ефекти на имазамокс върху фотосинтезата. По-интересната дискусия върху получените резултати по мое мнение се базира на използването на диференциалните криви, а не на радиалните представяния на резултатите например на фиг. 14, в които липсва динамично описание на изследваните процеси.

5) Сред множеството от абиотични стресове индуцирани от промени в параметрите на средата най-сложен за изследване е засушаването (стр. 74 – 80). Например използването на морфометрия и биохимични анализи отнесени към морфометричен показател често водят до противоречиви заключения и грешни изводи. Например в резултат на засушаването може да се регистрира повишено съдържание на пигменти на единица площ, което обаче не е реален резултат. Всъщност се наблюдава повишена пигментна концентрация на фона на понижено водно съдържание на еднаква площ. Друг проблем свързан със засушаването е свързан с промените във функциите на устицата, което води до промени в обмена на сензитивната и латентната топлина, а също така и промени във водния и толинния обмен на ниво листен граничен слой и други особености на листния енергиен баланс, водещи в крайна сметка до промени в листната температура. Тези промени не са пряко свързани с условията на средата – т.е. може да има наличие на топлинен стрес по време на засушаването, без да е пряко индуциран от температурата на средата. В тази ситуация използването на множество безразмерни флуоресцентни параметри може да помогне за по-детайлно изследване на ефектите на засушаването. Това изследване на Момчил Паунов е пример за такова изследване на стрес, предизвикан от засушаване. Тук отново се вижда важноста на диференциалните криви, получени от оригиналните ОЛР флуоресцентни индукционни криви. Например промените в т.нар. К-ивица, която се свързва в наличието на високо-температурен стрес и ефектите му върху кислород-отделящата ситема във ФС2 може да се използва за оценка на ефектите на промените в енергийния баланс по време на засушаването, водещи промяната в листната температура.

6) Количествените и качествените ефекти на светлината върху ФСА и способността за цъфтеж при грах (стр 81 – 88) са изследвани детайлно като за целта са използвани специфични статистически техники за обработка на получените данни. PCA анализът е използван успешно от групата на проф. Голцев, чийто представител е дисертанта Момчил Паунов, като например при изследвания на ефекти на минерален стрес в растенията, представляващ подобен проблем за физиологията на растенията на вече описания за засушаването.

Аналитичният преглед на получените в дисертационния труд резултати, представен като **кратка заключителна дискусия** потвърждават впечатлението ми за добро вникване в проблема и за способността на докторантът да откроява съществените резултати от проведеното подробно изследване в сравнение с известното в литературата по проблема. Резултатите са систематизирани в шест извода, формулировките на които добре обобщават получените в дисертационния труд експериментални данни. Основните приноси от проучванията по дисертационната тема на Момчил Паунов са с теоретичен и с научно-приложен характер. Получени са нови научни факти, свързани с начините на обработка на данните получени от промени в бързата фаза на кривата на Кауцки, ОЛР. В голямата си част отправените към докторанта бележки **в процеса на апробиране на дисертацията** пред научното звено са взети под внимание и съответно отразени. Техническото оформяне на представения за рецензиране дисертационен труд е на много добро ниво.

Авторефератът е в обем от 70 страници и по структура и съдържание отразява същността на дисертационния труд.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Оценявам положително дисертационния труд на докторант Момчил Мартинов Паунов, представляващ актуално и детайлно изследване върху възможностите за разработване на биофизичен подход за фенотипиране и оценка на физиологичното състояние на фотосинтетичния апарат при растенията. По съдържание и научни приноси дисертационната работа отговаря напълно на изискванията на ЗРАСРБ и правилниците за неговото приложение. Докторантът притежава отлична теоретичната компетентност в областта на фотосинтезата и методът на флуоресцентните индукционни криви, показва богат експериментален опит и аналитичен подход, които са ценна предпоставка за бъдещо успешно кариерно развитие. Всичко това ми дава основание убедено да препоръчам на членовете на уважаемото Научно жури да присъди на Момчил Мартинов Паунов, образователната и научна степен „доктор”.

11.05. 2020 г.

София

Рецензент:

/доц. д-р Детелин Стефанов /