

РЕЦЕНЗИЯ

на дисертационен труд за присъждане на образователната и научна степен „доктор” в професионално направление 4.3. „Биологически науки”

Тема на дисертационния труд:

„Разработване на биофизичен подход за фенотипиране и оценка на физиологичното състояние на фотосинтетичния апарат при растенията”

Автор: Момчил Мартинов Паунов
Научен ръководител: проф. д-р Василий Голцев

Рецензент: проф. д-р Мая Янева Величкова
от Институт по биофизика и биомедицинско инженерство – БАН,
член на научно жури съгласно заповед № РД 38-130/05.03.2020 г. на
Ректора на СУ „Св. Кл. Охридски”

Момчил Паунов е завършил средното си образование в Националната природоматематическа гимназия „Акад. Любомир Чакалов” в София в паралелка „Биология”. Има бакалавърска степен по „Молекулярна биология” и магистърска по „Биофизика” от Биологическия факултет на СУ „Св. Кл. Охридски”. Момчил Паунов е зачислен като редовен докторант в професионално направление 4.3. Биологически науки (Биофизика) през януари 2015 г. към катедра „Биофизика и радиобиология” в Биологическия факултет на СУ „Св. Кл. Охридски” и е отчислен с право на защита на 15.01. 2018 г. Съгласно представените документи Момчил Паунов е изпълнил индивидуалния си докторантски план, представил е дисертационния си труд на разширен семинар на катедра „Биофизика и радиобиология” и след преценка е насочен към защита.

Актуалност на изследвания проблем

Дисертационният труд е посветен на разработването на биофизичен подход за фенотипиране и оценка на физиологичното състояние на фотосинтетичния апарат при растенията. Климатичните промени на Земята, предизвикани от различни природни и антропогенни фактори, поставят все по-високи изисквания към толерантността и

устойчивостта на растенията и най-вече на икономически важните култури. Фактори, като температура, засушаване, замърсяване и т.н., водят до промени във фотосинтетичната активност на фотосинтезиращите организми и последващи промени в тяхното развитие и добиви. Използването на подходящи и неинвазивни методи за наблюдения и оценка на ефективността на процесите, протичащи във фотосинтетичния апарат на растенията в различни етапи на тяхното развитие, е от особена важност за контролирането и управлението на селскостопанските култури и на природните екосистеми. Анализът на параметрите на хлорофилната флуоресценция на фотосинтезиращите организми дава богата и достоверна информация за първичните процеси на фотосинтезата и промените, настъпващи във функционалната активност на фотосинтетичния апарат при промени в околната среда. Този подход може да се прилага на цели растения и организми и не се налага разрушаване или унищожаване на изследвания обект. От тази гледна точка разработеният в дисертационния труд научен проблем е актуален и значим. От друга страна, прилагането на този биофизичен подход при изследвания на различни фотосинтезиращи организми и при въздействие на различни фактори, влияещи върху развитието на организмите, дава възможност за разширяване и задълбочаване на нашите знания относно процесите, протичащи във фотосинтетичния апарат, и за по-добро разбиране на сложните взаимовръзки между фотохимичните и биохимичните реакции в растителните клетки.

Характеристика и значимост на дисертационния труд

Представеният за рецензия дисертационен труд е построен съгласно изискванията за такъв научен труд и е представен в следните части: „Литературен обзор”, „Цел и задачи”, „Материали и методи”, „Резултати и обсъждане” и „Обобщение на получените резултати”.

Дисертационният труд съдържа 112 стр., от които „Увод” – 2 стр., „Литературен обзор” – 32 стр., „Цел и задачи” – 2 стр., „Материали и методи” – 13 стр., „Резултати и обсъждане” – 40 стр., „Обобщение” – 4 стр., „Изводи” – 2 стр., „Приноси” – 1 стр. и „Литература” – 14 страници. Резултатите са илюстрирани с 23 фигури, като в раздел „Литературен обзор” са включени 4 фигури и в раздел „Материали и методи” – 3 фигури и 1 таблица. Цитирани са 161 литературни източника, като почти половината от тях са от последните десет години

В дисертационния труд са изследвани четири различни обекта – зеленото водорасло *Scenedesmus sp.*, слънчоглед хибрид, устойчив към хербициди, два екотипа източен чинар и грах. За всеки от тях е изследвано влиянието на различни фактори, както следва: качество и количество на хранителната среда за *Scenedesmus sp.*, третиране с хербицид и/или биостимулатор за слънчогледа, засушаване (или воден стрес) за двата екотипа чинар и различно по интензитет и спектрален състав осветяване за граха. Тези комбинации са позволили на докторанта да установи приложимостта и надеждността на използвания биофизичен подход за оценка на физиологичното състояние на изследваните обекти и да определи параметрите на хлорофилната флуоресценция, които може да бъдат широко прилагани в практиката.

Литературният обзор е написан стегнато и компетентно. Разгледаните и подходящо подбрани и представени литературни данни относно структурата и функциите на фотосинтетичния апарат, естеството и характеристиките на флуоресценцията на хлорофил *a* и на ЛР теста, стреса при растенията и абиотичните стресови фактори показват задълбочено познаване и анализиране на наличните данни, което дава основа за набелязване на целта и задачите на дисертационния труд. Трябва да се отбележи подробният анализ и представяне на използвания по-нататък в изследванията метод – индукция на флуоресценцията, тъмнинни спадове, параметри и физически смисъл на определяните от експерименталните криви параметри, отразяващи състоянието на отделните компоненти на фотосинтетичния апарат и на участниците в електронно-транспортната верига. Теоретичната база на флуоресцентните методи и съвременният поглед върху тях са съчетани умело и показват добрата подготовка на докторанта и умения за прилагане на избраните методи.

Целта на дисертацията и поставените задачи са дефинирани ясно, базирани на прегледа на литературата и на съществуващите проблеми относно възможностите за прилагане на високоинформативни и чувствителни методи за постоянно наблюдение и характеризиране на физиологичното състояние на растенията и на други фотосинтезиращи организми.

В раздела „**Материали и методи**” са представени детайлите относно опитната постановка на отделните експерименти с използваните растения и водорасли, всяко от тях със своите специфични изисквания. Използваните подходи за отглеждане на

съответни обекти и тяхното третиране са съобразени с целите и задачите на дисертацията, така че получената информация да предостави възможност да се даде отговор на поставените проблеми. Отделено е място и на методите и апаратите за измерване на индукционните криви на хлорофилната флуоресценция. От представеното описание и подробности в „Литературен обзор” и „Материали и методи” е видно, че Момчил Паунов е навлязъл в теорията и практиката на тази техника, познава явленията, които са в основата на наблюдаваните преходи, и умело борави с математическия апарат. Приложената статистическа обработка е подходяща и представителна по обем и качество.

Резултатите от проведените изследвания са представени в раздел **„Резултати и обсъждане”**, разделен на четири части, всяка от които е посветена на четирите изследвани обекта – зелено водорасло, слънчоглед, чинари и грах, и съответните изследвани фактори.

За изследване на влиянието на качеството и количеството на хранителните вещества върху фотосинтетичния апарат на *Scenedesmus sp.* докторантът променя концентрацията на CO_2 и източника на азота в хранителната среда – съответно амониев нитрат (като неорганичен източник) или уреа (като органичен). При този обект са изследвани както светлинните, така и тъмнинните фотосинтетични реакции. Анализът на индукционните криви на флуоресценцията при четирите различни комбинации от две концентрации CO_2 и двата източника на азот показва промяна във формата им и съществени различия в стойностите на основните флуоресцентни стъпки. Ясно изразените различия в индукционните преходи водят до съществени разлики във флуоресцентните параметри (20 броя ЛР-параметъра), които са представени на радарни диаграми, обединяващи всички варианти, или диаграми за варианти, различаващи се само по един фактор. Въз основа на сравнение на промените на изчислените параметри е оценено влиянието на вида на азотния източник и на концентрацията на CO_2 върху двете фотосистеми и отделните етапи от електронно-транспортната верига между тях. Показано е, че потискащият ефект на ниската концентрация (0,04%) на CO_2 върху фотосинтетичния апарат при източник на азот азотен нитрат най-вероятно е свързан с по-силно влияние върху фотосистема 2 (ФС2) и в по-малка степен върху фотосистема 1 (ФС1). Ниската концентрация на CO_2 при източник на азот уреа също има инхибиращ

ефект, но засяга ФС1 и броя на реакционните центрове (RC/CSo) и електронните акцептори (N). И при двете концентрации на CO₂ уреята има положително влияние върху фотосинтетичния апарат, като се повишава ефективността на ФС1 (при 2% CO₂) и се увеличава броят на реакционните центрове (RC/CSo) и на електронните преносители (N). Това води до логичното заключение, че намаляването на концентрацията на CO₂ има инхибиращо действие върху фотосинтетичните реакции и при двата източника на азот, но механизмите на това действие са различни в двете среди. От друга страна, и при двете концентрации на CO₂ уреята има положителен ефект върху фотосинтетичния апарат, като индексът на производителност за запазване на енергията на фотоните, погълнати от ФС2 под формата на редуцирани крайни електронни акцептори, се повишава 1,5 пъти. За да се изясни влиянието на промените в хранителната среда върху по-бавно индуциращите се тъмнинни фотосинтетични реакции, свързани с биохимичните пътища за усвояване на CO₂, се налагат изследвания на по-бавни промени в интензитета на флуоресценцията. В дисертацията е предложен и приложен нов подход – протокол за измервания на последователни осветявания и записи на флуоресценцията, който разширява възможностите на използвания флуориметър *M-PEA* и позволява определянето на съществени параметри като фотохимично и нефотохимично гасене и квантов добив на ФС2, които характеризират адаптирането на фотосинтетичния апарат към различни светлинни условия. Детайлният анализ на хода на тези параметри показва, че стойностите на фотохимичното гасене са повлияни по-скоро от концентрацията на CO₂, като при високата концентрация (2%) стойностите за ϕ_F са по-ниски и при двата източника на азот. Промяната в средата повлиява значително нефотохимичното гасене, като отново по-силно влияние има концентрацията на CO₂. Проследените промени в квантовия добив на ФС2 и на тъмнинните спадове на флуоресценцията са позволили на Момчил Паунов да свърже наблюдаваните промени с различното състояние на реакционните центрове, антенните комплекси и електронните преносители.

В следващия раздел на дисертацията са представени данни относно приложението на анализа на индукционните криви на флуоресценцията за определяне на хербицид-индуцираните увреждания на фотосинтетичния апарат и физиологичното състояние на растения след третиране с хербициди. При хибрид на слънчоглед, резистентен към

хербициди, който се третира с хербицида имазамокс и биостимуланта *Terra-sorb foliar*, са проследени промените в индукционните криви на флуоресценцията и с анализ на отделните преходи са изчислени 20 JIP-параметъра. Хербицидът имазамокс повлиява негативно ефективността на първичната фотохимия на ФС2, както и квантовия добив на електронния транспорт и общата производителност на фотосинтетичния апарат (индексите PI_{ABS} и PI_{total}). Установено е, че биостимулаторът има сравнително ограничено въздействие върху фотосинтетичния апарат и променя негативния ефект на хербицида. С анализ на диференциалните криви на относителната вариабилна флуоресценция (V_t) в различните преходи авторът показва връзката на наблюдаваните промени в индукционните криви с ефективността на отделните реакции на електронен транспорт в тилакоидните мембрани, енергийния пренос между антенните комплекси и състоянието на реакционните центрове на ФС2 („затворени” или „отворени”), което позволява да се направи преценка за състоянието на фотосинтетичния апарат и физиологичното състояние на растението.

Анализът на индукционните криви на флуоресценцията е приложен и за изследване на промените в светлинната фаза на фотосинтезата на два екотипа чинар (български и италиански) в отговор на засушаване и последващо рехидратиране. С предложения подход са характеризирани различията между двата типа, както и капацитета им за възстановяване след възобновяване на снабдяването с вода. Българският екотип показва по-висока чувствителност към засушаване, която се изразява в силно намаление на индексите на производителност PI_{ABS} и PI_{total} , но повечето от параметрите се възстановяват при рехидратирането. При италианския екотип се наблюдава много по-слаб ефект на засушаването върху същите параметри, но възстановяването е ограничено и за някои параметри като апроксимирания наклон на индукционната крива (M_0) и разсеяната енергия на реакционен център (DI_0/RC) дори се регистрират по-големи отклонения. По аналогичен начин както при слънчогледа е направен анализ на диференциалните криви за отделните преходи в индукционните криви, който дава възможност да се направят конкретни изводи за механизмите на въздействие на засушаването върху различни компоненти на фотосинтетичния апарат. Установено е, че стресовият отговор се развива бързо – в рамките на 10 – 12 дни след началото на експеримента, като българският екотип се възстановява за 4 дни, а

италианският – за 2 дни. Показано е, че инхибиращият ефект на засушаването засяга и донорната, и акцепторната страна на ФС2, но най-силно е изразен върху електронно-транспортната верига между двете фотосистеми, а смущения в кислород-отделящата система се наблюдават и след края на засушаването.

Влиянието на спектъра и интензитета на светлината върху фотосинтетичния апарат и процеса на цъфтене на растенията е изследвано с грах, като е използван същият биофизичен подход. Анализирани са индукционните криви на флуоресценцията от листа на грах, отгледан при различни светлинни условия – бяла светлина, бяла светлина с нисък интензитет, синьо-червена светлина и синьо-червена светлина с нисък интензитет, като за източници са използвани съответните светодиоди. За коректното изпълнение и интерпретиране на резултатите предварително са анализирани спектралният състав на светлината, интензитетът на излъчването в различните спектрални области и светлинните потоци, абсорбирани от пигментите на фотосинтетичния апарат. Ефектът на различното осветяване върху вида и физиологичното състояние на растенията на 7-ия и 25-ия ден е демонстриран нагледно и с морфометрични данни за различните етапи на развитие и достигане на цъфтеж. Фотосинтезата е изследвана с помощта на JIP-тест, като е показано, че при бяла слаба и синьо-червена светлина има нарастване на потока на погълнатата светлина, падаща се на активен реакционен център (ABS/RC), което едва ли се дължи на по-голяма антена, а по-скоро на по-малък брой активни реакционни центрове на единица площ. При бяла слаба и синьо-червена слаба светлина квантовият добив на електронния транспорт до крайните акцептори на ФС1 е значително понижен. Индексът на производителност за запазване на енергията на погълнатите фотони от ФС2 под формата на редуцирани крайни акцептори е по-нисък при бяла слаба и синьо-червена светлина в сравнение с растенията, отглеждани при бяла светлина. При тези изследвания е приложен анализ на главните компоненти на флуоресцентните параметри, с които са демонстрирани разликите и приликите между характеристиките на фотосинтетичния апарат на четирите групи растения. Въпреки че се наблюдава донякъде и припокриване на анализирани групи, все пак те се разграничават и тези наблюдения са обобщени както следва: при бяла слаба светлина растенията имат по-ниска обща производителност на ФС1 и ФС2 в сравнение с бяла светлина, докато при синьо-червената е нарушено

функционирането само на ФС2, а ФС1 не е засегната, а при слаба синьо-червена светлина е обраното – засегната е ФС1, а ФС2 е с ненарушени функции. По отношение на цъфтежа на растенията докладваните резултати показват, че най-точният ЛР-параметър за предвиждане на цъфтежа е индексът на производителност на запазване на абсорбирана от ФС2 енергия под формата на редуцирани междусистемни електронни преносители.

В раздела „Обобщение на получените резултати” са синтезирани представените в дисертационния труд данни, посочени са ЛР-параметрите, които отразяват коректно промените във фотосинтетичния апарат на изследваните обектите при специфичните третираня и стресови фактори.

Резултатите са обобщени в 9 извода, които съответстват на получената информация от експериментите. Приемам дефинираните **„Приноси”** на дисертационния труд, а именно: 1) разработване на протокол за анализ на гасенето на флуоресценцията на хлорофил а с флуориметър, използващ непрекъснато осветяване, който протокол наподобява регистрацията на гасенето с РАМ-флуориметър; 2) съставяне и анализ на диференциални криви на вариабилната флуоресценция в различните преходи на индукционните криви, които допълват параметрите от ЛР-теста; 3) установяване на подходящ параметър от ЛР-теста, а именно PI_{ABS} (индекса на производителност на запазване на енергията, абсорбирана от ФС2 под формата на редуцирани междусистемни електронни преносители), по който с голяма точност в сравнително ранен стадий на развитие на грахови растения може да се предскаже цъфтежът в покъсен етап.

Стилът на дисертационния труд е ясен и стегнат, представянето на експерименталните резултати е онагледено с качествени фигури и схеми, където е необходимо, е представена статистика.

Авторефератът отразява коректно представените в дисертационния труд материали и е оформен съгласно изискванията.

Бележки и препоръки по дисертационния труд

Дисертационният труд е добре написан и постигнатите резултати са прегледно представени, но се срещат някои пропуски и неточности. На редица места има твърдения, които не са подкрепени с цитиран литературен източник – напр. на стр. 59

при обсъждане на бързата фаза на qr, стр. 62 за ролята на Рубиско, на стр. 68 за ролята на P680⁺ като гасител на флуоресценцията и др.

В „Материали и методи” липсват някои детайли, които би трябвало да бъдат включени, например: описание на процедурата за определяне на концентрацията на хлорофила в експериментите със *Scenedesmus sp.*; информация за рН на средата за отглеждане на водораслите; подробности за определянето на морфометричните параметри и на хлорофилна концентрация при граха. Редно е да се посочи дали третирането с имазамокс и АКЕ е еднократно и когато са приложени заедно, в каква последователност са приложени. Допуснати са и неточности, например температурата на отглеждане на слънчоглед в камери е дадена 22/24°C ден/нощ, а не обратното. Срещат се доста печатни и граматически грешки, някои неточни и неподходящо подбрани изрази като „свръхчервени” вместо тъмночервени и т.н. Бих препоръчала някои от представените в дисертационния труд експериментални резултати и изказани хипотези да бъдат разгледани по-широко в светлината на наличната литература по темата. Формулировката на някои от изводите би могла да бъде по прецизна, например извод 1, който е доста описателен, извод 5, в който би следвало да се посочи дали направеното заключение се отнася с еднаква сила за двата екотипа чинар

Имам следните уточняващи въпроси към докторанта:

1. При изследванията на *Scenedesmus sp.* културите са събирани на 72-рия час на инкубацията. Имайки предвид влиянието на хранителната среда, културите не се развиват еднакво по отношение на брой клетки, пигменти и т.н. При всички среди ли на този 72-ри час се достига средата на експоненциалната фаза на развитие?

2. Разполага ли докторантът с информация от литературата или от други изследвания относно физиологични разлики между изследваните два екотипа чинар? Имайки предвид установената в дисертацията значителна разлика между тях по отношение на толерантността им към засушаване, би могло да се очакват такива разлики, които да са свързани с наблюдаваните различия в отговора на фотосинтетичния им апарат при засушаване.

Резултати от дисертационния труд са публикувани в 4 статии в научни списания, както следва: една в *Journal of BioScience & Biotechnology*, една в *Ecology & Safety*, една във *Frontiers in Plant Science* (IF 4.106) и една във *Photosynthetica* (IF 2.365). Двете

статии с импакт фактор (*Frontiers in Plant Science* и *Photosynthetica*) са съответно в Q1 и Q2 квартали съгласно Web of Science в областта Plant Science. Всички статии вече са получили отзвук в международната научната общност – има забелязани 11 цитирания на публикациите, като всички, с изключение на току-що излязлата от 2020 г., са цитирани по няколко пъти. Момчил Паунов е участвал с постерни съобщения с материали от дисертацията в пет научни форума, национални и международни. Участвал е в разработването на един научноизследователски проект към Фонд „Научни изследвания”.

Заключение: Представеният за рецензия дисертационен труд има ясно изразен научно-приложен характер, но трябва да се подчертае, че голяма част от експерименталните резултати и обсъждането им дават съществен принос към фундаменталната наука и добавят нова информация към знанията ни за първичните процеси на фотосинтезата и за отговора на фотосинтетичния апарат на водорасли и висши растения към стресови фактори от околната среда. Експерименталният материал, представянето му и творческото обсъждане показват, че целите на дисертацията са постигнати и докторантът е усвоил и приложил теоретични знания и практически умения при разработването ѝ. Дисертационният труд е обемно и коректно изпълнено изследване, в голяма степен лично дело на докторанта, което безспорно заслужава положителна оценка. Наукометричните показатели на Момчил Паунов напълно съответстват и надхвърлят критериите за придобиване на научни степени за професионално направление 4.3. „Биологически науки” на СУ „Св. Кл. Охридски”. Дисертационният труд отговаря на изискванията на ЗРАСРБ и на Правилника за условията и реда за придобиване на научни степени и заемане на академични длъжности на СУ „Св. Климент Охридски”. Убедено препоръчвам на уважаемото научно жури да присъди на **Момчил Мартинов Паунов** образователната и научна степен „доктор” в професионално направление „Биологични науки”- „Биофизика”.

07. 05. 2020 г.

София

Рецензент:

(проф. д-р М. Величкова)