

РЕЦЕНЗИЯ

на дисертационен труд за получаване на научната и образователна степен ”доктор” на тема: “*Механизми на адаптация към солеви стрес при Lycium*”

Автор на дисертационния труд: Велмира Людмилова Димитрова

Рецензент: проф. д-р Катя Маринова Георгиева, ИФРГ, БАН

Разработеният в дисертационния труд проблем е изключително актуален и е от важно значение за изясняването на механизмите на адаптация на растенията към солеви стрес. Засоляването е един от основните фактори на околната среда, който инхибира редица метаболитни процеси и забавя растежа и развитието на растенията. Тъй като площта на засолените почви, които са неподходящи за селскостопанско производство нараства е необходимо да се използват растителни видове, които са устойчиви към засоляване и са подходящи за преодоляване на деградацията на засолените почви. Освен това, установяването на морфологични, биофизични, физиологични и биохимични маркери за характеризиране на механизмите на толерантност към солеви стрес е от съществено значение.

Изследванията са проведени с подходящо избрана моделна система – два вида от род *Lycium (Solanaceae)*, *Lycium barbarum* и *Lycium chinense*, отгледани *in vitro*. Видовете от род *Lycium* са многогодишни храсти, които се характеризират с висока сухо- и солеустойчивост и могат да се използват за предотвратяване на деградирането и засоляването на застрашени почви. Освен това, изследванията върху толерантността към солеви стрес на тези видове, култивирани *ex vitro* при различни условия на отглеждане – хидропонни и оранжерийни, са все още недостатъчни. Проучването е резултат от ползотворно сътрудничество между Катедра «Физиология на растенията» при Биологически факултет на СУ „Св. Климент Охридски” и фирма БИО ТРИИ ООД, където докторантката работи от 2013 г.

Дисертационният труд е написан на 158 страници, структуриран е според изискванията за придобиване на образователната и научна степен „доктор” и включва разделите: Увод (2 стр.), Литературен обзор (42 стр.), Цел и задачи (1 стр.), Материал и методи (16 стр.), Резултати и обсъждане (60 стр.), Заключение (9 стр.), Изводи (1 стр.), Приноси

(1 стр.), Цитирана литература (20 стр.) и Приложение (10 стр.). Цитирани са 319 литературни източници. В дисертационния труд са включени 40 фигури и 11 таблици. Освен това, в приложението са представени 5 таблици и 16 снимки.

Литературният обзор е много подробен и информативен. Прави изключително добро впечатление структурирането на тематичните раздели, които са представени в много добра логическа последователност. Направена е характеристика на халофитните и гликофитните растения. Разгледано е влиянието на засоляването върху растежа и развитието на растенията, както и на адаптивните механизми за преодоляване на солевия стрес. Представена е подробна информация за промените във фотосинтетичната активност и причините за инхибирането ѝ, както и за ролята на неензимните и ензимните антиоксиданти в защитата на растенията при засоляване. Особено внимание е обърнато на промените в хлорофилната флуоресценция като чувствителен, надежден и неинвазивен метод за тестиране на устойчивостта на растенията към стрес. Представена е интересна информация за приложението на растението в медицината, козметичната индустрия, хранително-вкусовата промишленост, за декоративни цели и в борбата с ерозията. Изтъкнати са причините за необходимостта от *in vitro* размножаване и предимствата му.

Доброто познаване на литературата по изследвания проблем е позволило на дисертантката да формулира точно **целта и задачите** на своята дисертация. За по-задълбоченото характеризиране на механизмите на адаптация и толерантност към солеви стрес на *Lycium barbarum* и *Lycium chinense* е изследван ефектът на кратковременното и продължителното засоляване на растения, отгледани съответно при хидропонни и оранжерийни условия. В методично отношение дисертационният труд впечатлява с използването на редица физиологични, биофизични и биохимични **методи**, което позволява получаването на научни резултати, напълно съответстващи на поставените цел и задачи. Всички методи са описани подробно и по начин, който позволява тяхното възпроизводство от други учени. Много добро впечатление прави добрата статистическа обработка на данните, което е допринесло за правилното описание и дискутиране на получените резултати.

От прегледа на изложените в раздел Материали и методи експериментални техники може да се заключи, че в процеса на обучението си докторантката е усвоила много и разнообразни методи и се е изградила като високо квалифициран специалист. Тя притежава отлична методична подготовка, придобила е значителен научно-изследователски опит, който ще ѝ помогне в бъдещите изследвания.

Представяне и обсъждане на получените резултати. Извършена е значителна по обем експериментална работа. Проведени са комплексни изследвания и са получени съществени резултати, които са представени на 38 фигури и 11 таблици. Представения в приложението снимков материал позволява да се проследят промените в растенията в процеса на отглеждането им при хидропонни и оранжерийни условия. Изложението е стегнато и ясно. В първата част на раздела са представени резултатите от влиянието на кратковременното засоляването (за период от 10 дни) с нарастващи концентрации на NaCl (50, 100, 200 mM) върху чувствителността и адаптивната способност на *Lycium barbarum* и *Lycium chinense*, отгледани като хидропонни култури. Във втората част са представя резултатите от ефекта на продължителното засоляване на растенията (в продължение на два вегетационни периода - от април 2015 г. до септември 2016 г.) при оранжерийни условия. Прави много добро впечатление обобщаването на получените резултати в заключение.

По-интересните и значими резултати могат да се обобщят както следва:

1. Хидропонни опити

Предполага се, че двете растения притежават различни механизми за регулация на поглъщането и транспорта на соли от корените към надземните части. Получените резултати показват, че количеството на акумулирания Na^+ постепенно нараства в корените на *Lycium barbarum*, докато при *Lycium chinense* намалява с увеличаване на степента на засоляване на хранителния разтвор. Количеството на Na^+ нараства силно в надземните части на *Lycium chinense* и много по-слабо при *Lycium barbarum*.

Третирането на растенията с 200 mM NaCl силно понижава отношението на свежа/суха биомаса при корени и надземни части на *Lycium barbarum*, докато при *Lycium chinense* то се повишава, независимо от промените в количеството на Na^+ .

Сравняването на получените резултати за скоростта на фотосинтезата при най-високата концентрация на NaCl показва, че тя е 2 пъти по-висока при *L. chinense*. Понижаването на фотосинтетичната активност на *L. barbarum* в резултат на третирането на растенията с 200 mM NaCl корелира с пониженото хлорофилно съдържание. Количеството на каротеноиди и пролин нараства и при двата вида *Lycium*.

Измерването на параметрите на хлорофилната флуоресценция показва, че третирането на *L. barbarum* и *L. chinense* с 200 mM NaCl повишава квантовия добив на пър-

вичната фотохимична реакция до акцептора Q_A (ϕP_0) и добива на електронния транспорт след Q_A (ϕE_0), особено при *L. chinense*. Аналогични промени са установени и за индексите на производителност, performance index (PI_{ABS} , PI_{Total}), които отразяват общото състояние на фотосинтетичния апарат. И при двата изследвани вида се наблюдава слабо понижаване на параметъра ϕR_0 , който отразява редукцията на крайните електронни акцептори, откъм акцепторната страна на ФСІ. В съгласие с установените промени във фотохимичната активност, топлинната дисипация на енергията на възбуждане намалява при третираните с 200 mM NaCl растения и то е по-силно при *L. chinense*. Получените резултати показват, че параметрите на хлорофилната флуоресценция, които се повлияват по-силно от солевия стрес и могат да се използват като стресови маркери са квантовия добив на първичната фотохимична активност на ФСІІ (ϕP_0) и индексите на производителност (PI_{ABS} , PI_{Total}).

Промените в количеството на МДА често се използват като маркер за силата на стресовото въздействие. Установено е, че количеството на МДА многократно нараства в стресираните с 200 mM NaCl растения *L. barbarum* в сравнение с контролата, докато при *L. chinense* то не се променя. Тези резултати са в съответствие с промените в количеството на H_2O_2 ,

Направена е задълбочена характеристика на промените в антиоксидантната активност на двата вида *Lycium*, подложени на солеви стрес чрез измерване на промените в количеството на неензимните антиоксиданти аскорбат и глутатион, активността на ензимите аскорбат пероксидаза, глутатион редуктаза, супероксид дисмутаза, каталаза и гваякол пероксидаза, както и общото количество на фенолите и флавоноидите. Представени са и промените в общата антиоксидантна активност. С изключение на СОД, активността на изследваните антиоксидантни ензими се понижава в резултат от третирането на растенията с 200 mM NaCl в сравнение с контролата, което е в съответствие с промените в общата антиоксидантна активност.

Показано е, че фосфоенолпируват карбоксилазата и пируват ортофосфат дикиназата играят съществена роля в метаболизма на органичните киселини и установяването на CO_2 концентриращ механизъм, особено при фотосинтезата на *L. chinense*, тъй като ходът на промените на двата ензима съвпада с този на нето-фотосинтезата.

Резултатите от хидропонните опити характеризират *Lycium chinense* като по-толерантен към засоляване в сравнение с *Lycium barbarum*.

2. Оранжевийни опити

Установено е, че продължителното влияние на солевия стрес води до по-голямо натрупване на Mg^{2+} , Ca^{2+} , K^+ , и особено на Na^+ в надземните части на *Lycium chinense* в сравнение с корените. При отглеждане на *Lycium barbarum* на засолена почва е установен акропетален градиент на разпределение единствено на Na^+ . Предполага се, че *L. barbarum* е по-слабо толерантен към засоляване в сравнение с *L. chinense*, тъй като съхранява по-големи количества Na^+ в корените в сравнение с надземните части. При *L. barbarum* е по-силно изразен механизмът за избягване на стресовото влияние посредством отделянето на излишните количества Na^+ в ризосферната зона на корените, а високата толерантност към засоляване на *Lycium chinense* се дължи вероятно на по-благоприятното съотношение на K^+ и Ca^{2+} спрямо Na^+ .

Сравняването на промените в скоростта на фотосинтезата на растенията, отгледани на незасолена и засолена почва показва, че тя слабо нараства при продължителното отглеждане на *Lycium barbarum* на засолена почва, докато при *L. chinense* слабо намалява, но разликите не са статистически достоверни. Правят впечатление изключително ниските стойности на CO_2 асимилация на растенията *Lycium barbarum* в сравнение с тези на *L. chinense*. Такива различия в скоростта на фотосинтеза не се наблюдават при контролните растения, отгледани като хидропонните култури.

Растенията, отгледани продължително на торф се характеризират с най-висока фотохимична активност. Сравняването на промените в параметрите на хлорофилната флуоресценция, измерени в растенията и от двата вида, отгледани на незасолена и засолена почва показва слабо понижаване на квантовия добив на първичната фотохимична реакция до акцептора Q_A (ϕP_0) и на електронния транспорт след Q_A (ϕE_0) и слабо повишаване на ϕR_0 индекса на производителност (PI_{Total}).

Установена е повишена активност на СОД и каталаза, при отглеждане на двата вида върху незасолена и засолена почва, както и на глутатион редуктаза, но само при *Lycium barbarum*, в сравнение с отглеждането им на торф-перлит. Тези резултати корелират с повишаване на количеството на МДА и H_2O_2 . Установяването на повишена активност на СОД при хидропонните и оранжевийните опити показва, че тя може да се използва като маркер за толерантност към солеви стрес.

В заключението докторантката е обобщила резултатите от всички направени анализи, което показва способността ѝ да систематизира информацията от получените данни.

Изводите от дисертационния са в пълно съответствие с получените резултати. Приемам посочените **научни приноси**, които имат оригинален характер.

Авторефератът е оформен съгласно изискванията и отразява основните раздели и резултати от дисертационния труд.

Резултатите от изследванията са публикувани в 4 научни статии - две в *Annuaire de l' Universite de Sofia "St. Kliment Ohridski"*, една в *Comptes rendus de l'Academie Bulgare des Sciences* и една в *Genetics and Plant Physiology*. Във всички публикации Велмира Димитрова е първи автор. Част от резултатите са представени на 3 научни мероприятия.

Към дисертационния труд имам следните препоръки и въпроси:

Според мен е по-добре получените резултати за промените в натрупването на Ca^{2+} и Mg^{2+} в корените и надземните части на двата изследвани вида да бъдат представени след тези за Na^+ и K^+ , а не след промените в количеството на пролин в листата им. А резултатите за влиянието на NaCl върху някои ензими от C_4 метаболизма би трябвало да са представени след промените в скоростта на нето-фотосинтезата.

Добре е да се подчертае, водното съдържание на растенията не се повлиява от солевия стрес, т.е. установените промени не се дължат на дехидратиране.

Как може да се обясни по-силно изразения инхибиторен ефект от третирането на *L. chinense* при 100 mM NaCl в сравнение с 200 mM (Фиг. 10; Фиг. 14, Фиг. 15)?

Какво е предимството от измерването на антиоксидантната активност чрез използването на различни методи?

От представените резултати е ясно, че изборът на торф-перлит за засаждане и дълготрайно съхранение на посадъчен материал от двете растения е удачен, но не е съвсем ясно дали отглеждането на растенията на торф-перлит може да се приеме като контрола или е по-добре да се сравняват резултатите от отглеждането на растенията на незасолена и засолена почва?

Заклучение

Дисертацията на Велмира Димитрова е едно сериозно и задълбочено изследване, проведено на много добро научно ниво. Използвани са съвременни физиологични, биофизични и биохимични методи и са получени научни резултати, които представляват оригинален принос в изучаването на механизмите на адаптация към солеви стрес и имат важно практическо значение. Дисертационният труд отговаря на всички на изискванията на Закона за развитие на академичния състав и на Правилника за приложението му. Велмира Димитрова притежава задълбочени теоретични знания и професионални умения в областта на физиологията и биохимията на растенията. Всичко това ми дава основание убедено да препоръчам на уважаемото Научно жури да присъди образователна и научна степен „**доктор**” на Велмира Людмилова Димитрова.

30.04.2018 г.

Рецензент:

проф. д-р Катя Георгиева