

РЕЦЕНЗИЯ

върху дисертационния труд на доц. д-р Любен Иванов Загорчев за присъждане на научната степен „доктор на науките” по професионално направление 4.3. Биологически науки (Молекулярна биология) на тема: „Влияние на биотични и абиотични фактори върху паразитизма на стъблени холопаразитни растения от род *Cuscuta* L. (сем. *Convolvulaceae*)”

от проф. д-р Росица Борисова Бъчварова - член на научното жури, съгласно Заповед № РД 38-157 / 03.04. 2023 г. на Ректора на Софийския университет „Св. Климент Охридски“.

Като член на журито, ангажирано да разгледа представения от доц. д-р Любен Загорчев дисертационен труд за присъждане на научната степен „доктор на науките“, потвърждавам, че са ми предоставени всички документи и материали, необходими за тази процедура според ЗРАСРБ, ППЗРАСРБ и Правилника за развитие на академичния състав на СУ „Св. Климент Охридски“.

Кратка информация за кандидата

Любен Загорчев завършва магистратура през 2006 г. по Молекулярна биология в Биологически факултет на Софийския Университет “Св. Климент Охридски” с отличен успех.

През периода 2007-2012 г. е докторант към катедра Биохимия и през 2011 г. защитава дисертация на тема “Биохимични промени в състава и структурата на клетъчната стена на ембриогенни калусни култури на *Dactylis glomerata* L., третиран с NaCl” за ОНС „доктор“.

От 01.2010 до 03.2013 г. заема длъжността асистент в същата катедра, а в периода 2013- 2017 г. е главен асистент. От 2017 г.– до сега, Любен Загорчев е доцент в катедра Биохимия на Биологическия факултет, Софийски Университет “Св. Климент Охридски”.

От 2020 той е и заместник декан по управление на качеството, научната и проектна дейност и акредитации на БФ на СУ. Ръководител е на двама докторанти за ОНС „Доктор“.

Доц. Загорчев е член на две международни научни организации: International Parasitic Plant Society - от 2019 г. и Scandinavian Plant Physiology Society, част от FESPB – от 2011 г.

Информация за дисертацията и автореферата

Дисертационният труд на Любен Загорчев е с общ обем 276 страници, в това число увод и литературен обзор- 48 страници, цел, задачи и материал и методи- 18 стр., резултати структурирани в 5 раздела- 68 стр., дискусия, изводи и приноси- 30 стр. и библиография от 337 заглавия, от които 335 на чужди езици. Обемът и най-вече представените литературни източници са доказателство за сериозните

и дългогодишни проучвания върху изследователското поле на дисертационния труд. Включени са 7 приложения, справка за научните приноси и списък с научните публикации. По темата на дисертацията Любен Загорчев има 20 публикации в специализирани научни издания, сред които: с импакт фактор: 14 (11 Q1; 2 Q2; 1 Q3); с импакт ранг: 3 (1 Q1; 1 Q2; 1 Q3); глави от книги: 3 (1 колективна монография на китайски език). В публикациите той е първи автор в 13 от тях и кореспондиращ автор в 11 с общ IF: 51.88. Установените цитирания само по Scopus на тези публикации са 351. По темата на дисертацията доц. Загорчев е участвал с презентации в девет международни и десет национални научни форуми. Той е ръководител на 7 научни проекта, 5 от които международни и участник в 12 научни проекта и една COST акция. Дисертантът е научен ръководител на 11 защитени дипломни работи на студенти в ОКС Бакалавър и ОКС Магистър по тематиката на дисертационния труд.

Авторефератът, приложен към документацията по защитата, е с обем 53 страници и включва: съдържание, представяне на основните резултати на дисертационния труд, библиография, изводи и справка за приносите, списък на научни трудове, свързани с дисертационния труд. Авторефератът отразява основните резултати от дисертацията.

Дисертационният труд е написан на много добър научен стил, а резултатите са онагледени с 86 фигури, 15 таблици и 4 приложения.

От направената справка за съответствие с минималните национални изисквания за НС „доктор на науките“ в съответната област е видно, че доц. Загорчев покрива изискуемите точки по група показатели А и Б и значително надхвърля минималните 100 точки по група показатели Г и Д, които са съответно 405 и 556.

Актуалност на проблема

Преди всичко, искам да отбележа оригиналността и актуалността на избраната тема за дисертационния труд на Любен Загорчев.

По данни на фондацията IFIC производителите на селскостопанска продукция в световен мащаб трябва да се борят с приблизително 80 000 болести по растенията, 10 000 насекоми и 30 000 плевелни растения. Последните данни сочат, че загубите от болести, неприятели и плевели възлизат на 45 % от добивите на земеделските култури, в това число и от паразитни растения. Установени са около 2500 паразитни цветни растения, отнасящи се към 10 семейства. Едно от тези семейства е Convolvulaceae, род Cuscuta, който включва около 200 вида стъблени холопаразитни растения, които имат значително влияние върху естествени и културни растения. Те инфектират голям брой растителни видове, причинявайки значителни загуби от реколтата в световен мащаб.

Настоящата дисертация има за цел да задълбочи познанията за разпространението на паразитните растения от род Cuscuta в Република България, техния спектър от гостоприемници и генетичното разнообразие чрез класически и съвременни молекулярни и биохимични методи. Освен

това, да бъде изследвано влиянието на биотични и абиотични фактори върху взаимоотношенията паразит – гостоприемник.

Проучено е влиянието на абиотичния стресов фактор- засоляване върху паразитните растения и техните гостоприемници в процеса на паразитизъм. За целта са използвани отново широк спектър биохимични и молекулярнобиологични подходи.

Оценено е влиянието на паразитизма и върху почвените микробиални съобщества чрез метагеномен анализ.

Анализ на научните и научноприложните постижения на кандидата, съдържащи се в представения дисертационен труд

Това е първото задълбочено изследване върху паразитното растение кускута в нашата страна. Получените резултати в дисертационния труд имат съществен принос за изясняване на фундаментални научни проблеми, касаещи взаимодействията растение – паразит.

В периода 2017-2021 година е събран растителен материал от общо 54 находища на четири от най-разпространените в България видове кускута: *Cuscuta approximata* – 6 бр., *C. campestris* – 35 бр., *C. epithymum* – 9 бр. и *C. europaea* – 4 бр. Всички находки са определени морфологично и са потвърдени с ДНК анализ чрез PCR амплификация и секвениране на региона на рибозомална ДНК.

Установени са 114 вида гостоприемници, отнесени към 87 рода и 33 семейства, всички от отдел покритосеменни растения (Magnoliophyta). Най-голямо разнообразие от видове-гостоприемници има сред представителите на семейство Бобови (Fabaceae) – 19 вида, следвани от сем. Сложноцветни (Asteraceae) – 16 вида, сем. Устноцветни (Lamiaceae) и сем. Розоцветни (Rosaceae) – по 8 вида.

Генетичното разнообразие на паразита е оценено по ITS секвенциите и е построено филогенетично дърво по метода на maximum likelihood, като са използвани наличните секвенции от рДНК региона от кускута. Установено е ясно разграничаване на *C. campestris* от останалите три проучвани вида. С цел установяване на междупопулационни разлики при кускута е приложен RAPD анализ и на база RAPD маркери на избрани популации *Cuscuta campestris* са установени значителни междувидови разлики в профилите, като е построено UPGMA филогенетично дърво.

Проучено е влиянието на различни абиотични и биотични фактори върху покълването и етапите на развитие на кускутата преди заразяване на растение гостоприемник. Установена е оптималната температура от 28⁰С за покълване на семената от паразита. Потвърдена е тенденцията към намаляване на кълняемостта им с напредването на възрастта на семената и влиянието на различни концентрации от NaCl върху процента на покълване. Установено е, че предварителното покълване при засоляване има отрицателен ефект върху способността на кускутата да инфектира растенията и увеличава периода на инфектиране и образуване на вторични стъбла- по-дълго време за прикрепване към гостоприемника (закъснение от 3-4 дни) и по-дълго време за образуване на вторично стъбло (закъснение от 2-3 дни).

Проучено е влиянието на гостоприемника и засоляването върху формирането на хаустория. Установено е, че формирането му до голяма степен зависи от вида на гостоприемника и с микроскопски снимки на прерези е установено, че при *Thymus vulgaris* (мащерка), *Arabidopsis thaliana* и *Capsicum annuum* (чушка) хаусториите успешно достигат до проводящата система на гостоприемника, докато при растения, които не са гостоприемници на кускутата като устойчив домати *Lycopersicon esculentum* и *Zea mays* (царевица) хаусториите не проникват в резултат на активен защитен отговор на гостоприемника, като покафеняват и загиват.

Определени са ензими с вероятно участие във формирането на хаустория чрез зимограмни анализи на белтъци от клетъчна стена, изолирани в мястото на контакт на *Cuscuta campestris* и *Arabidopsis thaliana* (гостоприемник), третирани с 0, 50 и 150 mM NaCl във фази: преди контакт с растението гостоприемник; при завиване; при макроскопски видими хаустории и при формиране на вторично стъбло. Изследвани са протеази и е установено, че най-ясно изразени изоформи, асоциирани с взаимодействието между паразит и гостоприемник се наблюдават в етапа на макроскопски видими хаустории. Доказано е, че тези промени са по-ясно изразени при *Cuscuta*, отколкото при *Arabidopsis* и зависят от засоляването, на което е подложен гостоприемника. Чрез зимограмен анализ са изследвани ксиланази, целулази, протеази, пектинази, пектинметил естерази и пероксидази. Установено е, че и при трите изследвани растения - арабидопсис, царевица и домати има наличие на нови изоформи в резултат на инфекцията с кускута.

Проведени са имуноблот анализи на въглехидратни епитопи от хидроксипролин богати протеоглици в мястото на инфекция на гостоприемника (*Arabidopsis*), резистентен домати и невъзместим (царевица) при 0 и 150 mM NaCl. Проучено е влиянието на растението гостоприемник върху метаболитния профил на паразитното растение.

Анализирани са промените в протеома на гостоприемника *Arabidopsis thaliana*, инфициран с *Cuscuta australis*. Диференцираното количество белтъци е оценено чрез двумерна полиакриламидна гел-електрофореза в стъблото и листата на растенията гостоприемници. С протеомния анализ на белтъчно ниво при нападение от кускута е установено повишаване съдържанието на редица белтъци в гостоприемника като глутатион S-трансферазата Atpm24.1, която участва в антиоксидантния отговор при нападение на растенията от патогенни гъби, бактерии и вируси.

Изследвани са четири почвени ензими за оценка влиянието на паразитното растение върху качествата на почвата - сулфорилази, глюкозаминидази, кисели фосфатази и бета-глюкозидази в почва, в която са отглеждани *C. campestris* върху гостоприемник люцерна.

Установена е тенденция за намаляване активността и на четирите ензима, което води до по-малка достъпност на фосфати, сулфати и азотни съединения за растенията.

Проучено е взаимодействието на паразит и гостоприемник с други биотични фактори като епипаразитни галообразуващи твърдокрили от род *Smicronyx*, като е проучена фотосинтетичната активност на галите, вследствие нападението на гостоприемника арабидопсис.

Влиянието на паразитизмът на *Cuscuta* spp. върху гостоприемниците е значително и това е демонстрирано чрез изследване на фотосинтезата и транскриптома на гостоприемниците. Направен е транскриптомен анализ на растения от *Trifolium repens*, заразени с *Cuscuta australis*. Идентифицирани са 1 601 диференциално експресирани гени (DEG) между заразен и контролен гостоприемник, от които 945 DEG с повишена експресия и 656 DEG с понижена експресия. Подобен анализ е направен и при *Arabidopsis*, заразен с *Cuscuta chinensis*, като са установени 2 216 DEG, от които 1 411 с повишена експресия и 805 с понижена експресия.

Анализиран е и отговора на гостоприемника към засоляване при паразитизъм от *C. campestris* в зависимост от разстоянието до инфекцията. Инфектираните растения-гостоприемници показват почти двукратно намаляване на натрупването на L-Pro както в незаразените, така и в заразените листа и намаляване активността на SOD и CAT, особено в мястото на инфекцията.

Установено е, че паразитизмът на *C. australis* увеличава ефективните оперативни таксономични единици OTU на Acidobacteria Gp4 и Acidobacteria Gp9, бактерии от Xanthobacteraceae и намалява за бактерии от Nocardiaceae, Rhizocola, Pseudoxanthomonas и Craurococcus, докато увеличава OTU на Rhodospirillales, Latescibacteria и други неидентифицирани родове. Доказано е значително намаляване количеството на гъби от родовете Piriformospora, Orbiliaceae, Xylomyces и Devriesia, докато се увеличава броя на представители от Helotiales, Preussia и Davidiella.

Проучено е взаимодействие на двойката паразит-гостоприемник с други биотични фактори. Установено е, че няколко вида бръмбари-хоботници от род *Smicronyx* изразяват специфични предпочитания към *Cuscuta* spp. Гали на *Smicronyx* sp. са установени в около 10% от популациите на *C. Campestris*, но не са установени върху растенията-гостоприемници. Доказано е, че при *Cuscuta campestris* броят и интензитета на хитиназните изоформи се увеличава при третиране с растителноядни насекоми като цикадата *Metcalfa pruinosa*.

Важен резултат е установяването, че предимно *Cuscuta campestris*, се явява резервоар и вектор на растителни вируси. Тестваните четири вируса TMV, AMV, TYLCV и CMV са избрани на базата на тяхната икономическа значимост. Чрез ELISA метод TMV и AMV не са открити в нито една от изследваните проби, докато TYLCV и CMV са установени сред популациите на *C. campestris*. Доказана е възможността за предаване на CMV в посока паразит-гостоприемник, което демонстрира потенциала на паразитните растения като вирусни вектори.

Като най-значими приноси на дисертационния труд могат да бъдат посочени следните:

- За първи път в нашата страна е направено картиране на местообитанията на паразитните растения от род *Cuscuta*. Установени са 114 вида гостоприемници, отнесени към 87 рода и 33 семейства, принадлежащи към отдел покритосеменни растения (Magnoliophyta).
- Пручено е генетичното разнообразие на паразита и е построено филогенетично дърво по метода на maximum likelihood, като са използвани секвенции от рДНК региона от кускута. Установено е ясно разграничаване на *C. campestris* от останалите три проучвани вида: *Cuscuta approximate*, *C. epithymum* и *C. europaea*.
- Установени са значителни междувидови разлики в профилите на отделни популации *Cuscuta campestris* чрез RAPD анализ и е построено UPGMA филогенетично дърво.
- За първи път е проучено влиянието на абиотичен стрес върху паразитни растения, като са установени значителни ефекти на вида гостоприемник върху адаптацията на *Cuscuta* spp. към засоляване.
- Установено е, че нападението от кускута влияе негативно на фотосинтетичната активност на гостоприемника както в светлинно-зависимите, така и в реакциите на асимилация на CO₂.
- Доказан е значителен ефект върху взаимодействията между кореновата система и ризосферните микробиални съобщества при паразитизъм от *Cuscuta*, като се променя метаболизма на корените, относителните дялове на микробиалните таксони и активността на почвени ензими, като се влошава обмяната на органична материя и минерални съединения.
- Установено е, че паразитните растения от род *Cuscuta* могат да бъдат преносители на вируси като CMV (Cucumber Mosaic Virus), които могат да заразят гостоприемника, без симптоми на вирусна инфекция по паразита.

- Определени са ензими и гликопротеини, които участват в процеса на формиране на хаустория.
- Обогатени са данните за промените във фотосинтетичния апарат на *Cuscuta campestris* при епипаразитизъм на галообразуващи насекоми от род *Smicronyx*.
- Потвърдено е негативното влияние на кускутата върху ризосферните взаимодействия и почвеното здраве.

Критични бележки и препоръки

В текста на дисертацията често се изрежда „...съвместим (*Arabidopsis*), резистентен (домат) и невъзместим (царевица) гостоприемник“. Гостоприемникът в случая е само арабидопсис, които се напада от кускутата- успешно се осъществява проникване на хаустория на паразита и контакт с проводящата система на растението. Царевицата и устойчивите домати не са гостоприемници на кускутата.

Имам само една препоръка: в литературния обзор не са цитирани някои съвременни разработки от български учени, свързани с тематиката на дисертацията.

Заключение: Представеният от доц. Любен Загорчев дисертационен труд и научните публикации към него, както качеството и оригиналността на представените в тях резултати и постижения, отговарят на изискванията на ЗРАСРБ, Правилника за приложението му и съответния Правилник на СУ „Св. Климент Охридски“ за придобиване от кандидата на образователната и научна степен „доктор на науките“.

Изхождайки от значимостта на изследваната проблематика, положителните характеристики на дисертационния труд, несъмнените приноси на автора, убедено давам своята положителна оценка за разгледания дисертационен труд и гласувам „за“ присъждането на научната степен „доктор на науките“ на доц. д-р Любен Иванов Загорчев по професионално направление 4.3. Биологически науки (Молекулярна биология).

05.06.2023 г.

Изготвил рецензията:

проф.дсн Росица Бъчварова