


Вх. № 752
Дата: 09.08.2018г.
Дело № НО-05
Подпис: 

## РЕЦЕНЗИЯ

от проф. д.с.н. Дияна Лилова Светлева, Аграрен университет – Пловдив на дисертационен труд за присъждане на образователната и научна степен “доктор” в област на висше образование 4. Природни науки, математика и информатика; Професионално направление: 4.3. Биологични науки; научна специалност: „Генетика (шифър 01.06.06)“ към Института по биоразнообразие и екосистемни изследвания (ИБЕИ) – БАН, Отдел „Екосистемни изследвания, екологичен риск и консервационна биология”, Секция „Мутагенез от околната среда ”

**Автор:** редовен докторант **Цвета Владимирова Ангелова**

**Тема:** ”Биохимични и молекулни маркери за устойчивост към окислителен стрес“

**Научен ръководител:** проф. д-р Стефка Чанкова;

**Консултант:** гл. ас. д-р Петя Първанова

Със заповед № 61 /20.06.2018 г. на Директора на Института по биоразнообразие и екосистемни изследвания (ИБЕИ) към БАН, съм определена за член на научното жури във връзка с процедура за защита на дисертационен труд „**Биохимични и молекулни маркери за устойчивост към окислителен стрес**” на редовния докторант към Института **Цвета Владимирова Ангелова**. Приложени са общо 10 документа, изготвени съгласно изискванията на Закона за развитието на академичния състав в Република България (ЗРАСРБ), Правилника за неговото приложение и Правилника на ИБЕИ за провеждане на процедури за присъждане на научни степени.

Представени са копия на 3 научни публикации и 4 участия в научни форуми с доклади, отразяващи изследванията по дисертационния труд.

### **1. Обща характеристика на дисертационния труд – обем и структура.**

От докторантката Цвета Ангелова е използвана класическата структура за оформяне на дисертационен труд, при която след преглед на публикуваните литературни източници по проблема са описани целта и задачите за изпълнение, методологичните подходи, представени са получените резултати и е направено тяхното обсъждане. В края са формулирани изводи. Дисертационният труд отговаря на възприетите и утвърдени изисквания, посочени в чл. 27 ал. 2 от Правилника за прилагане на ЗРАСРБ.

Дисертационният труд е с общ обем от 160 страници и включва 8 основни раздела (Увод; Литературен обзор; Цел и задачи на изследването; Материали и методи; Резултати и обсъждане; Заключение, към което са включени - декларация за оригиналност, изводи и приноси; Списък на цитираната литература – общо 377 заглавия, от които - 7 на кирилица и 370 на латиница; 2

броя приложения - използвана апаратура и снимки от експериментална схема 2, с ясни и добре обясняващи текстове на фигурите). Включени са 10 таблици и 29 фигури, от които 6 са снимки на използваната апаратура и растителен материал.

Особено ми допадна снимковото пано, представено във фигура 29, което е с много добро качество и от него ясно може да се видят разликите в отделните варианти.

## **2. Кратки биографични данни на докторантката.**

Асистент Цвета Владимирова Ангелова е родена на 09.11.1978 г. в гр. София.

През 1995 год. завършва основното си образование със специалност "Стенография" в 4 СОУ "Н. Й. Вапцаров" с изучаване на чужди езици, а през 1997 год. средното си образование със специалност "Химия и биология" в 19 СОУ "Елин Пелин".

Висшето си образование получава в Биологическия факултет на Софийския университет "Св. Кл. Охридски" със степен „магистър“ по специалността "Биология и химия" с професионална квалификация "Учител по биология" и втора специалност, "Учител по химия". По време на следването е провела допълнителна специализация по "Ботаника".

От 2004 год. до сега е работила като възпитател, учител по биология и химия. Заемала е длъжности като специалист по биология и химия в Института по генетика към БАН.

През месец януари 2005 год. е избрана за научен сътрудник III степен в Института по генетика към БАН, секция „Биохимична генетика“, а от октомври 2016 год. до момента е избрана за асистент в ИБЕИ - БАН.

От месец октомври 2013 год. е приета за редовен докторант по научната специалност "Генетика" (шифър 01.06.06) към отдел „Екосистемни изследвания, екологичен риск и консервационна биология“, Секция „Мутагенез от околната среда“ към Института по биоразнообразие и екосистемни изследвания (ИБЕИ) - БАН. Отчислена е с право на защита на 10.10.2017 год. след гласувано едногодишно удължение на срока на докторантурата.

Има публикувани 11 статии, 3 от които са във връзка с разработената дисертация.

През последните 5 години е взела участие с доклади в 8 проведени научни конференции в София, като 6 от тях са с международно участие.

Участвала е в 5 проекта като член на научните колективи. Един от тези проекти е финансиран от Фонд „Научни изследвания“ към МОН.

Във връзка с изпълнение на учебната си програма като докторант Цвета Ангелова посещава различни курсове за повишаване на теоретичните си познания по: „Статистически анализ“, „Английски език“, „Молекулни основи на стреса при растенията“ и „Въведение в изследователската работа“.

Има добри компютърни умения и владее работата с различни софтуерни програми като PowerPoint; Adobe Photoshop; CorelDraw и GraphpadPrism.

Владее отлично английски и на добро ниво френски език.

### 3. Актуалност на разработения дисертационен труд.

Актуалността на разработения от докторантката Цвета Ангелова дисертационен труд се обуславя от следните особености:

- Растенията са изложени на различни абиотични и биотични стресови фактори от различно естество;
- В еволюционното си развитие те са създали различни механизми за преодоляване на стреса от околната среда;
- Известно е, че отговорът на растенията към стрес зависи силно от проучваните генотипи, фазите от развитието на растенията, интензивността и продължителността на стреса;
- През последните години учените обръщат все по-голямо внимание на засилващото се засушаване и повишаване нивата на ултравиолетово облъчване, които нанасят големи щети на много икономически важни растителни видове;
- Засушаването и облъчването с ултравиолетови лъчи могат да доведат до окислително увреждане – нарушаване на нормалния метаболизъм чрез нарушаване синтеза на растителните пигменти, липиди, протеини и нуклеинови киселини;
- Използването на различни биохимични и молекулни маркери: малондиалдехид (МДА), общи пероксиди (Pox), пролин (Pro), редуциращи захари (RS), фотосинтетични пигменти, супероксид дисмутазна активност (СОД), каталазна активност (КАТ), белтъци на топлинния стрес (HSP70B) и други могат да спомогнат за още по-категоричното разбиране и установяване на механизмите, които контролират устойчивостта на растенията към стресови фактори.

Целта и задачите за изпълнение от дисертантката следват като продължение и резултат от постигнатото до момента в дадената област, отбелязано в литературния преглед.

Основната цел на дисертационната работа е ясно определена: да се характеризира стресовият отговор на близкородствени генотипове обикновен фасул (*Phaseolus vulgaris* L.) към окислителен стрес, индуциран от засушаване и да се определи адаптивният им потенциал, както и да се разработи система от биохимични и молекулни маркери за ранна диагностика на устойчивостта към окислителен стрес, индуциран от засушаване, UV-B и комбинираното им въздействие.

Като моделна тест система са използвани български сортове *Phaseolus vulgaris* L. (Добруджански 2, Добруджански 7 и Добруджански ран).

Поставените за изпълнение пет задачи са свързани с използването на съвременни методологии, техники и анализи. Всички задачи са изпълнени по време на изведените експерименти.

Необходимо е да отбележа, че представената за рецензиране дисертация в този вид, в сравнение с варианта за предзащитата, е много по-стегнат, завършен и прецизен. Това ми дава основание да изкажа своето

удовлетворение и похвала към научния ръководител – проф. д-р Стефка Чанкова и към докторантката.

#### **4. Литературна осведоменост и теоретична подготовка.**

Литературната справка включва 377 заглавия, от които 7 на кирилица. Около 55% от цитираната литература е публикувана след 2000 г., като повечето литературни източници са от последните 5 години.

Литературният обзор е написан на 32 стандартни машинописни страници и е разделен на 6 подраздела. От синтезирания и целенасочен литературен преглед личи много добрата осведоменост и теоретични познания на докторантката за факторите, предизвикващи оксидативен стрес, проведените изследвания от други изследователи относно стресовия отговор и адаптивния потенциал на организмите, задействането на защитните механизми на организмите в отговор на засушаване и облъчване с UV-B, както и по отношение на класификацията, произхода, разпространението и използването на обикновения фасул, който е използван като биологичен моделен обект на проведените от нея проучвания.

Литературният обзор е сравнително добре структуриран и има надградане на анализа, подкрепен с необходимите литературни източници.

На базата на литературните данни докторантката издига хипотези и прави заключения относно най-верния път за постигане на точния резултат.

#### **5. Методика на изследването.**

Изследванията са проведени през периода 01.01.2014-15.03.2016 г. в Института по биоразнообразие и екосистемни изследвания - БАН, секция "Мутагенеза от околната среда". Разработката е финансирана от Министерство на образованието и науката, Фонд „Научни изследвания“, проект „Комплексна морфометрична, физиологична, биохимична и молекулярна оценка на сухоустойчивостта при български генотипове фасул (*P. vulgaris* L.)”.

Обект на изследването са три генетично близкородствени сорта фасул (*Phaseolus vulgaris* L.) - Добруджански 2, Добруджански 7 и Добруджански ран, селектирани в Добруджанския земеделски институт край гр. Генерал Тошево.

С цел изясняване на биохимичния и молекулярния отговор на генотиповете, както и адаптивният им потенциал, са използвани две експериментални схеми, които се различават по броя на използваните семена, начина на стерилизиране, приложените въздействия и фазите, в които се прилагат третиранията и извършването на предвидените анализи.

В своята работа докторантката е усвоила много методи за определяне съдържанието на малондиалдехид (МДА), общите пероксиди (Рох), пролина (Pro), редуциращите захари (RS), фотосинтетичните пигменти, топлинно стресовите белтъци (HSP70B), антиоксидантната система, ензимната активност на супероксид дисмутаза (СОД) и каталазната активност. Методите са описани много подробно и точно в дисертационната работа.

Получените данни са обработени с интересни статистически анализи, което дава основание на докторантката да прави точни сравнения между сравняваните величини и да прави верни изводи и заключения. Резултатите са анализирани с GraphPad Prism и са потвърдени с ANOVA, Analysis ToolPak и Булева алгебра.

Избраната методика на изследване е правилно подбрана и адекватна. Тя позволява да се постигане поставената цел и да се решат точно задачите, свързани с осъществяването на тази цел.

Използваните методи са описани коректно. Избраната методология съответства на поставените цел и задачи, което дава основание да се заключи, че получените резултати са достоверни и значими.

#### **6. Значимост и убедителност на получените резултати, интерпретациите и изводите.**

По мое мнение, представената от Цвета Ангелова дисертация за разглеждане притежава всички изисквания към такъв вид разработки:

- Проведена е целенасочена експериментална дейност, което е позволило на докторантката да отговори на поставената цел и да формулира ясни изводи;

- Получените резултати се коментират точно и ясно;

- Има логичност в цялостното изложение и дисертационната работата, която може да послужи като основа за изследванията на други автори, работещи в тази област.

На общо 48 страници в глава “Резултати и обсъждания” са представени получените резултати. Тук проличава компетентността на докторантката да анализира и обобщава резултатите в светлината на съвременните научни постижения.

Дисертацията на Цвета Ангелова е типично **фундаментално изследване**.

За **убедителност на резултатите** свидетелства факта, че чрез своите изследвания тя потвърждава някои от получените резултати в тази област от други изследователи, а също така обогатява съществуващите схващания с допълнителна информация.

Въз основа на проведените изследвания от докторантката е потвърдено, че лекият до умерен стрес, индуциран от 8% и 16% ПЕГ не предизвиква сериозни мембранни увреждания в изследваните генотипове. Установено е, че пролинът (Pro) и топлинно стресовите белтъци (HSP70B) са надеждни маркери за биохимичен/молекулен отговор към окислителен стрес дори при генетично близкородствени генотипове. Засушаването в лабораторни условия повишава нивата на общите пероксиди при проучваните генотипове фасул, но този биохимичен параметър не разграничава ясно техните отговори. Свръхпродукцията на пролин и HSP70B може да се използват като надежден маркер за оценка на адаптивния потенциал дори при генетично близкородствени генотипове.

Докторантката установява, че проучваните генотипове се различават по адаптивен потенциал и по защитни механизми, както и че лекият до умерен стрес от засушаване, може да увеличи адаптивния потенциал към друг стресов фактор (например UV-B облъчване).

Оригинален е изводът, който прави докторантката, че комбинирането на биологични и статистически методи (ANOVA, Analysis ToolPak и Булева алгебра) е добър подход, който може да се използва за анализ на адаптивен потенциал на генетично близкородствени генотипове.

Получена е нова информация за участието на топлинно стресовите белтъци (HSP70B) във възстановителните процеси, протичащи след отстраняване на стресовия фактор.

### **7. Характер на научните приноси.**

Приемам справката за научните приноси, представена от докторантката. Тя е изтъкнала съвсем скромно само 3 приноса:

1. Разработен е нов подход за оценка на стресовия отговор и адаптивния потенциал на клетките/организмите на базата на близкородствени в генетично отношение форми.

2. Пролин и HSP70B могат да бъдат препоръчани като надеждни маркери за идентифициране на генетично близкородствени генотипове в различни експериментални условия (веднага след стрес и след възстановителен период).

3. Комбинирането на експериментално получените данни, включващи комплекс от биохимични/молекулни маркери (пролин, HSP70B, СОД и каталазна активност) с математически методи може да бъде препоръчано за получаването на по-надеждна информация, свързана с адаптивния потенциал на генотиповете.

### **8. Оценка на качеството на публикуваните научни трудове във връзка с дисертационната разработка.**

Докторантката е представила списък с 3 научни публикации. От тях една е под печат, но е представен документ, че е приета за отпечатване.

❖ Едната е отпечатана в списанието Доклади на БАН (*Comptes rendus de l'Academie bulgare des Sciences*);

❖ Втората статия е приета за отпечатване в Сборника на III-та международна конференция „ХРАНИ“, НБУ, София, 23 - 25 Март, 2017 год.;

❖ Третата е отпечатана в Сборника със статии от Seminar of Ecology - 2017 with international participation, Proceedings, 27-28 April, Sofia, Bulgaria, 79-88. ISBN:979-853-476-132-4.

Не са посочени цитирания на тези публикации, но като се има предвид, че те са отпечатани през 2017 год. е твърде рано за това.

В 3-те публикации докторантката е водещ автор, тъй като е участвала активно в методичното и теоретичното им разработване. Няма самостоятелна статия.

Във връзка с изпълнението на образователната и научна програма на докторантурата си асистент Цвета Ангелова е събрала общо 398 кредита при изискуеми 250.

### **9. Лично участие на докторантката.**

Представеният дисертационен труд е лично дело на докторантката. Това се установява и от подписаната лична декларация за оригиналност на получените резултати.

Тя е усвоила редица съвременни биологични методи за установяване устойчивостта на различни генотипове фасул към окислителен стрес чрез използване на биохимични и молекулни маркери.

#### **10. Автореферат.**

Авторефератът е добре оформен в обем от 29 страници. Той е структуриран много добре и отразява в резюмиран вариант структурата и съдържанието на дисертацията. Онагледен е с 12 таблици и 28 фигури. Считаю, че можеше да бъде илюстриран с повече таблици и фигури.

Авторефератът е ясно написан и добре отразява получените резултати на дисертационния труд. Изготвен е съобразно изискванията на ИБЕИ.

#### **11. Критични бележки, въпроси и препоръки.**

Към докторантката имам следните въпроси и препоръки:

##### Въпроси и бележки:

⊗ Известно е, че ултравиолетовият спектър на слънчевата светлина може да бъде разделен на три части, в зависимост от дължината на вълната - UV-A, UV-B и UV-C, можете ли да квалифицирате по какво се различават и има ли различия в нарушенията в ДНК молекулите, индуцирани от различните части?

⊗ Защо проучванията са проведени само при облъчване с UV-B?

⊗ Получените от Вас резултати могат ли да бъдат използвани за селекционни цели и включване на тези анализи в ранните селекционни етапи за диагностика и откриване на генотипове с повишена устойчивост на оксидативен стрес?

⊗ Защо изследванията по първата експериментална схема се провеждат на 50 броя семена, а по втората – на 150 броя?

⊗ Има допуснати някои терминологични неточности. Например използван е терминът “покълнеци”, който не е правилен от агрономическа гледна точка. По-правилно е да се каже “поници”. Съществуват и други такива в работата.

##### Препоръка:

⊗ Би било добре ефектът от прилаганите въздействия да се отчита не само на първи добре развит същински лист, но и до 3-4 лист. Още по-добре би било да се види какъв е ефектът и на цели растения. Разбира се това довежда до включването на много голям обем от варианти за проучване. Това може да бъде цел на бъдещи изследвания на докторантката.

⊗ Тъй като при фасула съществува голямо разнообразие от различни видове и сортове, различаващи се по окраска на цветовете, размера и формата на плодовете (бобовете) и семената, в бъдеще докторантката би могла да включи в своите изследвания по-богат набор от различни форми. Тогава при проучване на по-голям брой не близкородствени генотипове и при използване на същите методи, ще може да прецени още по-добре дали ще се получат подобни резултати.

Посочените бележки и препоръки не намаляват важността и значението на представения дисертационен труд. Те са направени с цел подобряване работата на докторанта при бъдещите му изследвания.

### **ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

Определено считам, че представеният за рецензиране дисертационен труд съдържа научни, научно-приложни и приложни резултати, които представляват оригинален принос в науката и отговарят на изискванията на Закона за развитие на академичния състав в Република България (ЗРАСРБ), Правилника за неговото прилагане и съответния Правилник на БАН.

Дисертационният труд показва, че докторантката Цвета Ангелова притежава професионални умения по научната специалност „Генетика“ като демонстрира качества и умения за самостоятелно провеждане на научни изследвания.

Поради гореизложеното, убедено давам своята **ПОЛОЖИТЕЛНА ОЦЕНКА** за проведеното изследване, представено в рецензираните по-горе дисертационен труд, автореферат, постигнати резултати и приноси, и предлагам на почитаемото научно жури също да гласува положително и да присъди образователната и научна степен „**доктор**“ на **Цвета Владимирова Ангелова** в област на висше образование: **4**. Природни науки, математика и информатика; Професионално направление: **4.3**. Биологични науки; научна специалност - „**Генетика**“.

30.07.2018 г.  
Гр. Пловдив

**Изготвил рецензията:**

(проф. д.с.н. Д. Светлева)