АГРОБИОИНСТИТУТ - Костинброд
София, бул. "Драган Цанков" 8
тел.: 963 54 07/факс: 963 54 08
Вх. №...83...../21.05.2015г.

СТАНОВИЩЕ

от проф. д-р Магдалена Чорбаджиева, Биологически факултет, СУ "Св. Кл. Охридски"

ОТНОСНО: Дисертационен труд за присъждане на образователната и научна степен „доктор" по научна специалност „Генетика" (01.06.06) на тема „Анализ на стресови белтъци, експресирани при изсушаване и възстановяване на *Haberlea rhodopensis*"

Докторант: Петко Василев Младенов, АгроБиоИнститут, София

Научни ръководители: проф. д-р Димитър Джилянов

проф. д-р Магдалена Чорбаджиева

Петко Младенов завършва специалност Биология в Биологически факултет на СУ "Св. Кл. Охридски" през 2006 г. и след започване на обучение в магистратура по Генно и клетъчно инженерство работи по дипломната си работа, озаглавена "Анализ на стресови белтъци, изолирани от устойчиви на засушаване растения (*Haberlea rhodopensis*)". През 2008 г. Петко Младенов завършва с отличие магистърска степен на обучение и след успешен конкурс е зачислен от 02.02.2009 г. като редовен докторант по Генетика към АгроБиоИнститут - София. Отчислен е с право на защита от 01.02.2013 г. Дисертационният труд на тема „Анализ на стресови белтъци, експресирани при изсушаване и възстановяване на *Haberlea rhodopensis*" е апробиран пред разширен Научен съвет на 27.01.2015 г.

Като ръководител на докторанта, имах възможност да наблюдавам отблизо развитието на Петко Младенов като изследовател чрез умелото съчетаване на теоретични познания и прилагане на нови методични подходи за решаване на поставените му задачи. Темата за уникалната възможност на възкръсващите растения да оцеляват в есктремни условия на засушаване, както и тяхното изключително бързо възстановяване след стрес вълнува изследователите отдавна и въпреки многобройните изследвания с практическа и фундаментална насоченост, молекулярните механизми на тази висока устойчивост на засушаване все още не са напълно изяснени. *Haberlea rhodopensis* е балкански ендемит, таксономично влизащ в семейство Gesneriaceae и представлява, заедно с род Ramonda, единствените 'възкръсващи растения' в Европа. В тази връзка това растение предлага уникална възможност за изучаване на механизмите на десикативна толерантност. В предходни научни разработки на групата по Абиотичен стрес към АгроБиоИнститут – София, са оптимизирани условия за *ин витро* размножаване на *H. rhodopensis,* който е застрашен от изчезване вид. Това същевременно създава възможност за отглеждане на растенията в лабораторни условия и за прецизен контрол на етапите на засушаване и възстановяване. В тази връзка в настоящия дисертационен труд за пръв път е използван бърз и надежден недеструктивен метод за определяне на водния статус на *H. rhodopensis* по време на засушаване и възстановяване. Методът се базира на промени в бързата

флуоресценция в интактни растения, създавайки възможност да се изберат различни етапи на стрес за проследяване на промени в белтъчния и метаболитен профил на третираните растения, състоящи се от: контролни растения C, две междинни състояния на засушаване D1 и D2, напълно засушени растения D3 и две състояния на възстановяване – R1 и R2. Същевременно този метод позволява да се проследят промените в линейния и цикличен електронен транспорт, характеризиращи промените във фотосинтезата по време на третиране. Интересно е да се отбележи, че докато ефективността на линейния електронен поток намалява почти идентично на водното съдържание, намалението на ефективността на цикличния електронен поток настъпва на по-късен етап на засушаване – между D2 и D3, което показва неговата по-висока устойчивост при *H. rhodopensis*. При засушаване се наблюдава и почти пълна дисоциация на фотосинтетичните комплекси, като при рехидратация настъпва възстановяването им. Тази реорганизация се съпровожда и от промени в белтъчния профил на тилакодните белтъци, както и в статуса на тяхното фосфорилиране. Като цяло, тези промени вероятно имат фотопротективна роля, доставяйки достатъчно АТФ за гориво на специфични процеси, свързани с оцеляване на растението при екстремни условия на засушаване. Във връзка с известната защитна роля на шаперонови белтъци за устойчивост на засушаване е проследена експресията на дехидрини. Използваната за разделяне едномерна гел-електрофореза и последващ имуноблот не показват съществена промяна на тези белтъци във всички изследвани етапи. При последващото им разделяне на двумерна гел-електрофореза и имуноблот се установяват белтъци с еднаква молекулна маса - 20 kDa, но различаващи се по изоелектричната си точка, което е показател за посттранслационни модификации. Наблюдавани са малки промени в изоелектричните точки на белтъците от напълно засушените растения в сравнение с контролните такива. Последващият LC-MS/MS за идентифициране на детектираните с анти-дехидрин антитяло белтъци от контролните и напълно засушените растения изненадващо показва, че това са тауматин-подобни белтъци, които на пръв поглед нямат структурна хомология с дехидрините. Общото между двата класа белтъци е наличието на известно сходство между деструктурирани домени, характерни за дехидрините и тауматините, което до известна степен обяснява имунологичната крос-реакция. Бъдещо клониране и експресионен анализ на тауматин-подобните белтъци, установени при *H. rhodopensis*, биха дали отговор за структурата им и тяхната конкретна роля за забележителната устойчивост на засушаване, характерна за това растение. Заслужава да се отбележи и откриването на нова, високо активна изоформа на алдехиддехидрогеназа, характерна само за напълно засушените растения, най-вероятно с детоксикираща роля в отговор на повишеното количество алдехидни радикали, генерирани от оксидативен стрес. От проведеното с ЯМР метаболитно профилиране и анализ на мастните киселини с GC/MS може да се заключи, че по време на засушаване в *H. rhodopensis* се натрупва захароза като осмопротектант. Голямото количество валин в сравнение с останалите определени аминокиселини, неговото намаление наполовина по време на стрес и възстановяванто му след рехидратация водят до заключението, че *H. rhodopensis* би могло да използва

разклонени аминокиселини като алтернативен източник на въглерод при стрес. Изразеното натрупване на глицерофосфохолин вследствие на установеното намаление на мастни киселини по време на засушаване предполага ролята му на мощен осмопротектант, който, заедно със захарозата, гарантира оцеляване на растението при екстремно засушаване. Метаболитните промени на проследените 36 метаболита в резултат на различните третирания са представени по много подходящ начин в контекста на избрани метаболитни пътища. Следва също така да се подчертае, че изолирането на белтъци от възкръсващи растения, подходящи за последващи анализи, е затруднено от наличието на голямото количество фенолни съединения и танини, присъстващи в листата им. В тази връзка, в настоящия дисертационен труд е представен оптимизиран метод за изолиране на тотални белтъци, както и на такива от хлоропласти. Известно е, че молекулярните механизми на регулация на десикативен стрес са свързани с транскрипционни фактори, които са продукти на нискокопийни гени и следва да се отбележи, че с прилагане на различни подходи като ProteoMiner и Aurius са изолирани белтъчни проби, обогатени с минорни белтъци. Също така са картирани различни части от листния протеом на *H. rhodopensis*, което е предпоставка за последващ MS анализ за тяхната идентификация.

По темата на дисертацията са публикувани 4 научни труда в списания с IF: *Physiologia Plantarum* (IF – 3.262); *Biotechnology & Biotechnological Equipment* (IF – 0.379); *Comptes rendus de l'Academie bulgare des Sciences* (IF - 0.198) *Bulgarian Journal of Agricultural Sciences* (IF - 0.136). Резултатите са представени на три международни и национални конференции.

Заключение: Резултатите от представения дисертационен труд са солидна основа за бъдещи изследвания с фундаментален и приложен характер. Клонирането и експресията на новооткритите тауматин-подобни белтъци и на алдехиддехидрогеназата ще хвърлят светлина върху тяхната структура и функция във връзка с невероятно високата устойчивост на *Haberlea rhodopensis* към екстремни условия на засушаване. Като научен ръководител на Петко Младенов съм впечатлена от неговия стремеж към усвояване и прилагане на нови, модерни техники за решаване на поставените задачи и от неговото сериозно отношение към работата. Смятам, че той се справи отлично с всички планирани задачи и разви критичен подход при представяне и обсъждане на резултатите от научните си изследвания. Петко Младенов се изгради като самостоятелен изследовател със значителен научно-изследователски опит в растителната молекулярна биология, овладял широк набор от съвременни молекулярно-биологични техники.

Въз основа на гореизложеното си позволявам да пледирам пред Уважаемите Членове на Научното жури да гласуват присъждането на образователната и научна степен „Доктор" на Петко Василев Младенов.

19.05.2015 г. Подпис:

(Проф. д-р Магдалена Чорбаджиева)