

РЕЦЕНЗИЯ

върху дисертационен труд за получаване на образователната и научна степен „доктор“ по: област на висше образование 6. „Аграрни науки и ветеринарна медицина“, професионално направление 6.2 Растителна защита, научна специалност „Растителна защита (фитопатология)“.

Автор на дисертационния труд: задочен докторант Рошан Саид Шаалан към катедра „Растителна защита“ при Лесотехническият университет, гр. София

Тема на дисертационния труд: „Въздействие на ентомопатогенните ендозити *Beauveria bassiana* и *Metarhizium anisopliae* върху взаимоотношенията между *Cucumis sativus* L. памуковата листна въшка (*Aphis gossypii* Glover) и вируса на краставичната мозайка – *Cucumber mosaic virus* (CMV)

Член на научното жури: Проф. д-р Румен Игнатов Томов, Лесотехнически университет, професионално направление 6.2. „Растителна защита“, научна специалност „Растителна защита“, определен за член на научното жури със заповед № ЗПС-642/5.12.2022 год. на Ректора на Лесотехническият университет.

1. Кратко представяне на кандидата.

Докторант Рошан Шаалан завършва Ливански факултет, факултет по агрономство, Бейрут, Ливан през 2018 г., където придобива ОКС „Магистър“ Агроном-инженер по растителна защита

Трудовият си стаж започва през 2015 г след получаването на диплома По биохимия. След получаването на диплома за Агроном инженер през 2016 г. през периода юни-септември 2016 г. работи като агроном в Хасбая Агрикултурал Фармаси, Хасбая, Ливан, след което през периода 2016 – 2020 е преподавател в областта на растениевъдните науки в Син Ел Фиел Официал Скул, Бейрут, Ливан. Работила е като агроном-инженер в Американска Агрисиидс Компани, Бейрут, Ливан през 2018 г.

От 2019 г. със заповед на Ректора на ЛТУ №ЗСД-38/04.02.2020 г. е зачислена в задочна докторантура към катедра „Растителна защита“ в професионално направление 6.2. „Растителна защита“, научна специалност „Растителна защита (фитопатология)“. Докторант Рошан Шаалан е изпълнила индивидуалния си учебен план, в резултат на което със заповед на Ректора на ЛТУ ЗСД-500/07.11.2022 г. е отчислена с право на защита.

2. Актуалност на проблема.

Краставицата е една от най-важните оранжерийни култури, която се напада от много неприятели, един от които е памуковата листна въшка *Aphis gossypii*, чиято основна вреда е предаването на растителни вируси сред които е и вирусът на краставичната мозайка. Вирусът на краставичната мозайка има широк спектър от

гостоприемници и както останалите растителни вируси, не може да бъде унищожен от химически пестициди. Това налага разработването на нови подходи за контрол на растителните вируси.

През последните години се засилва интересът към разработването и прилагането на продукти за растителна защита на базата на микроорганизми. Ентомопатогенните гъби могат да заразяват нехранещи се стадии като яйца и какавиди и имат голям потенциал да бъдат използвани като нискорискови продукти за растителна защита. В същото време теса са чувствителни към факторите на околната среда – ултравиолетова светлина, температура и влажност, което ограничава тяхното широко приложение. Това е причината изследванията върху ентомопатогенните гъби да се насочат към възможностите за тяхното приложение като ендوفити, с което да бъдат преодолени неблагоприятните условия на външната среда, и което би улеснило тяхното по-широко приложение в практиката.

През последните години с бързи темпове се развива растителната метаболомика – технология за подобряване на културите. Метаболомиката използва технологичния напредък в аналитичната химия за точно профилиране на метаболитите в микроорганизми, растения и животни. През последните години метаболомичните изследвания са насочени към проучване на метаболитите, произведени от гъби ендوفити в различни растения гостоприемници. В допълнение на това метаболомиката, се използва за изследване на взаимодействията между растенията и ендوفитите; взаимодействията между ентомопатогенни гъби и насекомите и ефекта на ендوفитните гъби върху взаимодействието растения-вредители. В резултат на това е установено, че ентомопатогенните гъби могат да бъдат успешно използвани като ендوفити за контрол на много насекокоми неприятели.

Дисертационният труд е насочен към проучването на способността на ентомопатогенните гъби *B. bassiana* и *M. anisopliae* да колонизират като ендوفити семена от краставици чрез изкуствено инокулиране и определянето на тяхното въздействие върху растежа и индуцирането на защитен механизъм срещу вируса на краставичната мозайка в краставичните растения.

Настоящото изследване допринася за разбирането на взаимодействията ендوفит-растение-вредител, механизмите и процеса на колонизация на растенията, както и ендوفитните ефекти на *B. bassiana* и *M. anisopliae* върху *A. gossypii* и инфекцията с вируса на краставичната мозайка.

Всичко това подчертава актуалността на настоящата разработка, което е отлично представено в главите увод и литературен обзор.

3. Степен на познаване състоянието на проблема и творческа интерпретация на литературния обзор.

Списъкът с използвана литература за разработката на дисертацията съдържа 416 литературни източника, от които основната част са от последните 20 години. Това показва, че разработката стъпва върху почти цялата основна съвременна научна литература, свързана в темата на дисертацията.

Направен е изключително подробен преглед на литературните източници свързани с двата проучвани вида гъби, като е направена съпоставка на тяхната проява като ентомопатогени и ендوفити. Представени са механизмите за индуциране на устойчивост – патогени микроорганизми, фитофаги, полезни

микробиологични агенти.

Изключително добре са интерпретирани изследванията върху пет вида организми - две гъби, едно растение, едно насекомо и един вирус, които са обединени в настоящата изключително интердисциплинарна разработка посветена на сложните взаимоотношения между тях.

Отличното познаване на научните изследвания свързани с *B. bassiana* и *M. anisopliae* като ендوفити по различни култури, позволява на Рошан Шаалан да направи заключенията, че въпреки факта, че ентомопатогенните гъби *B. bassiana* и *M. anisopliae* са едни от най-изследваните микробиологични агенти, все още механизмите, с които те оказват негативно въздействие върху неприятелите и патогените по растенията, все още не са изяснени и има малък брой проучвания.

Направеният литературен обзор представя докторант Рошан Шаалан като отлично запозната с проучванията по проблема и свободно боравеща с научна информация. С направения литературен обзор тя умело и задълбочено представя извършените изследвания по основните теми, засегнати в дисертацията. Задълбоченият литературен анализ успешно откроява все още нерешените проблеми свързани с сложните взаимоотношения между комплекса растение, неприятел, патоген, микробиологичен агент. В допълнение на това литературният обзор е илюстриран с 9 фигури.

Всичко това допринася за превръщането на дисертацията в ценен справочен източник за значението на микроорганизмите като продукти за растителна защита, както и за индуцирането на устойчивост в растенията спрямо вредители по земеделските култури.

4. Цел, задачи, хипотези и методи на изследване. Съответствие на избраната методика на изследване с поставената цел и задачи на дисертационния труд.

Основната цел на дисертацията е да се проучат ентомопатогенните ендوفити *B. bassiana* и *M. anisopliae* като потенциална алтернатива на синтетичните химически инсектициди срещу *Aphis gossypii* и тяхната възможна употреба за елиминиране на този неприятел и причиняването от него пренасяне на вируса на краставичната мозайка, както и да се изследва метаболомиката на растения, заразени с вируса и ефектите от приложените ендوفити върху индуцираната защитна реакция срещу него.

Задачите на дисертацията са 8 и напълно отговарят на поставената цел. Те са ясно формулирани и по оптимален начин структурират това изключително интердисциплинарно изследване, включващо:

1. Изкуствено инокулиране на семена от краставици с ентомопатогенни гъби *B. bassiana* и *M. anisopliae*.
2. Проучване на ендофитната способност на двата вида ентомопатогенни гъби чрез метода на реизолация и сканиращ електронен микроскоп.
3. Проучете ефекта на инокулираните ентомопатогенни ендوفити върху физиологичните и биохимичните параметри на краставичните растения.
4. Проучете ефекта на ентомопатогенните ендوفити върху размера на популацията на *A. gossypii*, по краставичните растения.
5. Механична инокулация на неустойчиви краставични растения, ендофитно колонизирани с ентомопатогенни гъби с вирус на краставичната мозайка.

6. Оценка на вирусна инфекция чрез (DAS-ELISA) и PCR тест.

7. Приготвяне на проби от лиофилизирани листа от краставица след екстракция с метанол.

8. Широкомащабно метаболомно профилиране на растителни проби с помощта на високоефективно химично изотопно маркиране LC-MS.

Използваните методи напълно съответстват на поставените цели и задачи на дисертационния труд. Изпълнението на всички задачи е подробно описано. Посочени са използваните методи за молекулярна идентификация на *B. bassiana* и *M. anisopliae*, стерилизацията на краставични семена, подготовката на гъбен инокулум и инокулацията на семена, както и оценката на инокулацията.

Подробно са описани заложените три групи експерименти (1) Експеримент за оценка на растежа, изследващ подходите за определяне на ефекта на ентомопатогенните гъби върху покълването на семената, върху растежа на разсада, както и ефекта на ендифитните ентомопатогенни гъби върху физиологичните и биохимичните параметри на краставичните растения; (2) Експеримент с *A. gossypii*, изследващ ефекта на ендифитните ентомопатогенни гъби върху размера на популацията на *A. gossypii* при краставични растения и (3) Експеримент с вируса на краставичната мозайка, включващ инфектиране с вируса на краставичната мозайка и вземане на проби от растенията, изследване ефекта на ендифитните ентомопатогенни гъби и вируса върху метаболитите, произведени от заразени с вируса краставични растения. Статистическата обработка на резултатите е описана подробно и е подкрепена с 13 приложения. Използваните методи са илюстрирани с 10 фигури, което подчертава личното участие на докторанта в проведените експерименти.

Използваните морфологични, молекулярни и статистически методи показват че работата по дисертацията е изпълнена на съвременно и изключително високо технологично ниво.

5. Онагледеност и представяне на получените резултати.

В рамките на три години е извършено изключително мащабно обследване, върху взаимоотношенията гостоприемно растение, гъби и вируси, което е представено в добре структуриран вид. Извършена е молекулярна идентификация на ентомопатогенните гъби и листните въшки с оглед потвърждаването на таксономичното положение на проучваните видове.

Колонизацията на краставичните растения от *B. bassiana* и *M. anisopliae* е документирана чрез сканиращ електронен микроскоп. По отличен и прегледен начин са представени резултатите от проведените експеримент за оценка на растежа, експеримент с *A. gossypii* и експеримент с вируса на краставичната мозайка.

Част от резултатите са представени в 7 бр. таблици, което допринася за тяхната прегледност и улеснява използване на дисертацията от читателите. Текстът е отлично илюстриран с бр. 24 оригинални фигури, от които 5 фотоси и 19 диаграми. В допълнение на това са представени 13 приложения, представящи статистическата обработка на получените резултати.

6. Обсъждане на резултатите и използвана литература.

Всички планирани задачи са изпълнени, в резултат на което са получени значими научни резултати в няколко аспекта.

Използваните микроорганизми и листни въшки са идентифицирани чрез молекулярна диагностика, което е от изключително значение за прецизността на експериментите. Значими на теорията и практиката са резултатите относно изкуственото инокулиране на семена от краставици, което е наблюдавано чрез сканиращ електронен микроскоп. Процесът е добре документиран и е доказано, че приложените ентомопатогенни гъби са ендифитни.

В рамките на експеримента за оценка на растежа е доказано, че ентомопатогенните гъби не само имат ендифитен капацитет, но също така могат да действат като стимулатори на растежа на краставичните растения. Резултатите от теста за покълване показват, че инокулирането на семена с ентомопатогенни гъби и инкубирането им при 25 °C в продължение на 2 дни подобрява значително степента на покълване в сравнение с неинокулираните семена.

В дисертацията са представени доказателства, че ендифитните ентомопатогенни гъби оказват влияние върху физиологичните и биохимичните параметри на краставичните растения. Резултатите показват, че има значителна разлика в броя на цветовете, листата и височината на растенията, колонизирани с тествани ендифитни гъби, в сравнение с неколонизираните контролни растения. Освен това краставичните растения реагират на ендифитна колонизация чрез повишена индукция на разтворими феноли, което потвърждава, че ендифитите могат индиректно да повлияят на защитната реакция в гостоприемното растение.

В рамките на експеримента с *A. gossypii* е доказано, че ендифитното приложение на ентомопатогенни гъби върху семена от краставици може да повиши устойчивостта на растенията срещу *A. gossypii*. Установено е, че броят на листните въшки, в третирани с гъби растения, е значително по-малък от този в контролните растения. Проведеният експеримент с вируса на краставичната мозайка допринася за изясняване на механизмите за защитата от вируса при третирани с ендифитните *B. bassiana* и *M. anisopliae* вирусно болни краставични растения. Сравненията между нетретирани и третирани растения инокулирани с вируса на краставичната мозайка растения, направени чрез метаболомичен анализ, показват значителни разлики в експресията на метаболитите. Установените в рамките на проучването променливи концентрации доказват, че ендифитите могат да повлияят на производството на специфични метаболити.

Получените резултати са анализирани и интерпретирани в рамките на 7 страници, като е направено критично сравнение на получените резултати с предишни изследвания от други автори. Умело подбраните литературни източници и представената дискусия на получените резултати показват задълбочените познания на докторантката по проблемите, дискутирани в дисертацията и нейната отлична способност да борави с научна информация. Това позволява на Рошан Шаалан да открие оригиналността на резултатите си относно (1) взаимоотношенията между *B. bassiana* и *M. anisopliae* и растения от краставици и (2) откритието, че ентомопатогенните ендифити могат да бъдат използвани за контрол на вируса на краставичната мозайка чрез засилване на защитните метаболити на краставицата срещу вирусната инфекция.

Резултатите от проведените проучвания и наблюдения, са обобщени в 7 броя

добре формулирани изводи.

7. Приноси на дисертационния труд.

Дисертационният труд съдържа изключително голямо количество информация и значими оригинални научни и научно-приложни приноси.

Научни приноси: По-значимите научни приноси на разработката на докторант Рошан Шаалан са следните:

1. Доказано е, че ентомопатогенните гъби *B. bassiana* и *M. anisopliae* действат като ендوفити в краставични растения и също така могат да действат като стимулатори на растежа на растенията.

2. Доказано е, че ендофитното присъствие на ентомопатогенни гъби в растителните тъкани на краставицата може да повиши устойчивостта на растенията срещу *A. gossypii*.

3. Чрез метаболомичен анализ е показано, че ендофитите *B. bassiana* и *M. anisopliae* подобряват защитните метаболити на краставицата срещу инфекцията от вируса на краставичната мозайка и могат да се използват при лечението на вирусни заболявания.

4. Наблюдаваните промени в метаболитните изяви на болните растения от краставици, дължащи се на лечение с ендофитни гъби, биха могли да дадат бъдеща насока за използване на тези ендوفити за получаване на по-задълбочена представа за защитния отговор към вируса на краставичната мозайка.

Научно-приложни приноси:

1. Получените резултати могат да допринесат за разработването на нови продукти за растителна защита на основата на ентомопатогенни гъби за контрол на вирусни заболявания по растенията.

2. Дистационният труд съдържа изключително подробен и добре структуриран литературен обзор по сравнително нова тематика, което го прави ценно помагало, което може да бъде използвано от преподаватели и студенти.

8. Оценка за степента на личното участие на дисертанта в приносите.

Безспорно е, че проведените експерименти и наблюдения, както и анализът на получените резултати са лично дело на докторант Рошан Шаалан под ръководството на научния ръководител и двамата научни консултанти. Водещата роля на докторанта се подчертава от факта, че тя е първи автор на трите подготвени научни публикации, както и от представения разделителен протокол, в който е посочено, че приносът на Рошан Шаалан е 70%.

9. Критични бележки и въпроси.

Нямам критични бележки

Въпроси:

1. Имате ли информация до каква степен в микробиологичните продукти за растителна защита с активно вещество *B. bassiana* или *M. anisopliae* се проявява техният ендофитен характер?

2. Има ли налични на пазара микробиологични продукти, които бихте

препоръчали за контрол на вируса на краставичната мозайка?

10. Публикувани статии и цитирания.

Част от получените резултати са публикувани в една публикация в реферирано научно списание *Journal of Plant Protection Research* и в една публикация в сборник от научна конференция. Една публикация е приета за печат в списание *Horticulturae*, Рошан Шаалан е първи автор на трите публикации. Научните трудове на докторанта са отразени в научната литература с 7бр. цитирания.

11. Преценка на публикациите по дисертационния труд: брой, характер на изданията, в които са отпечатани. Отраженията в науката - използване и цитиране от други автори.

Научните публикации касаят основните получени резултати относно взаимоотношенията на ендофитите *B. bassiana* и *M. anisopliae* с *A. gossypii* и вируса на краставичната мозайка.

Проучванията на индуцирания ефект на стимулиране на растежа и повишаването на устойчивостта на краставичните растения срещу *A. gossypii* чрез колонизация от ендофитните *B. bassiana* и *M. anisopliae* са публикувани в списание *Journal of Plant Protection Research*, индексирани в SCOPUS SJR 0,32 Q3. Публикацията относно въздействието на *B. bassiana* и *M. anisopliae* върху метаболитните взаимодействия между краставицата (*Cucumis sativus* L.) и вируса на краставичната мозайка е приета за публикуване в списание *Horticulturae*, индексирани в Web of Science IF 2,923 Q1.

Реализирано е и участие в научна конференция AGROSYM 2018 с доклад, който е публикуван в сборника от конференцията. Научните трудове на Рошан Шаалан значително надхвърлят минималните наукометрични изисквания от 30 точки. Представеният автореферат отразява обективно структурата и съдържанието на дисертационния труд.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ:

Въз основа на научените и приложените, от докторантката, различни методи на изследване, правилно изведените експерименти, направените обобщения и изводи считам, че представеният дисертационен труд отговаря на изискванията на ЗРАСРБ и Правилника на Лесотехническият университет за неговото приложение, което ми дава основание да го оценя ПОЛОЖИТЕЛНО .

Позволявам си да предложа на почитаемото Научно жури също да гласува положително и да присъди на Рошан Саид Шаалан образователната и научна степен „доктор“ по научната специалност „Растителна защита (фитопатология)“

Дата: 12.12.2022
гр. София

РЕЦЕНЗЕНТ:

(проф. д-р Румен Томов)