

РЕЦЕНЗИЯ

върху дисертационен труд за получаване на образователна и научна степен "доктор" по: област на висше образование 6: "Аграрни науки и ветеринарна медицина", в Професионално направление 6.2. "Растителна защита", Научна специалност: "Растителна защита" (Фитопатология).

Автор на дисертационния труд: инж. Рошан Саид Шаалан задочен докторант към катедра "Растителна защита", на Агрономически факултет на Лесотехнически Университет, гр. София.

Тема на дисертационния труд: "Въздействие на ендемопатогенните ендوفити *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. дсн Иванка Любенова Каменова, професионално направление 6.2. Растителна защита, научна специалност Растителна защита (Вирусология), определена за член на научното жури със заповед ЗПС № 642/ 5.12.2022 г. от Ректора на Лесотехнически университет, гр. София.

1. Кратко представяне на кандидата.

Рошан Саид Шаалан е родена на 23. 06.1994 г. в Ливан. В периода 2012-2015 г. учи във Факултета по природни науки в Ливанския университет в Бейрут, специалност Биохимия, а в периода 2015-2016 получава диплома за професионална квалификация "Селскостопански инженер" от факултета по агрономство на същия университет. През 2016-2018 г. получава квалификация Магистър по селскостопанско инженерство в професионално направление Растителна защита. От 2019 г. е задочен докторант към катедра "Растителна защита" на Лесотехнически Университет, гр. София. Последователно е работила като: лаборант – анализатор на замърсители във вода, почви и храни в Американския Университет в Бейрут; агроном в селскостопанска аптека в Хасбая; инженер по земеделие в Ливански институт за земеделски изследвания, и в Американската компания Agriseeds, Бейрут, Ливан. В настоящето е преподавател по растителни науки в училище Син Ел Фиел, Бейрут, Ливан. Притежава отлични компютърни умения и владее Word, Excel, Power Point. Владее свободно и професионално английски език.

Рошан Саид Шаалан е положила и издържала успешно изпитите от докторантския си минимум съгласно индивидуалния учебен план.

2. Актуалност на проблема.

Краставицата е една от най-важните, интензивно отглеждани зеленчукови култури податлива на много вредители и патогени, които причиняват огромни загуби на селскостопанска продукция. Контролът на болестите и вредителите по културните растения се основава главно на използването на пестициди, което обаче е с нежелани ефекти върху околната среда. Това налага да се търсят нови, алтернативни начини за превенция и контрол на заболяванията по растенията, поради което през последните години усилията на много изследователи са насочени към т.н. "биологичен контрол", който се основава на използването на естествени и екологични ресурси.

Дисертационният труд на докторанта Рошан Саалан включва изследвания на два специфични ентомопатогенни ендوفита в краставица, проследява тяхното влияние върху нейното развитие и въздействието им, както върху популационната численост на *Aphis gossypii*, така също и това на един от най-разпространените и вредоносни вирусни патогени по тази култура, а именно *Cucumber mosaic virus* (CMV).

В смисъла на казаното до тук оценявам високо актуалността на дисертационния труд, третиращ комплексно взаимоотношенията гостоприемник (краставица)-ентомопатогенни ендوفити - *Aphis gossypii*, като векторен преносител на вируса на краставичната мозайка, което дава възможност да се проследи, както скрития потенциал на ентомопатогенните ендوفити в използването им като биопестициди срещу най-разпространения вид листна въшка по тази култура, така също да се проследи техния евентуален защитен механизъм срещу растителните вируси преносими с листни въшки.

Също, докато информация за ендофитната активност на *Beauveria bassiana* срещу *A. gossypii* при различни културни растения и вирусни патогени е повече или по-малко налична в научната литература, то такава за *Metarhizium anisopliae* върху този вид листна въшка и CMV инфекция напълно липсва.

С особена актуалност са и включените в проучването метаболитни анализи поради факта, че все още не е известно как растителните ендوفити могат да предизвикат системна резистентност на растенията към вируси на метаболитно ниво.

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

Представеният литературен обзор е подробен и за по-добрата му разбираемост и прегледност същия е структуриран в подраздели отразяващи научната информация за всеки един от изучаваните компоненти, а именно приложението на ентомопатогените и тяхната роля в усвояването на хранителните вещества и антимикробна активност. Ясно са очертани предимствата на приложението на ендофитите пред тези на ентомопатогенните гъби. Подробно е отразено използването на *Beauveria bassiana* и *Metarhizium anisopliae*, като подход за биоконтрол с описание на жизнения им цикъл и тяхното действие като ендوفити. Специално внимание е отделено и на останалите компоненти в проучването, а именно на гостоприемниците на *A. gossypii* и на вируса на краставичната мозайка, причиняваните от тях симптоми и вреди по нападатите растения, жизнен цикъл на *A. gossypii*, геномната организация и епидемиологични характеристики на CMV. Така

представен литературният обзор отразява добрата осведоменост и теоретични познания на докторанта по разработваната тема.

Считам, че литературният обзор е целенасочен и изчерпателен и е базиран на 341 източника, от които 37.5% са от последните 10 години. Той съдържа добре изложена и логична аргументация за поставената цел и задачи поради което е сполучлив преход към следващите раздели.

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

Целта на дисертационния труд е формулирана ясно и точно - да се проучи възможната употреба на ентомопатогенните ендозити *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*, като потенциални алтернативи на синтетичните, химически инсектициди срещу *Aphis gossypii* по краставица за прякото намаляване на вредно действие на този вредител и косвеното му действие, като векторен преносител на вируса краставичната мозайка. Изпълнението на целта е свързано с 8 конкретни задачи, които са добре дефинирани и обхващат изцяло постигането на целта.

Раздел "Материал и Методи" е структуриран в подраздели описващи използваните материали и методи за всеки един от компонентите в проучването. Те са описани прецизно и включват използваните източници на *Beauveria bassiana* и *Metarhizium anisopliae*, начините на култивиране, стерилизиране на краставичните семена и тяхното инокулиране. За доказване на ендозитното присъствие в семената е използван сканиращ микроскоп, както и метода на повторна изолация. Детайлно са описани начините за определяне на ефекта на ендозитите върху покълването на семената и на растежа на получените семеначета, на физиологичните и биохимични параметри с анализ на съдържанието на фенолните компоненти, на хлорофил и каротеноиди. По отношение на експериментите включващи *Aphis gossypii* и точното му определяне са приложени, както класическия метод по морфологични показатели, така също и молекулярна PCR диагностика със специфични за вида праймери. Подробно е описан начина за определяне на ефекта на ендозитите върху популационната плътност на *Aphis gossypii*. За доказване на инфекцията с вируса на краставичната мозайка са приложени серологичен (ДАС ЕЛИЗА) и молекулен PCR тест. Методите и опитните постановки са подробно представени и показват не само сериозна теоретична подготвеност на докторанта, но също и практически, ентомологични и фитопатологични умения за работа.

В заключение считам, че използваните материали и методи са подходящи за изпълнението на поставените задачи и позволяват получаването на адекватни резултати.

5. Онагледеност и представяне на научните резултати.

Дисертационният труд е структуриран правилно, по общоприет модел и отговаря на изискванията за Образователна и научна степен (ОНС) "доктор". Общият обем на разработката е 160 стандартни, А4 формат страници, разпределен в 7 раздела, при следните съотношения между тях: Увод (3 1/2 стр. = 2.2%), Литературен обзор (33 стр. = 20.6%), Цел и задачи (1 стр. = 0.6%), Материал и методи (15 стр. = 9.4%), Резултати (33

стр. = 20.6%), Дискусия (8 стр. = 5.0%), Изводи (1 стр. = 0.6%), Приноси (1 стр. = 0.6%) и Литературна справка на 38 стр. = 23.7%, която съдържа 413 заглавия.

Илюстративният материал включва 7 таблици и 44 фигури, които отразяват и достоверно подкрепят данните от проучването.

6. Обсъждане на резултатите и използвана литература.

Раздел "Резултати и обсъждане" обхваща 25.6% от обема на представения труд, и в него са обобщени резултатите от проучването на трите основни компоненти, а именно на въздействието на ендофитите върху краставичните растения, на популационната плътност на *Aphis gossypii* и на инфекцията от вируса на краставичната мозайка. Резултатите по всеки един от тези компоненти са подредени в подраздели, които следват методичната постановка, определяните показатели и използваните методи. Всичко това допринася, както за много доброто оформление, така и за стегнатия, научен стил на дисертационния труд.

Молекулярното идентифициране на *Beauveria bassiana* и *Metharizum anisopliae* и на вида *Aphis gossypii*, което потвърждава тяхното фенотипно, съответно морфорологично определени принадлежности, е много добра база за последвалото провеждане на всички експерименти. Опитите с двата ентомопатогена са проведени, както в стерилна среда, така и в нестерилни субстрати. Действието на *Beuvaria bassiana* и *Metharizum anisopliae*, като ендофити е доказано, както чрез получените със сканиращ електронен микроскоп микрографии, показващи директното проникване на конидиите на ентомопатогените в епидермалните клетки на третираните краставични семена, така също и от опитите за тяхното ре-инокулиране от различни тъкани на получените семеначета. И при двата вида най-успешната честота на повторна изолация е констатирана от коренови тъкани. Едновременно с това е наблюдавано различие между *Beuvaria bassiana* и *Metharizum anisopliae*. Докато при вида *Metharizum anisopliae* ре-изолацията е осъществена от всички органи в това число от листа и стъбла, то при вида *Beuvaria bassiana* такава липсва.

Сериозна част от дисертационният труд е свързана с проучвания за ефекта на ендофитите *B. bassiana* и *M. anisopliae* върху кълняемостта на инокулираните с тях краставични семена, на растежа, развитието и физиологичните и биохимични параметри на третираните краставични растения. Получените резултати показват, че инокулираните с *B. bassiana* и *M. anisopliae* семена, не само не са с намалена кълняемост, но напротив в рамките на първите 2 дни тя е повишена с почти 26%, в сравнение с тази на неинокулираните контроли. Значително повишаване на кълняемостта при естествени, външни условия е наблюдавано при семена, третирани с *B. bassiana* (72,5%), докато при инокулираните с *M. anisopliae* семена, кълняемостта е по малка - 47,5%.

В допълнение, след 10 дневен инкубационен период корените на развитите семеначета растат по-бързо и са по-дълги в сравнение с тези на контролните растения. По-голям брой корени е констатиран при растенията колонизирани с *B. bassiana*, за разлика от растенията третирани с *M. anisopliae*, където броят на формираните корени е доста по-малък. Установен е положителен ефект от действието на двата ендофита и по отношение на

физиологичните параметри. При растенията колонизирани с *B. bassiana* той се изразява във формирането на два пъти повече цветове и листа, докато колонизираните с *M. anisopliae* растения са с почти 12 cm по-високи и с по-голям брой краставични плодове в сравнение с контролните растения. С проведените анализи докторантът доказва, че колонизацията на ентомопатогенни ендозити повишава съдържанието на фенол в експерименталните растения без това да оказва промяна в съдържанието на хлорофила и каротеноиди.

По отношение на експериментите с *Aphis gossypii* е доказан отрицателен ефект на ендозитите върху размера на популацията, който при растенията колонизирани с *M. anisopliae* е намален с 35%, а при тези колонизирани с *B. bassiana* с 32%.

Изследванията относно въздействието на проучваните ендозити върху инфекцията с вируса на краставичната мозайка съпроводени с метаболитни анализи са изключително интересни и перспективни, не само поради факта, че през последните години метаболомиката се утвърди като едно от основните научни открития прилагано за точно профилиране на метаболитите в микроби, растения и животни, но и поради все още оскъдната научна информация по отношение на ендозитното въздействие върху растителните вирусните патогени. Проведените сравнителни метаболомни анализи на нетретирани и третирани с ендозити и заразени с CMV растения разкриват различна експресия на общо 631 метаболита. Установеното повишено съдържание на основни фенолни съединения на (m-кумарова киселина, p-кумароил хининова киселина и цис-бета-D-глюкозил-2-хидроксиканелена киселина) и тяхното активиране в третирани с ендозити болни растения води до повишаване на устойчивостта на краставици към CMV инфекция показващо, че най-вероятно те са тясно свързани със защитния механизъм на растенията. Резултатите от проучването в дисертационния труд разкриват положителния ефект на ендозити върху индуцирания защитен механизъм срещу CMV в краставични растения. Допълнително, прецизните 12 цветни фигури и 1 таблица подкрепящи проведените метаболомни анализи повишават значително качеството на изследванията и стойността на дисертационния труд.

В заключение искам да отбележа, че получените резултати са сполучливо анализирани, обобщени и интерпретирани през призмата на резултати на автори работили по проблема. Компетентната дискусия представена в сравнителен аспект с наличните данни от литературата са с фундаментален интерес и са добра основа за по-нататъшна разработка в търсенето на нови подходи за биологичен контрол на неприятелите и болестите по растенията.

7. Приноси на дисертационния труд.

В резултат на проучването докторанта Рошан Сайд Саалан представя 4 оригинални приноса, които подкрепям и одобрявам. **Приноси 1, 2 и 3 са с научна стойност, а принос 4 е с научно-приложен характер.**

Проучените взаимоотношения между *B. bassiana*, *M. anisopliae* и краставица отразени в приноси 1, 2 и 3 разширяват значително научната информация и познания за способността на ентомопатогенните гъби да действат като ендوفити.

- Ендофитното приложение на ентомопатогенни гъби върху семена от краставица подобрява устойчивостта на растенията срещу, *A. gossypii*, който причинява директни вреди по засегнатите растения и индиректни действайки, като векторен преносител на икономически важен вирусен патоген, какъвто е *Cucumber mosaic virus*.

- Метаболомните изследвания на третирани с ендوفити краставични растения инфектирани с CMV показват засилване на защитните механизми на растенията срещу вируса и са основа за бъдещи проучвания за получаване на по-задълбочена представа по отношение на защитата срещу CMV.

Като цяло резултатите от дисертационния труд са обнадеждаващи и дават основание да се приеме, че ентомопатогенните гъби притежават потенциал да бъдат успешни агенти в биологичния контрол на болестите, причинени от фитопатогени и в този смисъл проучването е с **научно - приложен принос**.

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

Не познавам лично докторанта Рошан Сайд Саалан, но представеният списък с публикационна дейност (1^{ви} автор в три публикации) ми дава основание да смятам, че проведената експериментална работа са нейна лична заслуга. Най-вероятно анализът, обобщаването и написването на дисертационния труд са също лично дело на дисертанта извършено без съмнение с вещото и експертно ръководство на научния ръководител доц. д-р Славчо Славов, и научните консултанти Prof. Dr. Lioudmilla Ibrahim и Asst. Prof. Dr. Walid El kayal.

9. Критични въпроси и бележки.

Посочените от мен забележки в предварителното ми становище по абстракта на дисертационния труд са взети предвид от докторанта, за което благодаря.

Към представеният дисертационен труд имам слените забележки: и въпроси:

1. В раздел литературен обзор в частта за мениджмънта на вируса на краставичната мозайка-на стр. 34 е посочено че: “прилагането на химически инсектициди за контрол на векторите на вируси може да бъде ефективно”. Това е само частично вярно и е в сила само за перзистентно преносимите вируси, докато за неперзистентните вируси какъвто е CMV инсектицидният контрол е изцяло неефективен поради факта, че преноса на вируса се осъществява в рамките на няколко секунди и минути.
2. В раздел “Материал и Методи” в частта описваща експериментите с вируса на краставичната мозайка са включени 2 фигури (Фиг. 17 и 18) показващи резултатите от доказване на CMV, които би трябвало да са в раздел “Резултати”.

3. По отношение на проведения ЕЛИЗА тест би трябвало да се посочи в колко повторения са тествирани пробите, както и какъв е прага на екстинкционните стойности между здравите и болни растения.

и един въпрос:

1. Имате ли данни за икономическата вреда нанасяна от вируса на краставичната мозайка в Ливан?

10. Публикувани статии и цитирания

Продукцията, свързана с дисертационният труд включва 3 публикации, от които 2 са в престижни международни списания с импакт фактор (общ IF:3.3) и 1 в сборник с доклади от Международен научен симпозиум по земеделие.

Докторантът има участие с 1 постер и 2 презентации в 3 научни форума, от които 2 са проведени в Ливан и 1 в Босна и Херцеговина. За една от презентациите си получава и награда за най-добро представяне.

Представени са 6 цитирания.

Авторефератът към дисертационния труд е изготвен по съкратен модел на дисертацията в обем от 36 страници. Той съдържа основните раздели от извършената експериментална работа по дисертационния труд, отразява адекватно съдържанието, и е съобразен с изискванията.

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

В 3 от представените общо 5 публикации Рошан Сайд Саалан е първи автор. В разделителният протокол за авторско участие в 2 от тези публикации от максимално възможния брой точки 30, докторантката получава по 21 точки, равняващо се на 70%^{об} принос. В публикацията от конферентното участие от максимален брой точки 10 докторантката също е с 70%^{во} участие. Докторантката участва още в 2 разработки включени в глави от книги, съответно с 6 и 9 автори, в които от максимален брой точки 30 тя получава 8.33 точки.

Общият брой точки от публикационната дейност на Roshan Said Shaalan се равнява на 57.33.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Дисертационният труд на Рошан Сайд Саалан е добре обмислено, прецизно проведено и представено изследване, което напълно отговаря на съвременното развитие на научните изследвания в областта. Разработената тема е интересна, актуална и дисертационна.

Усвоените и приложените методи на изследване, методически правилно проведените експерименти, обобщенията и направените изводи, и обстоятелството, че дисертационния труд напълно отговаря на изискванията на Закона за развитието на научните кадри в Република България и Правилника на Лесотехническият университет за приложението му ми дават основание да го оценя **ПОЛОЖИТЕЛНО**. Теоретичните и практическите приноси на дисертационния труд са безспорни.

Въз основа на гореизложеното бих желала да препоръчам на уважаемите членове на Научното жури, сформирано със заповед на Ректора на Лесотехнически университет, гр. София да присъди образователната и научна степен "доктор" на докторанта Рошан Сайд Саалан по научна специалност "Растителна защита" (Фитопатология).

Дата: 10.12.2022 г.

гр. София

Рецензент:

(проф. д-р Иванка Каменова)