

РЕЦЕНЗИЯ

върху дисертационен труд за получаване на образователната и научна степен “доктор” по: област на висше образование: 4. Природни науки, математика и информатика; професионално направление 4.3. Биологически науки, научна специалност 01.06.03. Ботаника.

Автор на дисертационния труд: **Ива Василева Дойчева, редовен докторант в секция „Приложна Ботаника“, ИБЕИ-БАН.**

Тема на дисертационния труд: **“Биотехнологичен подход за размножаване на *Glaucium flavum* Crantz. (Papaveraceae)”**

Рецензент: проф. Венета Михова Капчина-Тотева, БФ на СУ „Св.Кл.Охридски“, професионално направление 4.3. Биологически науки, научна специалност Физиология на растенията – Растителни клетъчни и тъканни култури, определена за член на научното жури със заповед № 97/17.10.2017 г. от Директора на ИБЕИ.

Повишеният интерес на фармация, козметика и хранително-вкусова промишленост към използване на съставки от растителен произход, налага получаването на стандартизиран растителен материал с определени качествени и количествени характеристики, без да се нарушават естествените находища на ценни растителни видове поради нерегламентирано събиране. Темата на дисертацията на Ива Василева Дойчева е актуална в няколко аспекта: насочена е към разработване на ефективен протокол за *in vitro* размножаване на защитен вид от българската флора (*Glaucium flavum* Crantz.); адаптиране на получените чрез соматична ембриогенеза растения в *ex vitro* условия; създаване на колекции за *ex situ* съхранение, позволяващи реинтродуциране в естествените местообитания и възможност за създаване на стопански насаждения като източник на суровина за приготвянето на лекарства или използване на вида за озеленяване.

Професионално развитие.

Докторантката е завършила с отличен успех бакалавърска степен, специалност „Биология“ и магистърска програма „Структурна Ботаника“ в Биологическия факултет

на СУ „Св. Климент Охридски“. От 2013-2015г. е редовен докторант в ИБЕИ-БАН, а от 2016 г. асистент в Биотехнологичната лаборатория за лечебни растения в секция „Приложна ботаника“. В приложените документи по защитата докторантката е описала областите на професионален интерес и компетентност, преподавателска и експертна дейност; участие в научни проекти – 2 броя, ръководител на единия; специализация в Румъния; научни публикации – 7 броя; участие в международни и национални семинари, конференции и конгреси – 4. Приложена е и справка за получените кредити по време на докторантурата с общ брой точки 378 при задължителен минимум от 250.

Обща характеристика на дисертационния труд - обем и структура.

Дисертационният труд е с обем 141 страници, от които 22 таблици (3 в Материал и методи и 19 в Резултати и обсъждане); 36 фигури (3 в Материал и методи и 33 в Резултати и обсъждане); и стандартните: Увод; Цел и задачи; Литературен обзор; Материали и методи; Резултати и обсъждане; Изводи; Приноси и Литература. Дисертационният труд е с висококачествен илюстрационен материал на отделните фази от соматичната ембриогенеза, *in vitro* култивирането и адаптацията на растенията в зависимост от прилаганите фактори за стимулиране на покълване и размножаване; на основните метаболити в *in vivo* и *ex vitro* растения. Структурата на дисертационния труд на Ива Василева Дойчева е аналогична на утвърдения модел за докторска дисертация.

Целта и задачите на дисертационния труд са ясно формулирани и адекватни на основния проблем – размножаване *in vitro* на *Glaucium flavum* Crantz. За изпълнение на целта са поставени 9 задачи за решаване.

Литературна осведоменост и теоретична подготовка на кандидата.

Литературната справка включва 247 заглавия, от които 18 на кирилица. Около 55% от цитираната литература е публикувана след 2000 г., като повечето литературни източници са от последните 5 години. Литературният обзор обхваща 29 стандартни машинописни страници и е разделен на 9 подглави. От синтезирания и целенасочен литературен преглед личи много добрата осведоменост и теоретична подготовка на докторантката за общото разпространение, ботаническа характеристика, природозащитен статут, лечебно действие и фармакологично приложение на алкалоиди, активност на основния метаболит глауцин. Разгледани са биологичните особености и проблеми при култивиране *in vitro* (кълняемост на семената, калусообразуване, соматична ембриогенеза, органи култури, коренообразуване,

съхранение на *in vitro* култури и адаптация *ex vitro*, както и влияние на различни фактори (температура, светлина, хранителна среда) върху тях; фармакологично приложение, видове хемотипове и вторични метаболити (в различните находища и *ex vitro* адаптирани растения). Използваната литература е цитирана правилно както в дисертацията, така и в приложения списък.

Методичен подход

В този раздел на дисертационния труд са описани обекта на изследване, времето и фазата на развитие на растенията, от които е събиран растителен материал в три последователни години от 10 естествени находища, *ex vitro* адаптирани растения и стопански насаждения. От този раздел на дисертацията може да се съди за огромната експериментална работа, която е извършена от докторантката, усвоените и приложени от нея методи на изследване. Освен обемната теренна работа, която обхваща находища по цялото черноморско крайбрежие и София е използван достатъчно по обем изходен материал за въвеждане в култура – семена и части от цели растения. Оптимизирани са всички основни фази на микроразмножаването: въвеждане в култура, мултипликация (чрез соматична ембриогенеза), вкореняване и адаптация *ex vitro*:

- установяване на оптимална стерилизация чрез използване на набор от стерилизанти;
- използване на различни експланти – семена, листа, незрели семена, плодове, тичинки и венчелистчета;
- хранителна среда – оптимизирани са основните компоненти с цел повишаване на размножителния коефициент, вкореняване и адаптация – захароза, растежни регулатори, активен въглен;
- условия на култивиране – температура, светлина, съдове за култивиране;
- калусообразуване и соматична ембриогенеза;
- коренообразуване, адаптация *ex vitro* и аклиматизация на регенериралите растения;
- фитохимични анализи (екстракция на алкалоиди, хроматографски методи и денситометрично определяне на основния метаболит – глауцин);
- статистическата обработка е извършена чрез подходящи програми в зависимост от характера на изследванията.

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.

Значимост и убедителност на получените резултати, интерпретациите и изводите:

Глава Резултати и обсъждане е значителна част от дисертационния труд и обхваща 65 страници, разделена на няколко основни раздели: 1. Основни характеристики и кълняемост на семената, влияние на абиотични фактори, жизненост на семената, кълняемост при *in vitro* условия. 2. Стерилизация, въвеждане в култура, регенерационен потенциал, влияние на различни фактори върху калусообразуване и соматична ембриогенеза. 3. Органни култури, влияние на компонентите на хранителната среда, съдове и температура на култивиране, директна органогенеза. 4. Коренообразуване, адаптация *ex vitro* и аклиматизация на *in vitro* размножените растения. 5. Фитохимичен скрининг на сурова алкалоидна смес и на алкалоида глауцин в проби от естествените находища и *ex vitro* адаптирани растения от *Glaucium flavum* Crantz. Получените резултати от докторантката са интерпретирани в светлината на постиженията на наши и световни учени. Според представените в дисертацията резултати е извършена голяма по обем работа, статистически обработените резултати от която са представени в добре оформени 19 таблици и 31 фигури.

Установено е влиянието на температура и светлина върху кълняемостта на семената; стимулиращо влияние на гибберелинова киселина при ниска температура и наличие на светлина; относително висока жизненост на семената за изследваните произходи и съответствие и при покълване на семената *in vitro*.

Продължителният процес за инициране, стабилизиране и бърз растеж на калусна култура от различни експланти (корен, хипокотили, семедели) при *Glaucium flavum* Crantz. е наложил изпитване влиянието на различни хранителни среди, растежни регулатори, температура, установена е оптималната хранителна среда (C2), температура ($23 \pm 2^{\circ}\text{C}$) и експлант (корен) за получаване на бързо растящ рехав калус, който да се използва за последващите експерименти за инициране на соматична ембриогенеза.

Един от важните раздели в дисертацията е формирането на соматични ембриони и преминаването им през всички фази на соматичната ембриогенеза, като най-подходящ начин за размножаване *in vitro* на *Glaucium flavum* Crantz., тъй като директната органогенеза е неподходящ метод за микроразмножаване на вида поради затруднено

пъпкообразуване, вкореняване и неблагоприятно въздействие на приложените в хранителната среда растежни регулатори. Установена е различна честота на формиране на соматични ембриони от ембриогенен калус на най-подходящата хранителна среда в зависимост от произхода. Броят на адаптираните *ex vitro* растения, получени чрез соматична ембриогенеза, е в корелация с честотата на проявата на някои морфологични особености на растенията като преплитане и срастване на корените. Прави впечатление доброто познаване и ползване в текста на резултатите в тази област на други изследователи при тези или други растителни видове.

Получените резултати са предпоставка за синхронизиране формирането на соматични ембриони при култивиране в биореактор.

Интересни за практиката са резултатите от тригодишните изследвания на количеството на глауцин в естествените находища на вида, което варира от 0.82 до 2.25%. Растенията на изследваните находища са част от три новоустановени хемотипове на *Glaucium flavum* (с преобладаване на глауцин и протопинови алкалоиди – Варвара и София; хемотип с преобладаване на глауцин и съдържание на морфинановия алкалоид салутаридин – Дуранкулак и хемотип с преобладаващ алкалоид изокоридин – Шкорпиловци). От всички изследвани находища, това в Поморие е определено като най-подходящо за използването му като източник на растения за въвеждане в *in vitro* култура, характеризиращо се със сравнително високи стойности на глауцин, висока кълняемост на семената и стабилно състояние на находището.

Критични бележки и въпроси към дисертационния труд:

Работата е написана стегнато и ясно, четете се с лекота. При представянето на аналогични данни в табличен вид и на фигура (Табл. 12 и Фиг.11), би могло едната да бъде в приложение.

Характер на научните приноси, като за всеки един от тях се посочва дали е оригинален или потвърдителен и каква е неговата стойност за науката и/или обществото (практиката).

Приемам справката за научните приноси, представена от докторантката. Данните за съдържанието на глауцин в девет естествени находища и *ex vitro* адаптирани растения са нови за България:

1. Оригинални:

- За първи път е индуцирана соматична ембриогенеза и е разработен протокол за регенерация на вида *Glaucium flavum* Crantz. Този резултат е перспективен не само за размножаване на богати на вторични метаболити клонове, но и за биосинтез на целевите метаболити *in vitro* в биореактор (принос 1).
- Оригинален принос с научно-приложен характер е определяне съдържанието на глауцин в растения от девет естествени находища, което е предпоставка за въвеждане в култура на растения от най-перспективните (принос 5); адаптирането *ex vitro* на регенерирани *in vitro* растения, от които могат да се създават промишлени насаждения за добив на целевия метаболит (принос 2).
- Установено е влиянието на хранителната среда, нейните компоненти и условията на култивиране върху стъблена култура от *Glaucium flavum* Crantz. (принос 3) и кълняемостта на семената *in vitro* (принос 4).

Съществен принос на дисертацията е стратегията на докторантката, разработката да обхване всички фази на микроразмножаването: въвеждане в култура, повишаване на размножителния коефициент, количество на вторични метаболити, адаптация на перспективни клонове (принос с приложно значение за създаване на индустриални насаждения или възстановяване на застрашени или изчезващи естествени находища).

Докторантката е представила 3 научни публикации, в които са отразени резултати по темата на дисертацията, излезли от печат в две списания с IF: *Comptes Rendus De'L Academie Bulgare Des Sciences* с IF 0,233 и *Natural Product Communications* с IF 0,884 и една публикация в пълен текст в сборник от Семинар по Екология, с което са преизпълнени изискванията на ИБЕИ за получаване на образователна и научна степен „доктор”. От представената справка се вижда, че докторантката е представляла части от дисертационния труд като постери на един семинар и два международни научни форуми, което предполага обсъждането им от широк кръг специалисти в областта на Растителните биотехнологии.

Доколко изследванията по дисертацията са лично дело на докторанта?

Убедено считам, че изследванията са лично дело на докторантката на базата на:

- Теренната работа през трите години на изследванията, извършена от докторантката, усвоени и приложени многобройни методи, като с особена тежест отбелязвам метода на соматичната ембриогенеза, интерпретиране на резултатите и оформянето им в научни статии.

- Във всички статии и постери, представени на конференциите, докторантката Ива Василева Дойчева е първи автор, което се счита като съавторство с най-голям принос при извеждането на експериментите.
- Познавам Ива Василева Дойчева като студентка в магистърската степен, тъй като съм ѝ преподавала. Магистърската и дипломна работа беше в областта на *in vitro* култивирането и част от нея беше изработена в катедра Физиология на растенията. Не мога да не отбележа и активното ѝ участие в други експерименти, резултатите от които бяха представени и публикувани в сборник от конференция. Пожелавам ѝ успешна реализация в опазването на ценни лечебни и/или застрашени растителни видове.

Заклучение

Дисертационният труд на Ива Василева Дойчева представлява съвременно научно изследване в областта на Растителните биотехнологии, в което по подходящ начин е комбинирано размножаване *in vitro* с основните му фази на *Glaucium flavum* Crantz., физиологични, морфологични, хроматографски и методи за статистическа обработка на получените резултати. Избраната тема е актуална и подходяща, а обектът на изследване лечебното растение *Glaucium flavum* Crantz. (Papaveraceae) – с потенциално икономическо значение.

Дисертационният труд и справката за приносите показват доброто познаване както на българската, така и на чуждестранната литература в научната област на изследването, добре подбрани съвременни и модерни методи. Анализите на получените данни са логични, основани на сериозна статистическа обработка, което е допринесло за чудесното оформление на работата. Представеният автореферат е изготвен според изискванията, точно и обективно отразява основните резултати и научни приноси на дисертационния труд.

Докторантката е изградена като самостоятелен изследовател, необходимо условие за придобиване на образователната и научна степен “доктор”. Дисертационният труд отговаря на Закона за развитието на академичния състав в Република България (ЗРАСРБ), Правилника за неговото приложение в БАН и специфичните изисквания на ИБЕИ.

Всичко това ми дава основание убедено и еднозначно да препоръчам на научното жури да присъди научната и образователна степен “доктор” на Ива Василева Дойчева.

30.11.2017 г.

Рецензент: проф. д-р Венета Капчина-Тотева