

РЕЦЕНЗИЯ

от д-р Антоанета Борисова Трендафилова, професор в Институт по органична химия с център по фитохимия – Българска Академия на Науките

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. Биологически науки, докторска програма: Ботаника

Автор: **Ася Павлова Кожухарова**

Тема: **Биотехнологичен подход за опазване и култивиране на гол сладник (*Glycyrrhiza glabra* L.), Fabaceae**

Научен ръководител: проф. д-р Марина Станилова - Институт по биоразнообразие и екосистемни изследвания (ИБЕИ) – БАН

Научен консултант: проф. д-р Страхил Берков - Институт по биоразнообразие и екосистемни изследвания – БАН

1. Общо представяне на процедурата и докторанта

Със заповед РД 75/06.10.2023 г. на Директора на ИБЕИ при БАН съм определена за член на научното жури по процедура за защита на дисертационен труд на тема „Биотехнологичен подход за опазване и култивиране на гол сладник (*Glycyrrhiza glabra* L.), Fabaceae“ за придобиване на образователната и научна степен „доктор“ с автор Ася Павлова Кожухарова.

Представеният от Ася Кожухарова комплект материали на хартиен и електронен носител е в съответствие с Правилника за развитие на академичния състав на ИБЕИ - БАН, отговаря на критериите и включва всички необходими документи. Докторантката е представила справка за натрупаните кредити, както следва: изпълнение на образователната програма - 130 т. (задължителен минимум 130 т.), апробация на изпълнението на научната програма – 208 т. (задължителен минимум 40 т.), публикувани научни резултати -124 т. (задължителен минимум 80 т.). Общият брой кредити за периода на докторантурата (462 т.) значително надвишава задължителния минимум от 250 т. Докторантката е приложила също 3 броя публикации по темата на дисертацията, списък на забелязани цитати по научните трудове, включени в дисертационния труд, списък на участия в научни мероприятия, списък на участие в изпълнение на научни проекти и съответния доказателствен материал. Представеният

автореферат е изготвен според изискванията и в него са представени изцяло резултатите, обсъжданията и заключенията включени дисертационния труд.

2. Кратки биографични данни за докторанта

Ася Кожухарова завършва бакалавърска програма „Биология“ в Биологически факултет на СУ „Св. Кл. Охридски“ през 2013 г. и магистърска програма „Лечебни и ароматни растения“ в ПУ „Паисий Хилендарски“ през 2015 г. Зачислена е като редовен докторант в ИБЕИ-БАН, научна специалност „Ботаника“ г. и е отчислена с право на защита през 2018 г. През 2015 г. е назначена като биолог в ИБЕИ – БАН, а в периода 2019-2023 г. като асистент в същия институт. В момента е отново на позиция „биолог“ в ИБЕИ – БАН. В рамките на досегашната си научно-изследователска дейност участва в общо 10 проекта и в 10 научни форума. Ася Кожухарова е съавтор на 6 научни публикации, като на една от тях са забелязани 4 цитата.

3. Актуалност на тематиката и целесъобразност на поставените цели и задачи

Растенията се използват като храна и лекарства още от дълбока древност. Растителни продукти, включително екстракти, могат да се намерят във фармакопеите на много страни. Въпреки впечатляващото развитие на синтетичните лекарствени средства, растенията остават източник на повече от една четвърт от всички известни лекарства и учените продължават да откриват нови лекарства на базата структурното многообразие на вторичните метаболити. Наред с това, безразборното събиране на лечебни растения води до значителното намаляване на естествените им популации и дори до изчезването им. Това налага не само въвеждането на строги мерки за тяхното събиране, но и търсене на начини за тяхното култивиране. Такъв е случаят с растението гол сладник (*Glycyrrhiza glabra* L.), обект на настоящия дисертационен труд, от което се използват корените на 3-годишни или по-възрастни растения. У нас видът се среща само в района на Дунавската равнина и е категоризиран като застрашен по Червения списък на висшите растения в България и Червена книга на Република България като е забранено събирането му от естествените находища. Тематиката е изключително актуална и интересна, както от научна така и от практическа гледна точка, тъй като предлага разработването на метод за *in vitro* микроразмножаване, позволяващ получаването на множество растения за кратък период, които по-нататък да бъдат използвани за посадъчен материал. Целта и задачите са формулирани ясно и напълно съответстват на темата на дисертацията.

4. Познаване на проблема

В дисертационния труд са цитирани общо 204 източника, една значителна част от които през последните 5 години. Литературният обзор включва подробна информация за ботаническата характеристика на вида, неговото разпространение и консервационен статут, приложението му в народната медицина, за химичния състав на корените, за размножаване на голия сладник в *in vitro* условия и *ex vitro* адаптацията и аклиматизацията му към условия на открито. Докторантката е усвоила специфичната терминология и показва умения за систематизиране и критичен анализ на източници от няколко научни области – ботаника, биотехнология и фитохимия. Представеният материал показва добрата литературна осведоменост и теоретична подготовка на кандидата.

5. Методика на изследването

За изпълнение на поставените задачи е използван растителен материал от 4 български популации на *Glycyrrhiza glabra*, както и корени и семена от растения със стопанско значение от Украйна и корени от Узбекистан. Семената са използвани за инициране на *in vitro* култури и за определяне на техните кълняемост и жизненост. Корените са използвани за фитохимични анализи, а резници от столони са използвани за получаване на растения за *ex situ* колекцията на ИБЕИ и за получаване на вегетативни пъпки за инициране на *in vitro* култури. За въвеждането на семена от *G. glabra* в *in vitro* култура е използвана основна среда MS без и с растежни регулатори в различни комбинации и концентрации, както и добавяне на активен въглен в тестваните среди. *Ex vitro* адаптацията към нестерилни условия и почва е осъществена в 2 етапа: в климатичен шкаф и във фитотронно помещение. Аклиматизацията на растенията е проведена в неотопляема оранжерия и на открито, в опитните площи на ИБЕИ. Направен е също и почвен анализ от четирите известни находищата, както и на почвата на опитната площ на ИБЕИ-БАН съгласно ISO 10390. За фитохимичните анализи са получени екстракти от растителния материал, използвани за определяне на глициризиновата киселина чрез HPLC метод, ТСХ сравняване и спектрофотометрично определяне на общите флавоноиди. За анализ на получените резултати са използвани статистически методи. Използваната методика на изследването напълно отговаря на поставените цели и задачи в дисертационния труд.

6. Характеристика и оценка на дисертационния труд и приносите

Дисертационният труд, написан на 130 страници е конструиран в класически стил с добър баланс между отделните части: увод (2 стр.), литературен обзор (25 стр.), цели и задачи (2 стр.), експериментална част (13 стр.), резултати и дискусия (58 стр.), заключение (9 стр.) и приноси (2 стр.) и 19 страници списък на литературните източници с 204 заглавия. В дисертацията има 16 таблици и 48 фигури. В частта „Резултати и обсъждане“ получените резултати са детайлно описани, анализирани и интерпретирани. Изводите са ясно формулирани. Приносите на дисертационния труд могат да бъдат систематизирани, както следва:

Във връзка с размножаването на голия сладник с биотехнологични методи и опазването на вида:

За първи път са направени сравнителни изследвания на известните български популации по отношение на възможността за размножаване на *G. glabra* с използване на биотехнологични методи и е направено сравнение с референтен произход с търговско значение от Украйна.

За първи път е направено сравнително изследване на жизнеността на семената с произход от известните български находища на *G. glabra*.

Създаден е ефективен протокол за *in vitro* микроразмножаване на *G. glabra*. Установено е, че семената имат комбиниран физичен и физиологичен покой и експериментално са определени подходящи условия за преодоляването му. Избрана е подходяща хранителна среда за клонално *in vitro* размножаване на *G. glabra*, която осигурява едновременно висок размножителен коефициент и ризогенеза и се съкращава стъпката *in vitro* вкореняване.

Създадени са две *ex situ* колекции в опитните площи на ИБЕИ: от растения, получени от резници от столони от 3 български популации на *G. glabra*, както и от *in vitro* размножени и *ex vitro* адаптирани и аклиматизирани растения.

Потвърдено е находището на *G. glabra* до с. Байкал, считано за изчезнало.

Петстотин семена от *G. glabra* са предадени за съхранение в Националната семенна банка в гр. Садово, с което е изпълнена една от препоръките за опазване на вида, формулирани в Червена книга на Република България.

В находището до с. Долни Вит при защитена местност “Червеният бряг“ са засадени растения получени от резници от столони и *in vitro* размножени и *ex vitro* адаптирани растения, всичките размножени от изходен растителен материал взет от същото находище.

Във връзка с фитохимичния анализ на основните биологично-активни вещества:

Данните за съдържанието на глициризин в известните български популации са актуализирани и е потвърдено, че популацията на *G. glabra* край с. Белцов е най-богата на глициризин.

За първи път са направени сравнителни изследвания на съдържанието на глициризин и общи флавоноиди *in situ* в корени от четирите известни български находища на *G. glabra*, във фазите цъфтеж и плодоношение и са установени статистически достоверни разлики между тях. Тези резултати потвърждават сезонните флукуации в съдържанието на глициризин и общи флавоноиди при култивиране на гол сладник с чужд произход в полски условия. В допълнение е направено и сравнение с референтните произходи с търговско значение от Украйна и Узбекистан във фаза плодоношение.

Установено е взаимодействие на факторите произход и фенофаза по отношение както на съдържанието на глициризин, така и на това на общи флавоноиди при растенията, развиващи се в природни условия в находищата.

Установено е, че съдържанието на глициризин и на общи флавоноиди в растенията, размножени вегетативно от резници на столони с различен произход, се изравнява след 3-годишно култивиране в контролираните условия на *ex situ* колекцията на ИБЕИ. Това се дължи на значителното повишаване на съдържанието им в *ex situ* условия при растенията с произход Долни Вит спрямо това в условия *in situ*.

Резултатите от проведените изследвания имат фундаментални научни приноси, които могат да се формулират като проучване на състоянието на естествените популации на *G. glabra*, създаване на протокол за неговото *in vitro* размножаване и *ex vitro* адаптиране, получаване на данни за неговия химичен състав и за тяхното натрупване в различните фази от развитие на растението, както и предоставяне на семена за съхранение в Националната семенна банка. Получените резултати имат и научно-приложен характер с потенциал за практическо приложение, а именно възможността за получаването на посадъчен растителен материал с цел увеличаване на популациите, както и със стопанско значение. Приемам справката за научните приноси, формулирана от докторанта.

7. Преценка на публикациите и личния принос на докторанта

Считам, че експерименталните резултати, както и тяхното представяне и анализ са в голяма степен лично дело на докторантката. Изследванията по дисертацията са обобщени в 3 публикации в научни списания, от които 1 в квартал Q3. Ася Кожухарова

е първи автор в тези публикации, което потвърждава личния ѝ принос за постигане на публикуваните резултати. Забелязани са 4 цитата от чужди автори.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Дисертационният труд съдържа научни и научно-приложни резултати, които представляват оригинален принос в науката и отговарят на всички изисквания на Закона за развитие на академичния състав в Република България (ЗРАСРБ), Правилника за прилагане на ЗРАСРБ и Правилника за прилагане на ЗРАСРБ на БАН. Представените материали и резултати напълно съответстват на специфичните изисквания на Правилника на ИБЕИ-БАН за приложение на ЗРАСРБ. Дисертационният труд показва, че докторантката Ася Кожухарова притежава задълбочени теоретични знания и професионални умения по научна специалност „Ботаника“ като демонстрира качества и умения за самостоятелно провеждане на научно изследване.

Поради гореизложеното, убедено давам своята положителна оценка за проведеното изследване и предлагам на почитаемото научно жури **да присъди** образователната и научна степен „доктор“ на Ася Кожухарова в област на висше образование: 4. Природни науки, математика и информатика, професионално направление 4.3. Биологически науки, научна специалност Ботаника.

17.11.2023 г.

Изготвил рецензията:

(проф. д-р Антоанета Трендафилова)