

## РЕЦЕНЗИЯ

От **проф. д-р Лиляна Руменова Начева**, Институт по овощарство – Пловдив, Селскостопанска Академия (ССА), хабилитирана по професионално направление 6.1. Растениевъдство, научна специалност „Овощарство“ (професор) и 4.3. Биологически науки, научна специалност „Физиология на растенията“ (доцент), определена за член на научното жури със Заповед № 75/06.10.2023 г. на Директора на Институт по биоразнообразие и екосистемни изследвания (ИБЕИ – БАН)

относно дисертационен труд за присъждане 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: 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 - ИБЕИ – БАН

### **I. Обща характеристика на дисертационния труд – обем и структура**

Прекомерното използване и липсата на контрол върху естествените находища води до бързото им изчезване. Прилагането на биотехнологични методи за опазване на биологичното разнообразие е съвременна и актуална задача. *Glycyrrhiza glabra* L. е един от растителните видове с голяма търговска стойност, с множество приложения в козметичната, хранително-вкусовата и фармацевтичната промишленост, но е категоризиран като застрашен по Червения списък на висшите растения и е защитен от Закона за биологичното разнообразие.

Дисертационният труд представя мащабно интердисциплинарно научно изследване, което може да бъде методичен образец за работа с изучаването на редки и застрашени лечебни растения и превръщането им в култивирани видове.

Дисертационният труд е достатъчен като обем, съдържа всички необходими раздели, които са добре структурирани и балансирани. Написан е на 135 стандартни

страници, като литературният преглед обхваща 24% от неговия обем, материал и методи 11% и повече от 64 % са отделени на резултатите и тяхното обсъждане. Работата е добре онагледена с 16 таблици и 48 фигури.

## **II. Литературна осведоменост и теоретична подготовка на кандидата**

Литературният преглед обхваща основните литературни източници и проблеми при разпространението, биологията, методите на размножаване и отглеждане на гол сладник (*G. glabra* L.), както и съдържанието на биологично активни вещества (БАВ) в него. Цитираната литература включва 204 източника, 188 на латиница и 15 на кирилица. Повече от 37% от цитираните източници са от последните 10 години.

## **III. Методичен подход**

Методичният подход е широкообхватен и същевременно фокусиран върху основния предмет на изследването. Използваните материали и методите са описани точно със съответните източници. Много ми допадна графичното представяне на експерименталната работа в началото на раздел 4.2. Методи. Всички експерименти са заложили в достатъчен брой повторения, така че получените резултати да подлежат на статистическа обработка. Поставена е ясна цел на изследването - експериментално определяне на подходящите условия за ефективно *in vitro* култивиране и *ex vitro* адаптация на *Glycyrrhiza glabra* L. и анализ на основните биологично активни вещества в изходните форми и в *ex situ* адаптираните растения. За изпълнение на поставената цел са формулирани 8 основни и 4 допълнителни задачи. Изследвани са редица важни показатели, свързани с кълняемостта на семената и характеризирани влиянието на различни фактори върху *in vitro* културите и съдържанието на биологично активни вещества.

## **IV. Значимост и убедителност на получените резултати, интерпретациите и изводите**

Обследвано е състоянието на българските находища на гол сладник (*G. glabra* L.) в продължение на четири години. Установено е намаляване на находищата и изчезване на находището край гр. Никопол, което още веднъж потвърждава необходимостта от такъв тип разработки и актуалността на дисертационния труд. Отчетена е ниска кълняемост и неравномерно покълване на семената, както и нулева кълняемост на семена без стратификация. Неуспешни са и опитите за повишаване кълняемостта на

семената с растежни регулатори. Проблемите с кълняемостта са преодолени след установяването на комбиниран физичен и физиологичен покой на семената. Извършена е огромна по обем работа.

Изводите, направени в резултат от проучването, са логични, като по-важните от тях са:

- ✓ Съхранението на семената при стайна температура в продължение на 6 месеца преди въвеждането им в *in vitro* култура има благоприятно влияние, като съществено се намалява микробиялното замърсяване (от 27% на 73% оцелели при произход Долни Вит), а се повишава кълняемостта.
- ✓ Стратификацията чрез многократно последователно потапяне на семената в ледена и вряла вода е много по-ефективна при условия *in vitro* отколкото *in vivo* (съответно 66.0% и 13.3% покълнали, при произход Белцов).
- ✓ Жизнеността на семената от трите изследвани български популации е сходна и варира в границите на 40-48%.
- ✓ *G. glabra* L. е бавно растящ вид, трудно податлив на култивиране *in vitro*, като растежът на културите е неравномерен дори при еднакъв произход и еднакъв състав на хранителната среда.
- ✓ Растежните регулатори, добавени в хранителните среди, влияят на растежа и развитието на *in vitro* растенията, като кинетинът е най-подходящият цитокинин за стимулиране на мултипликацията, а ауксинът ИВА благоприятства коренообразуването. Отбрани са подходящите експланти и оптималните хранителни среди за ускорено *in vitro* размножаване на гол сладник.
- ✓ Успешно са адаптирани *ex vitro* и аклиматизирани *in vitro* размножени растения, с което са отработени основните параметри на една бъдеща технология за ускорено размножаване на гол сладник.
- ✓ В резултат на фитохимичния анализ на основните биологично-активни вещества е установено, че растенията от четирите изпитани български популации на женско биле се различават значително по съдържание на глициризин, като са отбелязани и сезонни флуктуации. Също така, процентното съдържание на общи флавоноиди изразени като хиперозид, е много по-високо във фаза цъфтеж отколкото във фаза плодоношение.
- ✓ Метаноловите екстракти от корени на женско биле са по-богати на флавоноидни агликони, отколкото на гликозиди. Профилите на общите

флавоноиди в четирите известни български популации са сходни по отношение на гликозидите, а флавоноидните агликони показват по-голяма вариабилност;

- ✓ Установени са съществени разлики във физичните и химичните характеристики на почвените проби от четирите български находища и от *ex situ* колекцията в ИБЕИ.
- ✓ Значителното повишаване на съдържанието на глициризин и общи флавоноиди в *ex situ* култивираните растения с произход Долни Вит в сравнение с донорните растения от находището и изравняване на стойностите им с тези при *ex situ* култивираните растения с произход Белцов и Коиловци потвърждава възможностите за създаване на комерсиални насаждения от гол сладник, без значение от произхода им, което би спомогнало за опазване на естествените им популации.

#### **V. Критични бележки към дисертационния труд**

Нямам съществени забележки към дисертационния труд. Имам някои технически бележки:

1. В табл. 3 (стр. 34) третата колона със стоковите разтвори е ненужна, достатъчно е представянето на компонентите на хранителната среда в mg/l;
2. Концентрацията на растежните регулатори (табл. 3 и 4.) би било добре да се даде и в микромолове ( $\mu\text{M}$ );
3. На стр. 37, ред 5 е написано „на всяка среда в *няколко повторения*“. В таблиците или на друго подходящо място би било добре да се упомене точният брой повторения (n) във всеки експеримент.

Имам и една препоръка - за по-голяма прегледност би било добре резултатите от обследване на популациите да се обобщят в таблица.

Тези дребни технически бележки в никакъв случай не омаловажават стойността на дисертационния труд, а целят само подобряване на текста и бъдещите научни разработки на докторанта.

*Въпроси:*

1. Изследвана ли е кълняемостта на семена от растения от *ex situ* колекцията?

2. Каква е ролята на активния въглен (използван в третия пасаж) при култивирането на растенията?

## VI. Характер на научните приноси

Приемам авторската справка за приносите. Бих ги класифицирала в следните две групи:

### A. Приноси с оригинален характер:

- За първи път е направено сравнително изследване на жизнеността на семената с произход от известните български находища на *G. glabra* L.;
- За първи път са направени сравнителни изследвания на известните български популации по отношение на възможността за размножаване на *G. glabra* L. с използване на биотехнологични методи;
- Създаден е ефективен протокол за *in vitro* микроразмножаване на гол сладник от семена;
- Създадена е и *ex situ* колекция с растения, получени от резници на столони от 3 български популации и *in vitro* размножени и *ex vitro* адаптирани и аклиматизирани растения от 2 български популации и една от Украйна;
- Семена от гол сладник с произход находището до с. Коиловци са предадени за съхранение в Националната семенна банка в гр. Садово;
- В находището до с. Долни Вит са засадени 12 растения, получени от резници от столони и *in vitro*, получени от същото находище;
- 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* L. и е направено сравнение с референтните произходи с търговско значение от Украйна и Узбекистан.

### B. Приноси с потвърдителен характер:

- Данните за съдържанието на глициризин в известните български популации са актуализирани благодарение на по-съвременни хроматографски методи (HPLC).
- Потвърдено е, че най-богатата на глициризин българска популация на гол сладник е тази край с. Белцов.

- Подобреният хранителен статус на почвата значително подобрява качеството на женско биле като повишава както добива, така и съдържанието на глициризин.

## **VII. Оценка на качеството на научните трудове, отразяващи изследванията по дисертацията**

Във връзка с процедурата са представени 3 публикации на английски език, които съдържат резултати от разработката на дисертационния труд. Те са преминали процес на рецензиране и са публикувани в реномирани научни издания. Едната от тях е публикувана в научно издание, реферирано в световно признатата база данни Web of Science (Q3) и Scopus (Q2). Другата статия е публикувана в списание, също реферирано от Web of Science (core collection), но без индекс. Това потвърждава тяхната значимост и научна стойност. Една от статиите има вече 4 цитата в качественни научни списания (Q3-Q4).

Докторантката е представила резултати от изследванията си на 7 международни научни форума – 3 в чужбина и 4 в България.

## **VIII. Мотивиран отговор на въпроса доколко изследванията по дисертацията са предимно лично дело на докторанта**

Докторантката Ася Кожухарова е придобила необходимите знания в съответната научна област – проучване на възможностите за опазване и култивиране на гол сладник (*Glycyrrhiza glabra* L.), Fabaceae чрез биотехнологични подходи. Тя е провела мащабно интердисциплинарно научно изследване на възможностите за опазване и култивиране на гол сладник (*Glycyrrhiza glabra* L.). Усвоила е много и разнообразни методи на изследване, с което е изпълнила една от основните цели на образователната и научна степен „Доктор“.

На базата на образователната си програма, докторантката е покрила учебен материал от специализирани курсове, които отговарят на необходимите 130 кредита. Докторантката отговаря на определените от Центъра за обучение при БАН за аprobация на изпълнението на научната програма, представяне на резултатите по темата на дисертацията в публикации и на научни форуми и е събрала общо 462 кредита, при задължителен минимум от 250.

## **ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

Въз основа на усвоените и приложените от докторантката различни методи на изследване, правилно изведените експерименти, направените обобщения и изводи считам, че представеният дисертационен труд представлява оригинален принос в науката, отговаря на изискванията на ЗРАСРБ и Правилника за условията и реда за придобиване на научни степени и за заемане на академични длъжности в Институт по биоразнообразие и екосистемни изследвания при БАН, което ми дава основание да го оценя **ПОЛОЖИТЕЛНО**.

Позволявам си да предложа на почитаемото Научно жури също да гласува положително и да присъди на **Ася Павлова Кожухарова** образователната и научна степен **“Доктор”** в област на висше образование 4. Природни науки, математика и информатика, професионално направление: 4.3. Биологически науки, научна специалност „Ботаника“.

16.11.2023 г.

Пловдив

Рецензент: .....

(проф. д-р Лиляна Начева)