

Вх. № 956-НО-05/21.11.2023

СТАНОВИЩЕ
за дисертационния труд на
Ася Павлова Кожухарова

на тема

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

за придобиване на образователна и научна степен „Доктор”

Научно направление: 4.3. Биологични науки
Научна специалност: 01. 06. 03 Ботаника
Секция „Приложна ботаника“
Отдел „Растително разнообразие и ресурси“
Институт по Биоразнообразие и Екосистемни Изследвания
Българска Академия на Науките (ИБЕИ-БАН)

Научен ръководител: проф. д-р Марина Станилова
Научен консултант: проф. д-р Страхил Берков

от

доц. д-р Калина Данова, Институт по органична химия с Център по фитохимия –
Българска Академия на Науките (ИОХЦФ-БАН)

Настоящото становище е изготвено въз основа на Заповед № 75/06.10.2023 г. на
Директора на ИБЕИ (БАН) - София, доц. д-р Владимир Владимиров.

Авторката на дисертационния труд е докторантка към отдел „Растително
разнообразие и ресурси“, секция „Приложна ботаника“ към ИБЕИ - БАН.

1. Актуалност на тематиката

Лечебните и ароматични растения придобиват нарастващо значение за получаването на биологичноактивни вещества, както и други суровини и субстанции за нуждите на фармацевтичната и хранително-вкусова промишленост, козметиката и др. Обектът на работа в настоящия дисертационен труд е *Glycyrrhiza glabra* L., Fabaceae (гол сладник, бобови). Употребата на корените му под формата на чай, както и на стандартизирани извлеци и продукти от тях е застъпена в световните традиционни и конвенционални медицински практики. Растението се среща и у нас в Дунавската равнина, но статутът му е на застрашен вид по Червения списък на висшите растения, като голият сладник е под строга защита като е включен в Приложение 3 от Закона за биологичното разнообразие. Ето защо разработката, включена в настоящата дисертация е от изключително значение както за научното му проучване, така и за изготвянето на стратегии за неговото съхранение, размножаване с цел ре-интродуциране в естествените находища и полево му отглеждане с цел ресурсно осигуряване на растителен материал за фармацевтичната, хранително-вкусовата, козметичната и други промишлености.

2. Познание на проблема

В литературния обзор е извършено изчерпателно обобщение по отношение на ботаническото описание, разпространението, състояние на находищата и консервационния статут на вида, неговия фитохимичния състав и биологичната активност. Обобщени са данни по отношение на достъпни в литературата данни и за въвеждането в култура и *in vitro* размножаването както на изследвания вид, така и на други представители от род *Glycyrrhiza*. Обстойно са разгледани и теоретичните принципи по отношение на методиките за калусообразуване, индиректна органогенеза и соматична ембриогенеза, за провеждането на генетични трансформации, *ex vitro* адаптация и аклиматизация към условия на открито при видове *Glycyrrhiza* и при други лечебни и ароматични растения. Въз основа на извършената обстойна библиографска справка, са изведени необходимостта от систематично проучване на фитохимичния състав и разработката на ефективни биотехнологични подходи за защитата голия сладник в условията на естествените находища в България.

3. Общо впечатление от дисертационния труд

Дисертационният труд е написан на 130 страници, като материалът е онагледен с 16 таблици, 48 фигури и са цитирани 204 литературни източници. По темата на дисертационния труд са публикувани общо три работи, в Journal of BioScience and Biotechnology, Сборник от Семинара по Екология -2017 и Доклади БАН (SJR, Scopus - 0.205, JCR-IF, Web of Science - 0.321). И в трите публикации кандидатката е първи автор. Забелязани са четири цитата едната от работите (в J BioSci Biotechnol) в международни издания, като три от цитиращите работи са с ранг Q. Резултатите по дисертационния труд са съобщени в седем научни прояви (четири от тях – международни). Докторантката е участник в седем научни проекта и ръководител в три младежки проекта по „Програмата за подпомагане на млади учени и постдокторанти“ - БАН. В цялостната научна биография на Ася Кожухарова влизат участието в общо шест научни публикации и десет научни форума. Кандидатката значително надвишава необходимите точки по кредитната система на БАН (общо 462 точки при необходим минимум от 250, разпределени в съответните категории: Изпълнение на образователната програма – 130 т. от изискуеми 130 т., Аprobация на изпълнението на научната програма – 208 т. от изискуеми 40 т. и Публикации на научни резултати по темата на дисертацията – 124 т. от изискуеми 80 т.).

С това дисертационният труд отговаря на изискванията за структура, на качествените и количествените критерии, като кандидатката надхвърля минималните национални изисквания за придобиване на образователната и научна степен „доктор“, заложен в Закона за развитие на академичния състав в Република България (ЗРАСРБ), както 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. Представените от магистър Ася Кожухарова дисертационен труд, автореферат и комплект документи са в съответствие с посочените по-горе изисквания, за да бъде допусната до защита на дисертацията си.

4. Значимост и убедителност на получените резултати, интерпретациите и изводите

Докторантката е усвоила и приложила широк набор от методики на изследването за получаването на научните резултати при проведените експерименти.

- Проведени са сравнително ботаническо обследване и събиране на растителен материал от четири български находища на вида. Набавен е за работа и материал от Украйна и Узбекистан.

- Извършени са анализи и експерименти по определяне на кълняемост и жизненост на семената. След стерилизация са успешно стартирани *in vitro* куртури. Успешно са усвоени и са експериментирани множество биотехнологични подходи на работа – директен органогенез, калусогенез, соматичен органогенез, коренообразуване, експерименти по индуциране на генетична трансформация. За успешното вкореняване и *екс vitro* адаптация е избран подхода за директен органогенез. Проведено е широкообхватно тестване на хранителни среди и са разработени ефективни протоколи за *in vitro* мултипликация. Успешно е извършена *екс vitro* адаптация на получени растения в колекцията на Института по Биоразнообразие и Екосистемни Изследвания – БАН, както и в находищата на растението.

- Извършен е сравнителен анализ на почвения състав от различните находища на вида в дунавската равнина.

- Извършена е екстракция на коренов материал и фитохимични анализи за количествено ВЕТХ (високоэффективно течно-хроматографско) определяне на глициризиновата киселина, както и ТСХ (тънкослойно-хроматографско) и спектрофотометрично определяне на общите флавоноиди.

- Усвоени са методи по статистическа обработка, систематизиране и представяне на данни.

5. Характеристика и оценка на дисертационния труд и приносите

Резултатите от дисертационния труд имат както научна, така и научно-приложна стойност и биха били от полза при бъдещо създаване на насаждение от гол сладник със стопанска цел. Това се отнася от една страна за създадения протокол за ускорено размножаване на вида с прилагане на биотехнологични методи, а от друга страна – за установените особености, свързани със съдържанието на глициризин и общи флавоноиди в отделните находища и в адаптираните *екс сито* растения с различен произход.

Приноси с консервационно значение

- За първи път са сравнени българските популации на вида по отношение на жизнеността и кълняемостта на семената и различните типове експланти за потенциала им за биотехнологично размножаване. В допълнение е направено и сравнение с референтен произход с търговско значение от Украйна.

- Създаден е ефективен протокол за *in vitro* размножаване на гол сладник, като е постигнат висок размножителен коефициент и ризогенез, водещи до оптимизиране на *in vitro* вкореняването му.

- Създадени са две *екс сито* колекции в опитните площи на ИБЕИ: от растения, получени от резници от столони от три български популации на *G. glabra*: Долни Вит, Коиловци и Белцов, както и от *in vitro* размножени и *екс vitro* адаптирани и аклиматизирани растения с произход Коиловци, Белцов и Украйна.

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

- Семена от до с. Коиловци 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 12 растения: 5 получени от резници от столони и 7 *in vitro* размножени и *екс vitro* адаптирани от изходен растителен материал взет от същото находище.

Приноси по отношение на съдържанието на биологичноактивни вещества

- Сравнени са и са оценени резултатите по отношение на съдържанието на глициризин в известните български популации на вида, като е потвърдено е, че най-богатата на глициризин българска популация на гол сладник е тази край с. Белцов.

- За първи път са направени сравнителни изследвания на съдържанието глициризин и общи флавоноиди в корени от четирите известни български находища на вида в различни фенологични фази, като са потвърдени сезонните флуктуации по отношение на съдържанието на тези вещества. В допълнение е направено и сравнение с референтните произходи с търговско значение от Украйна и Узбекистан във фаза плодоношение.

Установено е, че съдържанието на глициризин и на общи флавоноиди в растенията, размножени вегетативно от резници на столони с различен произход (Долни Вит, Коиловци и Белцов), се изравнява след тригодишно култивиране в контролираните условия на *екс сито* колекцията на ИБЕИ. Това се дължи на значителното повишаване на съдържанието им в *екс сито* условия при растенията с произход Долни Вит спрямо това в условия *ин сито*.

Заключение

Представената работа показва, че кандидатката притежава необходимите качества за обобщение и критичен анализ на библиографски данни, както и трудолюбие и постоянство при усвояването и прилагането на усвоения набор от експериментални биотехнологични и фитохимични методики. Всичко това ми дава основание убедено да препоръчам на членовете на уважаемото Научно жури да присъдят на докторант маг. Ася Кожухарова образователната и научна степен “доктор” по Научно направление: 4.3. Биологични науки, Научна специалност: 01. 06. 03 Ботаника

С уважение,
София,
20.11.2023 г.

Изготвила становището:
/Доц. д-р Калина Данова, ИОХЦФ-БАН/