

## РЕЦЕНЗИЯ

на дисертационния труд на

ланд. арх. Владимир Методиев Илинкин

на тема

**“Биотехнологичен подход за култивиране на *Tanacetum cinerariifolium* (Trevir.) Sch.Bip. (Asteraceae)”**

за придобиване на образователна и научна степен „Доктор”

Област на висше образование: 4. „Природни науки, математика и информатика“,

Научно направление: 4.3. „Биологични науки“

Научна специалност: 01. 06. 03 „Ботаника“

Отдел „Растително и гъбно 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 № 35/11.04.2024 г. на Директора на ИБЕИ (БАН) - София, доц. д-р Владимир Владимиров.

Авторът на дисертационния труд е докторант към отдел „Растително и гъбно разнообразие и ресурси“, към ИБЕИ - БАН.

### **(1) Обща характеристика на дисертационния труд – обем и структура**

Дисертационният труд се състои от 103 страници и включва 30 фигури, 19 таблици, 197 цитирани литературни източници. Работата на кандидата е представена под формата на скрепени четири тематично свързани научни публикации. Добро впечатление прави и допълнителното извеждане и систематизиране на общи свързващи части, които правят възприемането на материала логично и подредено. Дисертацията е структурирана по следния начин:

1. Увод
2. Цел и задачи
3. Литературен обзор

4. Материали и методи, Резултати и Обсъждане
5. Заключение
- 5.1. Основни изводи
- 5.2. Декларация за оригиналност и достоверност
6. Приноси
7. Използвана литература
8. Списък на научните публикации с пълно библиографско описание
9. Приложение 1. Протокол за *in vitro* микроразмножаване на *Tanacetum cinerariifolium* (Trevir.) Sch.Bip.

## **(2) Литературна осведоменост и теоретична подготовка на кандидата**

Направена е изключително обстойна библиографска справка по отношение на ботаническите характеристики и разпространението, екологичните изисквания и култивиране на далматинския пиретрум. Обобщена е и информация по отношение на съдържанието на основните биологично-активни вещества, като е отделено специално внимание на съдържанието на пиретрини както в природните популации, така и в интродуцираните аграрни култури, включително и наличните такива в България. Разгледана е достъпната в литературата информация по отношение на различните пиретринови продукти, както и тяхното приложение не само като инсектициди, но и в медицината. Разгледани са и редица синтетични аналози на естествените пиретрини. Представена е информация по отношение на възможностите за семенно размножаване на вида, както и за неговото вегетативно и *in vitro* размножаване. Представен е самостоятелен списък на използваната литература от литературния обзор, систематизиран извън главите за Въведение в скрепените публикации. Отлично впечатление прави обширната справка върху разработки и на други автори върху факторите, свързани с кълняемостта на семената и по-нататъчното повлияване на *in vitro* съдържанието на пиретрини в различни типове хранителни среди и третирания извършвани именно върху изследвания вид. Това е дало възможност на кандидата да подходи обосновано и целенасочено в изследванията си и да постигне в настоящата дисертация надграждане над вече наличното в литературата.

## **(3) Методичен подход**

Методите, усвоени и приложени в настоящата дисертация са систематизирани по следния начин в глава 4, в която са представени и самите скрепени публикации:

- 4.1. Жизненост и кълняемост на семената
- 4.2. *In vitro* размножаване и аклиматизация
- 4.3. Фитохимични анализи

Във всяка от тези подглави се представя обобщение на методите и се прави препратка към съответната публикация. Публикациите обхващат прилагането на следните методи:

**Първа публикация** - „Germination and viability of seeds of *Tanacetum cinerariifolium* (Asteraceae)“ – Vladimir Ilinkin, Elina Yankova-Tsvetkova, Marina Stanilova, Comptes rendus de l'Academie bulgare des Sciences, Tome 73, No 7, 2020, 965-

970 - извършен е сравнителен анализ на кълняемост на свежи семена в *ин витро* и *ин vivo* (в петриеви блюда) условия, както и *ин vivo* на семена, съхранявани 1, 2 и 3 години. При *ин vivo* експеримента е проследена и жизнеността на семената. Експериментът е проведен със семена, събрани в района на село Богдан, регион Пловдив. Усвоени са и са приложени методи за статистическа обработка на резултатите.

**Втора публикация** - „Germination of *Tanacetum cinerariifolium* seeds on different soil types“ – Vladimir Ilinkin, Ecological Engineering and Environment Protection, No 2, 2019, p. 67-74 - проведен е експеримент по проследяване на кълняемост на семена от вида в почви от различен тип (скелетни алувиални, тип рендзини, чернозем, канелени лувисоли, бедни и богати планинско-горски, смолници) в контролирани условия. Изучени са набор от физико-химични почвени индикатори (обща плътност, пясъчна фракция, наличен фосфор, обща порьозност, наносна и глинена фракция, киселинност, карбонатно съдържание, общо азотно съдържание, общо органично съдържание) и са изведени статистическите зависимости между тях и кълняемостта на семената.

**Трета публикация** - „*In vitro* clonal propagation of *Tanacetum cinerariifolium* and establishment of an *ex situ* collection of selected clones“ – Vladimir Ilinkin, Boryanka Traykova, Marina Stanilova, BioRisk, 20, 2023, 97–114 - работено е със семена, събрани от района на село Богдан, а за част от експериментите и със семена от естествените находища в Хърватия. Развит е протокол за въвеждане в *ин витро* култура, експресна мултипликация, селекция на перспективни клонове и създаване на *екс сито* колекция. Експериментирано е със състава на основна хранителна среда по Murashige & Skoog, като са извършени оптимизации по отношение на добавяне към нея на калциев карбонат. За повлияване на загубите вследствие на възникване на ендофитни инфекции е работено с цефалоспориновия антибиотик цефтриаксон (Medaxone). За изследването на микроразмножаването е експериментирано и в течна хранителна среда в условията на биореакторна система с контролирано потапяне (RITA temporary immersion system). Изследвани са съответните морфометрични характеристики и е извършена статистическа обработка на резултатите. Успешната *екс витро* адаптация е извършена от четири клона, произхождащи от хърватската популация, като характеристиките на *екс витро* наблюдавания цъфтеж са проследявани и отчитани в рамките на две години, с тенденция към увеличаване на броя на формираните цветни глави през втората година.

**Четвърта публикация** - „Pyrethrins profiles and contents in seedlings, *in vitro* cultures, and acclimatized plants of *Tanacetum cinerariifolium* clones (Asteraceae)“ – Vladimir Ilinkin, Milena Nikolova, Marina Stanilova, Strahil Berkov, Comptes rendus de l'Academie bulgare des Sciences, v. 76, No 7, 2023 - чрез газова хроматография е изследван състава на пиретрини в хексанови извлеци, получени от няколко *ин витро* клона, както и от цветни глави от първи и втори цъфтеж на *екс витро* адаптираните от тях растения. В допълнение, фитохимичен анализ е извършен и на растителен материал, получен от семена, покълнали в различни типове почви. Извършен е статистически анализ на получените резултати.

#### **(4) Значимост и убедителност на получените резултати, интерпретациите и изводите**

Обобщението на експерименталните резултати е видно и проследимо както в глави Резултати и Дискусия и Изводи във всяка от представените скрепени публикации, така и е систематизирано от кандидата в общите части на дисертацията. Изводите и дискусиите на получените резултати се подкрепят категорично от проведената статистическа обработка на данните, а интерпретацията им е дискутирана релевантно в контекста на разработките и на други автори по тематиката.

Дисертационният труд представя завършен протокол за *in vitro* размножаване на *Tanacetum cinerariifolium* (Trevir.) Sch.Bip. с изходен материал семена. Изследвано е и влиянието на почвените характеристики върху кълняемостта на семената. Направени са сравнителни анализи на основните биологичноактивни вещества при *екс vitro* адаптирани и аклиматизирани на открито растения от *ин vitro* размножени селектирани клонове. Клоновете се различават помежду си по общото съдържание на пиретрини и по съотношението между седемте компонента, което прави биотехнологичния подход за размножаване подходящ инструмент за селекция на високопродуктивни клонове.

Научните резултати, постигнати в разработката на дисертацията се систематизират по следния начин:

##### **▪ *In vitro* размножаване на *Tanacetum cinerariifolium***

- Семената от *Tanacetum cinerariifolium* се характеризират с ниска жизненост и кълняемост (около 20%), които намаляват прогресивно с времето на съхранение и след 3-годишен период не се наблюдават жизнени семена. Най-подходящи за инициране на *ин vitro* култура са прясно събрани зрели семена, като кълняемостта им *ин vitro* е по-ниска. Наблюдават се забавено начало и удължен период на покълване. Най-висока кълняемост на семената от пиретрум се наблюдава при почви тип рендзини.
- В рамките на 3 до 8 субкултивирания растенията загиват вследствие на некроза и развитие на ендофитни микроорганизми. Добавянето на Medaxone в средата (в оптимална концентрация 200 mg/L), преустановява микробиялното развитие и осигурява най-висока продуктивност в продължение на 8 субкултивирания.
- На среда MS без растежни регулатори се получават добре оформени и вкоренени *ин vitro* растения, като добавянето на антибиотика не се отразява на морфологичното развитие на растенията.
- Установено е, че модифицирането на основната MS среда, с увеличена концентрация на калций, добавен като CaCO<sub>3</sub>, води до успешно намаляване на некрозата.
- Установена е разлика между десетки *ин vitro* клонове (инициирани от семена и получени чрез неколkokратно субкултивиране), по отношение на размножителната им способност, което дава възможност за селекция на етап *ин vitro* култивиране. От оцелелите след 8-месечно култивиране 19 клоната, са селектирани 4 клоната, отличаващи се с най-висока продуктивност.
- Размножителният коефициент се запазва относително постоянен за 5 субкултивирания. С течение на времето се установява тенденция към намаляване на неговото вариране.
- Създадената *ин vitro* система за култивиране на Далматински пиретрум (Temporagy Immersion System), в култивационни съдове RITA® и с добавен Medaxone в оптимална

концентрация, не води до повишаване на коефициента на размножаване на изпитаните клонове. Втвърдената с агар среда със същия състав е по-подходяща за култивиране на вида.

- При *ин витро* условия растенията се вкореняват спонтанно на всички изпитани хранителни среди, което благоприятства *екс витро* адаптацията и води до висока преживяемост (88% оцелели от 360). Достатъчни са 6 седмици в климатичен шкаф за укрепване и нарастване на растенията до 10 cm височина. Почти всички растения оцеляват при следващите стъпки на адаптацията, във фитотронно помещение и в неотопляема оранжерия.
- Аклиматизацията на растенията в *екс сито* колекцията на ИБЕИ е успешна. Всички индивиди от вида цъфтят още през първия вегетационен сезон през юни, наблюдаван е и вторичен цъфтеж през септември-октомври. Установени са различия по отношение на разклоняването на стъблата и броя на цветните кошнички. През втората година цъфтежът е по-изобилен, в най-продуктивния клон са образувани средно по  $328 \pm 138$  цветни кошнички на индивид.

#### ■ Фитохимични анализи:

- Доказано е наличието на всички пиретрини, включително и на изомера на пиретрин-I в изследваните проби. Тези метаболити са в малки количества както в *ин витро* растенията, така и в *ин vivo* пониците. Концентрациите на изомера на пиретрин I са до няколко пъти по-ниски в сравнение с тези на пиретрин I.
- Установено е, че при първичния цъфтеж през юни, и при четирите клона в *екс сито* колекцията, съотношението пиретрин I / II е по-голямо от 1, като главният компонент е пиретрин-I. Статистически значими разлики между клоновете ( $p < 0.05$ ) са отбелязани само за пиретрин-II и изомера на пиретрин-I. Съдържанието на пиретрини в цветните кошнички е сравнимо с това, съобщено за естествени популации в Далмация.
- При вторичния цъфтеж през септември-октомври, съотношението пиретрин I/II е по-малко от 1, което вероятно е повлияно от факторите на околната среда (по-кратко слънцегреене, както и преовлажняване на почвата в *екс сито* колекцията) и от степента на узряване на цветните кошнички по време на събирането им.
- Установени са вариации в съдържанието на пиретрини в отделните клонове, култивирани *екс сито*. За всичките 7 компонента варирането е най-голямо в клон 2. Най-малкото вариране на пиретрини I е в клон 1, а на пиретрини II – в клон 3. Статистически достоверни разлики при съотношението пиретрини I / II са установени при клонове 2 и 4.

#### (5) Критични бележки към дисертационния труд

За бъдеща работа с растителен материал с повишен риск от носителство на ендофитни инфекции бих дала препоръка за експериментиране по отношение на методите на стерилизация - оптимизиране на хлорното съдържание в стерилизиращия агент, експериментиране с различни по характер хлорсъдържащи търговски продукти, използване и на други стерилизиращи агенти (например живачен дихлорид), вариране

на времето на пре-третиране с етанол, време на обработка със стерилизиращия агент, значително намаляване на концентрацията на захароза, както в средите за първоначално покълване, така и в тези, за първоначалните пасаж на получените поници. Вероятно би било полезно да се увеличи времето на автоклавиране на средите и др. С цел избягване на развитието на антибиотична резистентност, както и наличие на следи от антибиотика в получения екстракционен материал бих препоръчала единствено еднократен пасаж през среда с антибиотик.

### **(5.1.) Въпроси към кандидата**

- Видът е интродуциран в агро-култура в България в миналото. В момента осъществява ли се неговото полево отглеждане в страната ни?

- Видът показва ли достатъчна студоустойчивост за нашите климатични условия? Въз основа на получените в дисертацията резултати в кой район на България бихте препоръчали неговото отглеждане?

- На базата на получените в дисертацията резултати, кой от подходите кандидатът смята за по-целесъобразен: пиретрини да бъдат получавани по биотехнологичен път в контролирани условия или методът за микроразмножаване да бъде прилаган за получаване на големи количества посадъчен материал за полевото отглеждане на вида?

### **(6) Характер на научните приноси.**

Отлично впечатление прави базирането на експерименталния дизайн в дисертацията на вече постигнатото в литературата от други автори при *T. cinerarifolium*. Това е отразено в дискусията и е предпоставка за оригиналния характер на приносите на дисертацията, получени от кандидата в резултат от планираните и проведените от него експерименти. Така например, включването на калциев карбонат в хранителната среда, е автентичен подход на кандидата при *in vitro* култивирането на вида, базиран на екологичните изисквания на *T. cinerarifolium*. В работата на Владимир Илинкин проличава способността му за самостоятелно мислене и вземане на решения при извеждането на експеримента.

Представена е и Декларация за оригиналност и достоверност от кандидата, която аз подкрепям. Приносите в дисертацията са структурирани както следва:

1. Създаден е нов ефективен протокол за *in vitro* микроразмножаване на *Tanacetum cinerariifolium*, осигуряващ няколко хиляди *in vitro* растения за една година (Приложение 1) - приносът е оригинален.

2. Установено е, че за покълване на семената от *T. cinerariifolium* най-подходящи са почвите тип рендзини - приносът е оригинален.

3. Селектирани са 4 *in vitro* клона с висока размножителна способност, характеризирани се с различна продуктивност по отношение на количеството цветни кошнички в условията на *ex situ* колекцията, което дава възможност за допълнителна селекция - приносът е оригинален.

4. Потвърдено е, че в *in vitro* условия *T. cinerariifolium* синтезира всички пиретрини, като те са в по-ниска концентрация в сравнение с тази в цветните кошнички на добре развити растения - в рамките на конкретните линии, получени от кандидата в

рамките на експеримента с използваните от него семена и хранителни среди приносът е оригинален.

5. Установено е, че при *екс витро* адаптирани и аклиматизирани в *екс сито* колекцията растения, съотношението на Пиретрин I / II е различно при някои клонове, което потвърждава влиянието на генотипа при биосинтеза на Пиретрин I и Пиретрин II и дава възможност за селекция - в рамките на конкретните линии, получени от кандидата в рамките на експеримента с използваните от него семена и хранителни среди приносът е оригинален.

#### **(7) Оценка на качеството на научните трудове, отразяващи изследванията по дисертацията**

Резултатите от работата на кандидата, предоставени за рецензиране за настоящата дисертация са публикувани в четири научни публикации. Две от тях са в квартал Q2, а една в Q3. В една от тях докторантът е единствен, а в останалите три - първи и кореспондиращ автор. Три от публикациите са с SJR индекс, а две са с импакт фактор. Наукометричните показатели на кандидата, както и ролята му в представените за рецензиране публикации са индикатор за способността му за самостоятелно и критично мислене и изразяване и защитаване на академично ниво на получените резултати. Резултатите от дисертацията са представени и в общо девет участия на осем научни форума, от които пет международни.

#### **(8) Мотивиран отговор на въпроса доколко изследванията по дисертацията са предимно лично дело на докторанта**

Представената дисертация показва, че кандидатът притежава необходимите качества за обобщение и критичен анализ на библиографски данни, както и трудолюбие и постоянство при усвояването и прилагането на широк набор от експериментални агро-екологични, биотехнологични, фитохимични и статистически методики за работа. Извършени са интерпретация, дисусия и обобщение на експерименталните резултати, което показва необходимата научна зрялост, постигната от Владимир Илинкин в хода на обучението и работата му. При 250 изискуеми кредита, докторантът покрива 630. Всичко това дава основание да се заключи, че изследванията в дисертацията са предимно лично дело на докторанта.

#### **(9) Мотивирано заключение,**

Представеният за рецензиране дисертационен труд отговаря на изискванията за структура, на качествените и количествени критерии, като кандидатът надхвърля минималните национални изисквания за придобиване на образователната и научна степен „доктор“, заложили в Закона за развитие на академичния състав в Република България (ЗРАСРБ), както и Правилника за условията и реда за придобиване на научни степени и заемане на академични длъжности в ИБЕИ-БАН. Представените от Владимир Илинкин дисертационен труд, автореферат и комплект документи са в съответствие с посочените по-горе изисквания, за да бъде допуснат до защита на дисертацията си.

Всичко това ми дава основание убедено да препоръчам на членовете на уважаемото Научно жури да присъдят на докторант Владимир Илинкин научната и образователна степен “доктор” по Научно направление: 4.3. „Биологични науки“, Научна специалност: 01. 06. 03 „Ботаника“.

С уважение,  
София,  
14.05.2024 г.

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