

РЕЦЕНЗИЯ

на дисертационен труд за придобиване на образователна и научна степен
„доктор“

Автор на дисертационния труд: Мирослава Андреева Стефанова

Тема на дисертационния труд: СРАВНИТЕЛНО СТРУКТУРНО ИЗСЛЕДВАНЕ НА
ЛИСТ ПРИ *IN VITRO* КУЛТИВИРАНИ ЛЕЧЕБНИ РАСТЕНИЯ ОТ СЕМ. LAMIACEAE

Рецензент: доц. д-р Елена Стефанова Чакалова (пенсионер)

Все по-широкото приложение на лечебните растения в практиката на традиционната и алтернативна медицина води до бързо изчерпване на ресурсите от редица ценни растителни видове. Биотехнологичните методи на *in vitro* култивиране разкриват по-големи възможности за масово интродуциране и отглеждане на лечебни растения. Сравнително структурни изследвания на *in vitro* култивирани растителни видове дават основа за установяване на качеството на получените регенеранти и възможностите за по-нататъшна аклиматизация със запазване на лечебните им качества. В този смисъл темата на дисертационния труд е много АКТУАЛНА и осъществените научни изследвания представляват ценен научен принос. Сравнителни структурни и ултраструктурни проучвания на *in vitro* култивирани растения и въздействието на растежни регулатори са провеждани сравнително малко, а у нас те са единични. С оглед и на това темата е дисертабилна.

Целта на проучването е изясняване на структурната организация на органа и органелите на фотосинтезата при *in vitro* култивирани лечебни растения от сем. Lamiaceae и установяване в сравнителен аспект на влиянието на два растежни регулатора (бензиладенин – БА и индол-3-маслена киселина – ИМК) върху хистологичните параметри на листата. Поставени са много добре и ясно три основни задачи – анатомични и ултраструктурни изследвания, на базата на които да се направи сравнително структурен анализ на органно, тъканно, клетъчно и субклетъчно ниво. Целта на дисертационния труд е

правилно поставена, ясно и добре формулирана. Задачите спомагат за цялостно осъществяване на изследвания интересен и значим проблем.

Дисертационният труд е много добре структуриран: Увод – 2стр.; Литературен преглед – 21 стр.; Материал и методи – 9 стр.; Резултати и обсъждане – 77 стр.; Сравнителен анализ на влиянието на бензиладенин и индол маслена киселина върху структурната организация на листа при *in vitro* култивирани растения от *Lamium album*, *Leonurus cardiaca* и *Orthosiphon stamineus* – 7 стр.; Изводи – 2 стр. Цитираната литература обхваща 172 заглавия предимно на латиница като почти половината публикации са след 2000г.

Литературният преглед е написан с вещина и аналитично. Дисертантката е съумяла да подбере от огромната литература за *in vitro* култивиране на растенията тази, която е конкретно по темата, свързана главно със структурата на растения, получени под въздействието на растежни регулатори и по нататъшната регенерация и адаптация при *in vitro* условия. Личи много доброто познаване на съвременното състояние на проблема и съответната литература. В някои отношения литературните данни са представени прекалено подробно.

При изследването са подбрани подходящи **материали** и **методи**. Материалът, използван за структурните изследвания, е въведен в *in vitro* култура в Лабораторията по растителни биотехнологии при Биологическия факултет на СУ „Св. Кл. Охридски“. Обект на проучването са три вида лечебни растения от сем. Lamiales. Подходящо е дадено ботаническото описание на тези видове както и съответните им качества като лечебни растения. Приложени са всички необходими за едно анатомично и ултраструктурно изследване светлинно- и електронномикроскопски методи. Подбрани са умело най-съществените морфометрични параметри (9 за всеки вид). Те дават пълна хистологична характеристика на листа като орган на фотосинтезата, който играе основна роля за самостоятелното хранене на растенията и в случая особено

за адаптацията на регенерираните растения. Резултатите се базират на необходимия брой повторения, гарантиращи достоверността им. Проведена е статистическа обработка на данните. Морфометричните белези на експерименталните варианти са сравнени с помощта на рангов дисперсионен анализ. Изследването е много мащабно. За всеки от трите растителни вида е анализирано въздействието на два растежни регулатора БА и ИМК поотделно и в две комбинации с различни концентрации, общо 12 варианта. Те са сравнени със съответната контрола.

Резултатите са представени много системно, пълно и прецизно. Морфометричните данни за всички варианти са обобщени в три таблици с деветте изследвани параметри. Структурните данни са много добре онагледени с 24 табла с 94 цветни микрофотоса на анатомичната структура на листата и с 27 отлични електронограми, документиращи субмикроскопичната структура на хлоропластите. Освен това са представени снимки на *in vitro* култивираните растения по варианти. Като предимство на работата по отношение на онагледяването приемам и представянето на цветни снимки на прерези на листа от изходния материал, показващи анатомичната им структура. Това дава възможност за сравняване и допълване на представите за промените, настъпващи при *in vitro* култивиране.

Основните **постижения** на дисертационния труд се състоят в цялостно задълбочено изучаване на структурата на листа при *in vitro* регенерация на три вида лечебни растения. Доказва се необходимостта от комплексни структурни проучвания на различни нива на организация за установяване на регенерационния потенциал на всеки вид и успешната му по-нататъшна адаптация. Получени са много нови, интересни и показателни резултати. Дисертантката отлично се е справила с интерпретирането и дискутирането с литературна обосновка на тези резултати. Съществено е да се отбележи много доброто осъществяване и интерпретиране на резултатите в главата „Сравнителен анализ ...“, което е особено трудна задача, особено поради големия брой показатели и варианти. Това е показател не само за много

добрите възможности на дисертантката да провежда, дискутира и обосновава научните си изследвания, но и за обобщаването им. Една част от получените резултати са установени за първи път за науката или за изследваните видове.

Най-съществените резултати и приноси от проведените научни изследвания са главно в две направления: 1) Проучване на анатомичния строеж на листа на *in vitro* култивираните лечебни растения и 2) Ултраструктурни изследвания.

По 1. Нови и несъобщавани до сега са данните относно анатомичната структура и хистологичния строеж на листата при съответните варианти на култивиране *in vitro*. За първи път е установен специфичния отговор на ултраструктурно ниво на въздействието на приложените растежни регулатори:

- промяна в хистологичния облик на клетките на палисадния паренхим;
- формиране на еднороден мезофил от палисаден тип при *L. cardiaca*;
- промяна на дела и типа на мезофила и коефициента на палисадност, който средно е най-голям при *O. stamineus*, а най-малък – при *L. album*;
- въздействие върху хистогенезата на епидермалната тъкан:
 - промяна в броя на устицата;
 - чувствително увеличаване на жлезистите власинки при *L. cardiaca*. Този факт считам за много интересен, но нуждаещ се от по-нататъшни детайлни проучвания. При доказана стабилност на този белег това би имало определен положителен ефект върху получаваната, евентуално по-късно, лечебна субстанция;
- най-добра приспособеност към условията на култивиране и следваща регенерация, без проява на съществени негативни тенденции в процеса на хистогенезата показва бъбречния чай (*O. stamineus*).

По 2. Ултраструктурният анализ на органелите на фотосинтезата показва специфика на влиянието на растежните регулатори при всяко от проучените лечебни растения. За първи път са установени редица нови данни за субмикроскопичната структура на клетките и по-специално на хлоропластите. Ултраструктурата им е повлияна в различна степен от присъствието и концентрацията на използваните растежни регулатори в хранителната среда:

- най-слаби промени в хлоропластната структура са установени при *L. cardiaca*;
- При *O. stamineus* и в по-голяма степен при *L. album* е установено негативно въздействие върху структурата на хлоропластите и особено на мембранната им система при самостоятелно и комбинирано приложение на БА;
- при изследваните три вида лечебни растения най-добре се формира оптимална хлоропластна структура при комбинирано прилагане в хранителната среда на съответните растежни регулатори.

Получените данни са показателни не само за универсалността на „стресовата“ реакция на хлоропластите, но главно за специфичния отговор съответния растителен организъм. Това може да се използва за насочване и управление на процесите на регенерация при по-нататъшно култивиране *ex vitro*.

При проведеното обширно проучване са получени и редица данни с потвърдителен характер като:

- намаляване на дебелината на листната петура при *in vitro* култивираните растения;
- формиране на еднореден палисиден паренхим;
- издигнато положение на устицата над основните епидермални клетки;
- непроменен тип покривни и жлезисти власинки;
- тип на негативна ответна реакция на хлоропластната структура, който се проявява обаче по специфичен начин при отделните видове и др.

Част от получените резултати относно приложението на растежните регулатори БА и ИМК имат в извистен смисъл практическа насоченост и препоръчителен характер относно използването на най-подходящата концентрация при по-нататъшни опити за *in vitro* култивиране. При един от изследваните видове - *L. cardiaca* - е установена липсата на необходимост от използване на тези растежни регулатори при култивиране. Това може да се окаже и с определен ефект на икономия на средства. Осъществените структурни изследвания ясно доказват необходимостта от осъществяване на

цялостни структурни проучвания на листа при всеки растителен вид, въвеждан в култура, за да може да се допълни протокола за микроразмножаване.

Изводите от проведеното обстойно, мащабно сравнително структурно изследване са представени обобщено и посочват основните постижения на дисертационния труд. Те показват ясно, че напълно са осъществени поставената цел и задачи. Положително оценявам подчертаването, в края на обсъждането на резултатите от всеки растителен вид, на анатомичните и ултраструктурни заключения.

По работата имам и някои въпроси и забележки:

1. В дисертационния труд не е посочена причината и не е направена обосновка на избора на трите вида лечебни растения. Моля, това да бъде изяснено.
2. При стандартните условия на *in vitro* култивиране в проведените експерименти е потвърден факта, че устицата са издигнато разположени спрямо основните епидермални клетки на листа. Това се приема като отговор на свръховоднеността на тъканите при тези условия. Има ли литературни данни относно функционирането на устицата като хидатоди? Считате ли, че този факт може да се разглежда като своеобразно хигрофитно приспособление?
3. При обсъждане на резултатите относно увеличени брой на жлезистите власинки при *L. cardiaca* дискутирате становища на други автори като ефект на стареене. Не е ли по-вероятно ИМК да действа стимулиращо върху хистогенезата на инициалните клетки на жлезистите власинки, тъй като броят им се определя още в началото на растежа на листа?
4. Макар и малък брой от представените микрофотоси, по-специално някои от тези, онагледяващи епидермиса, не са достатъчно ясни.

Дисертационният труд е написан много добре на съответното високо научно ниво, издържан езиково и стилово. Резултатите са много добре документирани и онагледени, както и аналитично и задълбочено обсъдени.

Особено високо оценявам главата „Сравнителен анализ на влиянието на бензиладенин и индол маслена киселина върху структурната организация на листа при *in vitro* култивирани растения от *Lamium album*, *Leonurus cardiaca* и *Orthosiphon stamineus*“.

Авторефератът е изготвен според изискванията и е добре структуриран. Той е достатъчно информативен и отразява основните резултати и приноси на дисертационния труд. Приносите от роевдните проучвания са коректно, ясно формулирани и отразяват най-съществените постижения. В известен смисъл те са скромно представени.

По темата на дисертационния труд има 2 публикации в съавторство като дисертантката е водещ автор. Едната е в чуждестранно издание и е публикувана през 2011г., а другата е под печат с импакт-фактор 0,189. Има 3 участия в научни форуми – 2 у нас и 1 в чужбина. Извън темата на дисертацията докторантката има в съавторство 9 публикации в областта на структурата на растенията.

Заключение

Дисертационният труд на Мирослава Андреева Стефанова е една много актуална разработка. Извършена е голяма по обем, трудоемка изследователска работа, която е прецизно и лично осъществена. Получени са многостранни, оригинални, интересни и стойностни научни резултати. Те са богато илюстрирани, задълбочено и аналитично интерпретирани и дискутирани и са съществени научни приноси от различен характер. Дисертационният труд напълно отговаря на критериите за придобиване на образователна и научна степен „доктор“, поради което гласувам за присъждането на тази степен на докторантката Мирослава Андреева Стефанова.

15.06.2013г.
София

Доц. д-р Е. Чакалова