

РЕЦЕНЗИЯ

върху дисертационен труд за присъждане на образователната и научна степен „Доктор”
по професионално направление: 4.3. "Биологически науки",

научна специалност: "Физиология на растенията"

Автор на дисертационния труд: Жени Димитрова Нанова, докторант на самостоятелна подготовка в Катедра „Физиология на растенията”, Биологически Факултет на Софийския Университет „Св. Климент Охридски”

Тема на дисертационния труд: „Микроразмножаване на бял риган (*Origanum vulgare* ssp. *hirtum* (Link) Ietswaart) и исоп (*Hyssopus officinalis* L.) и оценка на тяхната цитотоксична активност”

Рецензент: доц. д-р Ели Георгиева Зайова, секция „Приложна генетика и биотехнология на растенията”, Институт по Физиология на Растенията и Генетика, Българска Академия на Науките

Представеният ми за рецензиране дисертационен труд на Жени Димитрова Нанова представлява задълбочено научно изследване, насочено към развитието на ефективни *in vitro* протоколи за ускорено размножаване на бял риган (*Origanum vulgare* subsp. *hirtum*) и исоп (*Hyssopus officinalis*), анализ на етеричномасления състав и оценка на алелопатичния и цитотоксичен потенциал на микроразмножените растения. И двата лечебни вида са източници на суровина и вторични метаболити за различни цели във фармацевтичната и хранително-вкусовата промишленост, а съдържащите се етерични масла намират широко приложение в парфюмерията и козметиката. Повишеното търсене на суровината е причина за интензивно събиране от естествените находища, водещо до тяхното унищожаване. Поради тази причина култивирането им е важно за задоволяване нуждите от суровина и опазване на биологичното многообразие. Растителните биотехнологии предлагат добра алтернатива за масово размножаване на елитни индивиди от бял риган и исоп за кратък период от време при контролирани условия и при запазване на генетичния потенциал на вида. Въпреки това редица въпроси, свързани с необходимостта от разработване на ефективни протоколи, специфични за отделния вид; индуциране и характеризиране на *in vitro* културите, влияние на редица културални фактори върху размножителния коефициент, както и получаване на биомаса като алтернативен източник на етерични масла при тези видове все още не са решени. Установяването на взаимовръзката между различните групи

растежни регулатори също е от голямо значение за тези процеси, тъй като от техния вид и концентрация зависи успехът на работата по тъканни култури. Това изисква задълбочени познания за да се подберат оптималните условия за всеки етап от *in vitro* размножаването при двата обекта на изследване. Необходимостта от проучване и изясняване на тяхната биологична активност (алелопатична и цитотоксична) ми дават основание да определя темата на дисертацията като изключително перспективна.

Жени Димитрова Нанова е зачислена като докторант на самостоятелна подготовка към катедра „Физиология на растенията” при Биологическия факултет на Софийския университет „Св. Климент Охридски“ с научен консултант проф. д-р Венета Капчина - Тотева. В голямата си част експерименталната работа е проведена в лабораториите на Шуменския университет „Епископ Константин Преславски,“ и Земеделски институт, Шумен. Представеният от докторанта комплект материали на електронен и хартиен носител, както и всички необходими документи по процедурата са в съответствие с изискванията на Закона за присъждане на научни звания и степени и Правилника за приложението му.

Структура на дисертационния труд: Дисертацията е написана на 137 стандартни печатни страници в т.ч. и списък на ползваната литература. В структурно отношение дисертационният труд е разделен на раздели по класическия модел: увод и литературен обзор (29 стр.); цел и задачи (1 стр.); материал и методи (17 стр.); резултати и обсъждане (49 стр.); заключение, изводи и приноси (6 стр.) и литература (26 стр.). Основните резултати са илюстрирани с 21 таблици и 31 фигури, включително и снимков материал. Съотношението между обемите на основните раздели е балансирано. Дисертационният труд в техническо отношение е оформен много добре, с научно издържан стил. Не са допуснати терминалогични и правописни грешки.

Актуалност на тематиката: Темата на дисертационния труд е изключително актуална като се имат предвид ценните лечебни свойства (антибактериални, антивирусни, антигъбични, антиоксидантни) на белия риган и исоба, повишеното търсене на етеричните масла на европейските и световни пазари, ограничителните режими за събирането им от естествените местообитания, завишените изисквания към качеството на суровината, както и липсата на задълбочени изследвания у нас по проблематиката. Резултатите от настоящите проучвания са добра предпоставка за допълване на познанията за белия риган и исоба, особено във връзка с опазването на биоразнообразието, човешкото здраве и околната среда. От литературната справка проличава, че наличните данни за *in vitro* култивирането на тези видове са доста

ограничени, което засилва приносният характер на представените в дисертацията изследвания.

Познаване на проблема: Литературният обзор е информативен и показва значителните усилия на докторанта да представи обширен литературен преглед на биологичните особености на двата лечебни вида, на тяхната фармакологична активност и приложение, начините на размножаване, етеричномаслен състав, алелопатичен капацитет и цитотоксичен ефект на проучваните растения. Целенасочено са използвани изключително голям брой литературни източници - 352, от които 14 на кирилица, отразяващи съвременното състояние на изучавания проблем през последните години. Приложен е и списък на използваните съкращения за улеснение на читателя.

Методичен подход: Проведените изследвания имат конкретно и ясно формулирана цел. Докторантът самостоятелно е извършил голям обем изследванията с нужната компетентност, разрешавайки пет основни задачи. Изследванията и при двата лечебни вида се основават на използването на съвкупност от методически похвати, които показват задълбочени познания. Изведени са редица *in vitro* опити с варианти хранителни среди, различаващи се по вида и концентрациите на включените растежни регулатори - самостоятелно или в комбинации. Правилно са подбрани и *in vitro* техниките за размножаване - начини на стерилизация и на култивиране; условия на отглеждане във фитостатното помещение. Извършени са измервания и отчитания на голям брой показатели, позволяващи морфологична характеристика на микроразмножените растения, а химичният състав на етеричните масла е определен чрез газовохроматографски анализ. Приложени са определени тестове за оценка на алелопатичния и цитотоксичен потенциал на микроразмножените растения, като например най-често използвания *Allium cepa*-тест. Чрез предварително изготвена анкетна карта е събрана информация относно използването на лечебни растения в България. Данните са статистически анализирани с подходящи съвременни методи. От методична гледна точка оценявам високо подготовката на докторанта.

Представяне и убедителност на резултатите: Резултатите в настоящия труд са представени ясно и прегледно, подкрепени от значителен брой таблици и фигури. Постигнато е логически построено изложение. Получените данни са интерпретирани правилно в хода на тяхното разглеждане, което допринася за разкриване на интересни, заслужаващи вниманието изводи. Резултатите при тяхното обсъждане са подкрепени с цитирания на други автори, което придава задълбоченост на познанията, относно материята, свързана с поставената цел и задачи т.е. дискусията има аргументиран

характер. Този подход за разработване на дисертационния труд говори за израстването на докторанта като добър изследовател. Въз основа на резултатите могат да се направят следните по-важни констатации:

1. Постигнато е ефективно микроразмножаване на бял риган и исоп. Растежът и развитието на експлантите, както и индуцирането на вегетативни издънки са стимулирани чрез използване на подходящи по състав хранителни среди и условия на култивиране. Микроразмножените растения успешно са *in vitro* вкоренени и *ex vitro* адаптирани, което гарантира създаването на полски насаждения като предпоставка за планирани мерки за тяхното опазване.

2. Чрез газова хроматография е установено, че състава на етеричните масла значително се различава в проучваните варианти бял риган, като автора обяснява тези различия в зависимост от произхода, височината на растенията, от броя на разклоненията и тяхната дължина в съцветието. Доказано е, че основната съставка в етеричното масло на микроразмножените растения от бял риган е карвакрол т.е. етеричномасленият им състав е от карвакролов хемотип.

3. Оценен е алелопатичният потенциал на водните екстракти от микроразмножените бял риган и исоп. Резултатите показват наличие на водоразтворими алелопатични вещества в двете растения, като белият риган имат по-силен алелопатичен ефект по отношение на използваните тест-обектите, отколкото този на исоба.

4. Установено е цитотоксично влияние на водните екстракти от бял риган (3.5 g/l за 3 ч.) и исоп (3.5 g/l за 24 ч.), изразяващо се в понижаване темпа на клетъчното делене и промени в съотношението на фазите на митозата в клетки от коренова меристема на *Allium cepa* L. Екстрактите от белия риган имат по-силно негативното влияние върху клетъчното делене при *A. cepa* (предимно нарушения във формирането на делителния апарат на клетките), отколкото тези при исоба (най-често нарушения, свързани с целостта на хромозомите). Наличието на микроядра и на двуядрени клетки в интерфазните клетки е доказателство за нарушена структура на делителното вретено и инхибиране на цитокенезата.

5. Събрана е ценна информация за използването и познаването на лечебния ефект на двата растителни вида чрез анкетно проучване.

Оценка на дисертационния труд: В дисертационния труд е включен сериозен теоретичен и емпиричен материал, разкриващ детайлите в областта на физиология на двата вида лечебни растения. При драстичното намаляване на растителните ресурси, биотехнологичния подход за *in vitro* култивиране и размножаване на белия риган и

исопа е ценен метод за опазване на естествените популации. Положителна оценка заслужава онагледяването на разделите с добре оформени фигури и снимков материал. Изложените в дисертационния труд научни резултати и виждания са обобщени в кратко **заключение**, а получените резултати са систематизирани в добре формулирани **изводи**, в пълно съответствие с експерименталните данни. Наблюденията ми върху целия процес на дисертационната разработка ми дава основание да направя следната оценка за качеството на дисертационния труд:

- Представен е завършен дисертационен труд по една актуална тема, която не е разработвана в България;
- Мултидисциплинарен подход на изследване, включващ биотехнологични, физиологични и фитохимични методи;
- Приложен е съвременен статистическият анализ за оценка на резултатите;
- Реална практическа приложимост на резултатите от изследването.

Приноси и значимост на дисертационния труд за науката и практиката: Справката за приносите, съответства на дисертационния труд и отразява обективно реалните достижения на докторанта. Налице са убедителни доказателства за научно-приложни резултати, представени като решения по изследваните проблеми. Могат да се открият следните основни научни достойнства на дисертационния труд:

- Създадените експериментални насаждения в района на Земеделски институт, Шумен демонстрират ефективността на разработените протоколи за микроразмножаване на бял риган и исоп, които осигуряват получаването на достатъчни количества добре *ex vitro* адаптиран посадъчен материал.
- Установеният алелопатичен ефект на водни екстракти от бял риган и исоп може да бъде използван както за изучаването на взаимовръзката между съвместно отглеждани култури, така и за намирането на подходящи технологични решения при контролиране на плевели и болести, като екологична алтернатива на използваните пестициди.
- Данните за цитотоксичното влияние на водните екстракти от бял риган и исоп върху дялящи се клетки от коренова меристема на *Allium cepa* L. са добра научна основа за бъдещи изследвания относно биологичната активност на тези лечебни растения, с цел безопасност за човешкото здраве.

Дисертационният труд има теоретичен и ясен приложен характер, с възможност получените разработки да бъдат използвани за практически цели (селекционни или производствени). В този аспект дисертацията демонстрира своята практическа приложимост, полезност и ценност.

Лично участие на докторанта: Познавам добре работата на дисертантката, нейната отговорност и организираност като изследовател. Практическото изпълнение на експериментите и обсъждането на получените резултати са лично дело на докторанта, където проличава умението да анализира, да представя и защитава убедително своята теза. Това твърдение се подкрепя от факта, че в три от публикациите тя е първи автор. Представените дисертационния труд, автореферат и научни статии показват, че дисертантът има опит като изследовател, а участието в обучението на студенти при провеждане на анкетното проучване и като университетски преподавател. В тях личи стремежът към новаторство, аналитичност и задълбоченост към научните проблеми. Смятам, че докторантът добавя личен принос в познанието за двата лечебни вида.

Публикации по дисертационния труд: Във връзка с дисертационния труд, докторантът представя две публикации в научни списания (втората с Impact Factor 0.68), а в първата е водещ автор. Както и две публикации в сборници от участия в научни форуми (Научна конференция с международно участие „Природни науки – 2006”, Варна и Студентска научна конференция „Екология и околна среда”, 2013, Шумен). Представените публикации съответстват на обявените от дисертанта в приложения списък и в автореферата. Забелязани са 7 цитата.

Авторефератът е подготвен в обем от 44 страници компютърно набран текст, съгласно изискванията. Той коректно отразява получените резултати и научните приноси на дисертационния труд.

Въпроси към дисертационния труд:

1. Запазва ли се размножителният коефициент при исопа с напредване броя на субкултивиранията?
2. Продължителността на третиране при *Allium*-теста обикновено е 24 или/и 48 часа, тъй като продължителността на клетъчния цикъл на коренова меристема от лук е около 20-24 часа. Защо при белия риган периода на третиране е 3 часа?

Препоръчвам докторантът да популяризира получените резултати от етноботаническото проучване с цел информираност на по-широк кръг от заинтересовани лица, организации и институции.

Заключение: Дисертационният труд на докторант Жени Димитрова Нанова е задълбочено изследване на актуална и значима за растителната биотехнология, физиология и етноботаника проблематика. Проведено е целенасочено научно проучване при две ценни лечебни растения с богат експериментален материал. Като цяло дисертационният труд е отлично подреден и добре балансиран. Поставената в

дисертацията цел е постигната. Изпълнена е и образователната част от докторантурата, при което са усвоени различни методи и техники. Получените резултати и направените изводи представят докторанта като изграден специалист с добра компетентност по проучваните въпроси, който самостоятелно може да решава научни въпроси. Посочените приноси не само обогатяват съществуващите знания, но са в състояние да подпомогнат и практиката в изследваната област, особено за опазване на естествените местообитания на ригана и исопа. С убеденост давам положителна оценка на представените дисертационен труд и автореферат, на постигнатите резултати и приноси. Считам, че те изцяло покриват изискванията на ЗРАС и Правилника за неговото прилагане и препоръчвам на уважаемите членове на Научното жури да вземат решение за присъждане на образователната и научна степен „Доктор” на Жени Димитрова Нанова по научно направление 4.3. Биологически науки, научна специалност: Физиология на растенията.

07.04.2014 г.

гр. София

Рецензент:

Доц. д-р Ели Зайова