

РЕЦЕНЗИЯ

От доц. д-р Красимир Емилов Русанов, Агробиоинститут, гр. София, ССА

Относно дисертационен труд **“Ин витро размножаване на българския ендемит *Achillea thracica*: възможност за *ex situ* опазване на рядък, застрашен и защитен вид от българската флора”** за присъждане на образователната и научна степен „доктор“ в професионално направление **4.3. Биологически науки (Физиология на растенията - ин витро култивиране на лечебни растения)** на **Мария Ангелова Рогова**, редовен докторант към катедра „Физиология на растенията“ на Биологически факултет към Софийски университет „Св. Климент Охридски“ с **научен ръководител проф. д-р Венета Михова Капчина-Тотева**.

Мария Ангелова Рогова е родена на 02.05.1988г. в гр. София. През 2011г. получава бакалавърска степен по Биология, а през 2013г. магистърска степен по специалност Биотехнологии от Софийски Университет „Св. Климент Охридски“. От 2014г. Мария Рогова е зачислена като редовен докторант по професионално направление 4.3. Биологически науки (Физиология на растенията - ин витро култивиране на лечебни растения) към катедра „Физиология на растенията“ при БФ на СУ.

Актуалност на изследването

През последните няколко десетилетия интересът към медицинските растения като източник на природни продукти с потенциално приложение в медицината и козметиката нарасна значително. България е сред страните с най-богати генетични ресурси от медицински растения не само в Европа, но и в света. Нарасналото търсене на природни продукти, наблюдавано през последните години е пряко свързано с увеличаване на риска за естествените популации на медицински растения в България, поради съществуващите практики за тяхното събиране от естествени находища. Имайки предвид горепосоченото, настоящият дисертационен труд отговаря напълно на актуалните проблеми свързани със застрашените медицински растения в България като е насочен към *in vitro* размножаване на българския ендемит *Achillea thracica* и възможността за неговото *ex situ* опазване.

Структура на дисертационния труд

Дисертационният труд на Мария Рогова е написан на 138 страници включвайки 36 фигури, 18 таблици като са цитирани общо 213 литературни източника. Структурата на дисертацията включва 11 раздела, от които: Използвани съкращения – 1 стр, Увод – 1 стр., Литературен обзор – 30 стр., Цел и задачи – 1 стр., Материали и методи – 20 стр., Резултати и обсъждане – 53 стр., Изводи – 2 стр., Заключение – 1 стр., Приноси – 1 стр., Списък на научните публикации и участие на научни конференции – 3 стр., Използвана литература – 18 стр. Структурата и обемът на представения труд отговарят на общоприетите изисквания за съдържание на дисертационен труд за придобиване на научната и образователна степен „доктор“

Използвани съкращения

Списъкът с използваните съкращения включва повечето използвани такива в текста на дисертационния труд като са допуснати някои технически грешки като означаването на GC-MS като GS-MS и не особено добре преведеното съкращение за ISSR маркери като „вътрешни прости повторения на последователност“ вместо „между-микросателитни последователности“. Биха могли да бъдат включени и други съкращения използвани в дисертацията като напр. PS2, HS-GC-MS, HSV, и др., макар и да са обяснени в текста на съответния раздел.

Увод

Уводът включва кратко въведение насочващо читателя към проблема свързан със застрашените естествени популации на медицинските растения в резултат на човешката дейност, някои данни за застрашения вид предмет на дисертационния труд *Achillea thracica* Velen, както и с възможностите на микроразмножаването за съхранение и размножаване на растенията.

Литературен обзор

Литературният обзор запознава в подробности читателя с редица аспекти, които са от съществено значение за правилното формулиране на целта и поставянето на задачите на настоящия дисертационен труд. Представена е характеристика на вида *Achillea thracica* Velen включващ неговата класификация, морфология и размножаване като са посочени

основните популации съществуващи в страната с особен акцент върху това, че понастоящем е потвърдено наличието на само една популация до с. Маноле. Представена е и подробна фитохимична характеристика на представителите на род *Achillea* на основата на обзор на публикуваната литература като са разгледани основните класове съединения влизащи в състава на етеричните масла и растителни екстракти, включващи вторични и първични метаболити като фенолни съединения, амиди, алкалоиди, терпеноиди, въгледороди, сапонини, кумарини, аминокиселини, мастни киселини и др. Литературният обзор прави преглед и на фармакологичната активност на екстракти от род *Achillea* като подробно са разгледани изследвания свързани с естрогенен ефект, регенериращо действие, антидиабетичен ефект, действие върху храносмилателната система, противовъзпалително действие, антиоксидантни свойства, антимикробни свойства, хербцидни свойства, противоглистно действие, анксиолитично (успокояващо) действие, въздействие при нервnodeгенеративни заболявания, имунологични свойства. Съществена част от литературния обзор е посветена на методите за *in vitro* размножаването като метод за *ex situ* консервация на растения.

Необходимо е да се направят някои забележки към така представения литературен обзор. В значителен брой случаи цитираната в текста литература не е налична в списъка на раздела „Използвана литература“. Фиг. 1 представя съществуващите и изчезнали находища на *Achillea thracica* Velen като легендата към фигурата не пояснява с конкретни означения съответните находища, а само статута им на съществуващи или несъществуващи. На представената фиг. 8 показваща основни стадии на микроразмножаването липсва стадий 2, който иначе е описан в текста. Посочените примери не са от решаващо значение за крайната оценка на дисертационния труд, но представляват слабост при представянето му в завършен вид.

Цел и задачи

Запознаването с текущото състояние на популациите на *A. thracica* в България, както и задълбоченият преглед на изследванията при представителите на род *Achillea*, представени в литературния обзор, в областта на тяхната фитохимична характеристика, анализ на биологичната активност на екстракти и опити по микроразмножаване, дават

възможност на докторанта да формулира ясна цел на дисертационния труд. Поставените задачи са логично обосновани въз основа на поставената цел.

Материали и методи

Разделът материали и методи е представен в общоприетия вид илюстриращ в детайли използваната методология за провеждане на експерименталната част от дисертацията. Прави впечатление голямото разнообразие на използвани методи от различни области на растителните биотехнологии включващи: работа с тъканни култури, анализ на морфологични характеристики и физиологични параметри на растенията, молекулярно-генетични методи, широк набор от фитохимични методи за получаване на различни видове екстракти, подробното им характеризирание с приложение на съвременни хроматографски методи, както и *in vitro* методи за оценка на антиоксидантната им, антибактериална и антивирусна активност.

Забелязват се някои пропуски като например: т. 19.1. описва процедура за анализ на полярни съединения на GC-MS апарат включващи аминокиселини, захари и органични киселини, докато в същото време в описанието на протокола се използва неполярната хлороформена фракция за анализ на тези съединения. Вероятно докторантът е имал предвид водно-метаноловата фракция. В точка 20.1 не е описан температурният градиент на газовия хроматограф при използваната GC-MS система като вероятно условията са били различни за анализа на полярни и на неполярни съединения. В същото време в т. 20.3 е описан анализ на GC-MS апарат с троен квадрупол с описана и температурната програма на пещта, но не се разбира кои екстракти и съединения са били анализирани с тази програма.

Резултати и обсъждане

Разделът резултати и обсъждане представлява най-обширната част от дисертационния труд, заемащ общо 38% от неговия обем и включва резултати покриващи изпълнението на всички поставени задачи. Структуриран е в общо 15 подраздела, от които 2 разглеждат въвеждането *in vitro* на *A. thracica* Velen, нейното микроразмножаване и последваща *ex vitro* адаптация, 1 разглежда генетичната стабилност на размножените *in vitro* растения, 4 разглеждат промени в анатомичната структура на изследваните растения, както и промени в тяхната физиология, 6 разглеждат метаболитния състав и антиоксидантна

активност на различни видове екстракти от изследваните растения и 2 разглеждат антивирусната и антибактериална активност на изследваните екстракти.

Успешно е въведен *in vitro* тракийски равнец от популацията до с. Маноле чрез използване на семена от *in vivo* растения като изходен материал и без добавяне на растежни хормони към средата в процеса на микроразмножаване, което намалява риска от възникване на соматонално вариране. Проведените молекулярно-генетични изследвания с помощта на ISSR маркери не показват промени в генетичния профил на изследваните локуси след 12 пасажа на *in vitro* култивиране за 3 от изследваните линии, индикирайки ниско ниво на соматонално вариране в резултат на приложената процедура по *in vitro* размножаване. Сравнителният анализ на анатомичното устройство на лист на *in vivo*, *in vitro* култивитани и *ex vitro* адаптирани растения *A. thracica* демонстрират липса на отклонения в органогенезата и хистогенезата на листа, което е от съществено значение за успеха на разработваната методика за *ex-situ* консервация на основата на *in vitro* микроразмножаване. Анализирани са промяна в пигментното съдържание при *in vivo*, *in vitro* и *ex vitro* растения като е отчетено по-ниско съдържание на пигменти в *in vivo* растения спрямо останалите две групи. Подробно са изследвани изменения във фотохимичната активност на ФС1 и ФС2 при *in vivo*, *in vitro* и *ex vitro* растения. Анализ на общото съдържание на фенолни съединения в растенията показва логична връзка с условията им на култивиране с 2.5 пъти по-високи нива отчетени в *in vivo* и *ex vitro* растенията спрямо тези в *in vitro* условия. Същата тенденция се наблюдава и при новото на флаваноидите. Отчетените нива на фенолни съединения корелират положително и с анализите на антиоксидантната активност на метанолови сокслетни екстракти.

По отношение на метаболитния анализ на екстракти и етерични масла докторантът подхожда систематично изследвайки до голяма степен всички възможни групи от първични и вторични метаболити с помощта на газова хроматография съчетана с мас-спектрометрия като органични киселини, аминкиселини, захари, фенолни киселини, терпеноиди, алкани, мастни киселини, стероли и др. както и състава на флавоноиди с помощта на течна хроматография съчетана с детектор на основата на диоден арей. При GC-MS анализа на неполярни фракции на хлороформени сокслет екстракти се наблюдават някои разминавания в посочените данни на фиг. 27, таблица 6 и в текста. Например, в текста се посочват 55,25

% идентифицирани съединения за *in vivo* проби, докато от фиг. 27 и таблица 6 се виждат сума от проценти съответно 55.59 % и 49.34 %. По подобен начин се наблюдават разминавания и за пробите *in vitro* и *ex vitro*. При анализа на феноли с HPLC анализ не са представени данните от DAD детектора, които рутинно се използват в процеса на идентификация на съединенията като идентификацията е направена само на основата на времето на задържане. Липсва припокриване на идентифицираните съединения при HS-GC-MS и GC-MS анализа на ацетонови екстракти, което е учудващо предвид факта, че според материали и методи става въпрос за един същи екстракт от изсушен материал и поне част от съединенията би трябвало да са налични и при двата типа анализи. До известна степен в някои от отделните подраздели свързани с метаболитни анализи липсва дискусия на получените резултати свързана със сравнение на получените такива спрямо наличното в литературата. Като забележка бих посочил и коментирането на процентното съдържание определено с мас-детектора като количествено, имайки предвид факта, че мас детекторът има различна чувствителност към различните групи съединения.

Разделът с резултати и обсъждане завършва с анализ на антивирусната и антибактериална активност на изследваните в дисертацията екстракти от *A. thracica* Velen върху съответно човешки херпесен вирус (HSV-1 (F) и бактериални щамове на *Pseudomonas aeruginosa* *Escherichia coli* *Salmonella typhimurium* *Staphylococcus aureus* и *Bacillus subtilis*. Резултатите са добре представени, но липсва дискусия на основа на публикувани от други автори резултати.

В някои случаи се забелязват технически грешки като означение както с кирилица, така и с латиница на определени термини като PS2/ΦC2, *in vivo/in vivo*, *in vitro/in vitro*.

Изводи заключение и приноси

Направените изводи, заключение и приноси следват логично получените резултати. С известни резерви приемам извод 4, в който е споменато, че *in vivo*, *in vitro* и *ex vitro* растенията са генетично идентични при положение, че според материали и методи *in vitro* растенията са получени от семена на *in vivo* растенията. В този смисъл вариране в метаболитния профил между *in vivo* и *in vitro* растение може да се дължи на сегрегиране на алели на гени участващи в синтеза на съответните метаболити.

Списък на научните публикации и участие на научни конференции

Към дисертационния труд са представени две публикации с публикувани резултати от изследванията в една от които докторантът е водещ автор. През периода на разработване на дисертационния труд, докторантът участва активно в редица научни форуми (общо 11 на брой) чрез постерни презентации, публикация от конференция, както и чрез изнасяне на доклад по време на Петата работна среща „Експериментални модели и методи в биомедицинските изследвания”, 7-8 Април, 2014, София.

Използвана литература

Представеният списък с цитирана литература включва общо 213 литературни източника като в редица случаи форматът на представяне не е унифициран.

Автореферат

Авторефератът следва структурата на дисертационния труд като включва основните негови раздели без литературния обзор и материали и методи, които са описани под формата на заглавия на съответните подраздели.

Въпроси към докторанта

1. Доколко създадената *in vitro* и *ex situ* колекция от тракийски равнец е представителна за генетичното и метаболитно разнообразие на популацията край с. Маноле и необходими ли са допълнителни изследвания в тази насока?
2. Известна ли е плоидността на тракийския равнец и доколко важно е да се обърне внимание на евентуални промени в нея в резултат на *in vitro* размножаване?

Заклучение

Дисертационният труд на Мария Рогова представлява задълбочено мултидисциплинарно изследване насочено към *in vitro* размножаването и *ex vitro* консервирането на българския ендемит *Achillea thracica* Velen. Проведените от докторанта изследвания показват успешното овладяване на широк набор методи от различни области на съвременните растителни биотехнологии, включващи работа с растителни тъкани култури, молекулярно-генетични методи на анализ, анализ на анатомията и морфологията

на растенията, определяне на физиологичния им статус, провеждане на различни по своя характер методи на екстракция и тяхната фитохимична характеристика посредством хроматографски методи на анализ, както и анализ на антиоксидантна, антивирусна и антибактериална активност на растителни екстракти. Получените от докторанта резултати, направените изводи и приносите на дисертационния труд демонстрират развитието на Мария Рогова като завършен изследовател способен да провежда самостоятелно мултидисциплинарни научни изследвания. Въпреки направените забележки, считам, че дисертационният труд на Мария Рогова отговаря напълно на изискванията на Закона за присъждане на научни звания и степени в Република България за придобиване на научната и образователна степен „доктор“ в професионално направление 4.3. Биологически науки. Като член на Научното жури давам своята положителна оценка и предлагам на членовете на почитаемото Научно жури да гласуват с „да“ за присъждане на научната и образователна степен „доктор“ на Мария Ангелова Рогова.

17.11.2017 г

Рецензент:

гр. София

/доц. д-р Красимир Русанов/