

СТАНОВИЩЕ

от доц. д-р Марина Станилова,
Институт по биоразнообразие и екосистемни изследвания, БАН
член на научното жури

Относно: дисертационния труд „Сравнително структурно изследване на лист при *in vitro* култивирани лечебни растения от сем. Lamiaceae” на Мирослава Андреева Стефанова, представен за присъждане на образователната и научна степен „Доктор” – професионално направление 4.3. Биологични науки (01.06.03 Ботаника – Анатомия и морфология на растенията).

Темата на дисертационния труд на М. Стефанова е актуална, свързана с контрол на качеството на *in vitro* микроразмножени растения от видовете *Lamium album* L., *Leonurus cardiaca* L. и *Orthosiphon stamineus* Benth. Методът на ускорено *in vitro* микроразмножаване е перспективен за съхранение и мащабно мултиплициране на ценни лечебни растения с ограничен ресурс и селектиран растителен материал с високо съдържание на биологично активни вещества, от интерес за фармацевтичната индустрия. Въпреки безспорните преимущества на растителните биотехнологии в това отношение, приложението им все още е недостатъчно поради неизяснени проблеми, свързани предимно със спад на размножителния коефициент в условията на дългосрочно *in vitro* култивиране, както и със значителни загуби във фазата на *ex vitro* адаптация на получените регенеранти. Изследванията на дисертантката целят изясняване на причините за посочените проблеми, чрез комплексен и сравнителен анализ на структурната организация на листа на тъканно, клетъчно и субклетъчно ниво при три вида лечебни растения от сем. Lamiaceae, при които аклиматизацията на *in vitro* растенията все още не е постигната. В центъра на изследването е изясняване влиянието на съдържащите се в хранителната среда растежни регулатори върху структурата и функцията на листа като основен фотосинтетичен орган.

Дисертантката познава отлично литературата по темата, цитирани са много изследвания, предимно от последните години: общо 172 литературни източника, от които само 7 на български език. Добре е обоснована необходимостта от прилагане на структурния подход за оценка на фотосинтетичния апарат и свързания с него регенерационен потенциал на растенията в условия на *in vitro* култивиране, вземайки предвид влиянието на добавените в хранителната среда растежни регулатори, които от една страна водят до повишаване ефективността на *in vitro* размножаването, но от друга страна причиняват съществени структурни и функционални промени в листа.

Експерименталната работа се отличава с коректно планиране на опитите, мащабност и статистическа обработка на данните. За анализ са избрани *in vitro* размножени растения от трите изследвани вида, култивирани при еднакви външни условия и няколко варианта хранителни среди, съдържащи растежните регулатори БА и ИМК поотделно и в комбинация, което позволява коректно сравняване на резултатите, получени за трите вида. Използваните методи са съвременни и адекватни на поставените цели: светлинна и трансмисионна електронна микроскопия (ТЕМ).

Дисертационният труд е много добре структуриран и богато илюстриран със снимков материал с високо качество: 94 светлинномикроскопски и 27 електронномикроскопски снимки, подредени в 24 табла. Резултатите са представени в отделни раздели за всеки изследван вид, представящи последователно: анатомичното устройство на нормален лист и на лист на *in vitro* размножени растения на основна хранителна среда MS (контрола) и на среди, обогатени с ниски концентрации на растежните регулатори БА и ИМК поотделно и в комбинация (опитни варианти); морфометрични данни за фотосинтезиращите и епидермалните тъкани на листа и коефициент на палисадност в контролата и вариантите, обобщени в таблици; ултраструктура на хлоропластите в контролата и вариантите. Следва обсъждане на резултатите и синтезирани изводи за вида от анатомичното и ултраструктурното изследване. В последния раздел е направен сравнителен анализ на влиянието на БА и ИМК върху структурната организация на листа при *in vitro* култивирани растения от трите целеви вида. Общо за трите вида е, че на основна MS среда формират листа с устойчива и независеща от *in vitro* условията структура с типичните за бифациален лист характеристики и успешно регенерират клетъчни компартменти. Отбелязаните специфични особености при изследваните три вида, култивирани в присъствие на БА и ИМК, са свързани с дебелината на листната петура, структурата на асимилационния паренхим, устичната гъстота и степента на деструкция на хлоропластите, което доказва необходимостта от комплексно структурно изследване на *in vitro* растенията с цел оптимизиране на условията за *in vitro* култивиране и *ex vitro* адаптация на всеки вид.

Приносителите на дисертационния труд са с оригинален и с потвърдителен характер. За пръв път е осъществено комплексно структурно изследване на лист при *in vitro* растения от *Lamium album* L., *Leonurus cardiaca* L. и *Orthosiphon stamineus* Benth. (сем. *Lamiaceae*), култивирани на основна среда MS и на среди, обогатени с растежните регулатори БА и ИМК поотделно и в комбинация, като е определено влиянието на растежните регулатори върху хистогенезата на епидермалните тъкани и

асимилационния парехним и върху формирането на пластидния апарат. Потвърдено е, че БА и ИМК контролират структурирането на палисадния паренхим, устичната гъстота и организацията на мембранния компартмент при хлоропластите. Доказано е специфичното влияние на БА и ИМК върху хистогенезата на листа и структурирането на пластидния апарат, в зависимост от растителния вид.

Разработката се отличава както с научна стойност, така и с приложимост на получените резултати в практиката. Вземайки предвид съществените структурни промени в листа под влияние дори на ниски концентрации растежни регулатори при *in vitro* култивиране, биотехнолозите биха стигнали до повишаване ефективността на цялостния метод за *in vitro* микроразмножаване, особено при продължително мултиплициране, както и във фазата на *ex vitro* адаптация, която е от ключово значение при много видове. В същото време може да се направи препоръка към дисертантката да разшири изследването като вземе под внимание необходимостта от включване на растежни регулатори в средата не само от гледна точка на структурната организация, а също и като способ за ускорено мултиплициране на растенията, което е и смисълът на използването им. Прилагането на растежни регулатори в средата за кратък период е оправдано от гледна точка на многократно повишения размножителен коефициент, но те следва да бъдат отстранени преди *ex vitro* адаптацията или заменени с други, по-подходящи в тази фаза, а приложението им при дългосрочно култивиране непременно да бъде съпътствано с комплексен структурен анализ. Съвместната работа с биотехнолози би била от изключителна полза за успеха на метода ускорено *in vitro* микроразмножаване.

В заключение, считам, че дисертационният труд отговаря на всички изисквания, отличава се със задълбочени и коректни изследвания, показва високата професионалност на дисертантката и има научна и приложна стойност, поради което препоръчвам на членовете на уважаемото научно жури да оценят по достойнство и да присъдят на Мирослава Андреева Стефанова образователната и научна степен „Доктор” в научно направление 4.3. Биологични науки (01.06.03 Ботаника – Анатомия и морфология на растенията).

София, 20.06.2013г.

Доц. д-р М. Станилова