

РЕЦЕНЗИЯ

от проф. д-р Евгени Ананиев, Катедра „Физиология на растенията”,

Биологически факултет при СУ „Св. Кл. Охридски”,

на дисертационен труд на тема: „ **IN VITRO РАЗМНОЖАВАНЕ НА ПРЕДСТАВИТЕЛИ ОТ РОД *ARTEMISIA*: ВЪЗМОЖНОСТ ЗА ОПАЗВАНЕ НА РЕДКИ, ЗАСТРАШЕНИ И ЗАЩИТЕНИ ВИДОВЕ ЛЕЧЕБНИ РАСТЕНИЯ ОТ БЪЛГАРСКАТА ФЛОРА**”

Автор на дисертационния труд: **Любов Георгиева Христова**, Катедра «Физиология на растенията», Биологически факултет, СУ «Св. Климент Охридски»

Предмет на представения труд се явява микроразмножаването в условия *in vitro* на 4 застрашени вида български пелин (*Artemisia chamaemelifolia* Vill., *A. lerchiana* Stechm., *A. pedemontana* Balbis. и *A. eriantha* Ten.). Тези растения, както и много видове от този богат род, са много широко застъпени в народната медицина. Напоследък техните етерични масла се използват в козметичната и парфюмерийна индустрия, а от хилядолетия - във виноделието и спиртопроизводството. През последните десетилетия опазването на застрашени от изчезване диви растения е сериозен световен проблем. Един от успешните съвременни подходи с цел тяхното опазване се явява метода на тъканните култури в условия *in vitro*. При този биотехнологичен метод се постига многократно размножаване, последвано от успешно съхранение и възможна повторна интродукция в природата. **Като се има предвид от една страна, че спрямо посочените видове *Artemisia* досега не е прилаган метода на *in vitro* културите, а от друга, че най-важните техни биологично активни вещества не са сравнени по линията на последователните етапи на *in vivo*, *in vitro* и *ex vitro* култивиране, поставената основна цел и конкретните експериментални задачи на настоящия дисертационен труд са актуални и напълно оправдани като разход на труд и финансови средства**

Дисертационния труд съдържа 150 страници, разпределени в традиционните за този тип труд раздели. Увод /2 стр./, Литературен обзор /31 стр./, Методи и материали /14 стр./, Резултати и обсъждане /43 стр./, Заключение /1 стр./ и

Литература /16 стр./. За съжаление липсва номерация на цитираните трудове - те би трябвало да са в порядъка на 350, от които 7 източника на кирилица.

В литературния обзор се прави много обстоен преглед на географското разпространение и видовата характеристика на изследваните видове пелин, на тяхното фармацевтично и икономическо значение. На фона на задълбочения анализ на биологично активните съставки на 4-вида пелин /вкл. 10 формули на най-важните феноли, флавоноиди и гликозиди/, представените свърхподробни морфологични описания на растенията и по-специално органите на цвета /кошнички, хрущялни осилчета, цветни легла, обвивни листчета, плодосемки, хвърчилки и т.н. и т. н./, считам че не са били необходими в такава степен, като се има предвид, че основната работа *in vivo* и *in vitro* е проведена с фрагменти от стъбла или цели регенеранти, а не с отделни органи на цвета /с изключение на общия HPLC анализ на цели цветове/. Разбира се, както трябва да се очаква, най-сериозно внимание се обръща на процеса на микроразмножаване във всички негови аспекти /избор на експланти, стерилизация, калуси, хранителни среди и растежни хормони/.

Като пряко продължение на литературния обзор, главата «Материали и методи» представя в подробности избора на изходния растителен материал /семена или свежи растителни експланти от интактни растения, събрани от техните местобитания/, и използваните методи за работа и анализ. Най-общо методите могат да се разделят на 2 части – методи на *in vitro* културите и аналитични методи за анализ.

От класическите методи на микроразмножаването прави впечатление т.н. *ex vitro* адаптацията на *in vitro* получените регенеранти. За този изключително важен етап е използвана адаптация при различни контролирани /адаптация в оранжерия и в растежна камера/ и неконтролирани условия /адаптация на опитно поле сред природата/. **Успешната адаптация и развитие на регенерантите в нестерилни лабораторни условия и особено при полски условия се явява един от сериозните методични приноси на дисертационния труд.**

В групата на аналитичните методи, наред с класическите физиологични и биохимични методи /екстракция, анализ на феноли, флавоноиди и кверцетинови

гликозиди, определяне на антиоксидантна активност/, **особено важно значение имат газ-хроматографския и мас-спектроскопски анализ на компонентите на етерично-маслената фракция на *in vivo*, *in vitro* и *ex vitro* получените растения от *Artemisia chamaemelifolia*. Това е един точен количествен метод за оценка на вторични биологични продукти с практическо значение.** Тези важни изследвания са проведени в Лабораторията по приложни биотехнологии в Пловдив, ИМ при БАН, и изказаната благодарност на този колектив сред всичките 20 броя адресати не е само проява на добро възпитание и куртоазия.

Разделът „Резултати и обсъждане” представя основните резултати, включени в 11 таблици, 30 фигури и 11 цветни фотографии. В допълнение са представени и 23 оригинални хроматограми от HPLC анализ на фенолни киселини, флавоноиди и кверцетинови гликозиди. Въпреки, че видът *A. chamaemelifolia* не е въвеждан в *in vitro* условия, прекалено голямо място е отделено на ролята на цитокинините /БАП/ и ауксините /НОК/ за инициране и развитието на *in vitro* култури. В този контекст, дисбалансът между 9 фигури и 5 таблици от една страна и един извод /извод №3/ от друга показва, че резултатите за БАП са основно потвърдителни. Далеч по-съществени са резултатите по осъществяване на адаптацията *ex vitro* на *in vivo* и основно на *in vitro* култивираните растения от р. *Artemisia*. А пропо, прави добро впечатление, че дисертантката много надлежно и безпристрастно отразява реално получените резултати заедно с точния брой неуспешни /загинали/ растения и успешно адаптираните растения *ex vitro*. Резултатите показват /Фиг. 17 от Дисертацията/, че с изключение на оранжерийните условия, при *A. chamaemelifolia* се наблюдава много висок процент на адаптация *ex vitro* в условията на растежна камера, фитотрон и опитно поле /съответно 90, 80 и 80%/. За разлика от добрите резултати с *A. chamaemelifolia*, при другите два изследвани вида *A. lerchiana* и *A. pedemontana* този процент е много нисък /средно 10% при всички условия за *A. lerchiana*, като при *A. pedemontana* този процент пада и до 5% в случая с адаптацията в опитно поле. В контекста на споменатата успешната масова адаптация *ex vitro* на *A. chamaemelifolia* /средно 85%/, особен интерес буди практически много слабата адаптация в условия *in vivo* /само 10%/ /Фиг. 17/. Тези важни резултати водят и до някои конкретни въпроси:

1. На какво може да се дължи по-ниската степен на адаптация на *A. lerchiana* и *A. pedemontana* в *ex vitro* условия.
2. Как може да се обясни слабата адаптация на интактни растения *A. chamaemelifolia* пренесени от естествените местообитания от Понор планина в условията *in vivo* на опитното поле на с. Горни Лозен
3. Като следствие от т. 2, как да се обясни противоречието между резултата от графиката на Фиг. 17 /10% адаптация на *A. chamaemelifolia in vivo*/ и описанието на същия резултат в текста /средата на стр. 69 от Дисертацията/, цит. „ По отношение на *in vivo* адаптацията на *A. chamaemelifolia*, всичките 10 растения /100%/ от 10 индивидуални донорни туфи от естественото местобитание на вида в Понор планина са адаптирани успешно и се развиват без проблем в условията на с. Лозен“, край на цитата.

Или с други думи, кой резултат е верен за *A. chamaemelifolia* – този от Фиг. 17 или описанието му в текста на стр. 69. И като продължение в този смисъл - в настоящия си вид извод №4 е неясен и се нуждае от конкретизация и прередактиране. Кои са 100% оцелелите растения отчетени за 2 години с наблюдаван цъфтеж – *ex vitro* адаптираните растения или тези пренесени от естествените находища? Получените семена след цъфтеж и опрашване на *ex vitro* адаптираните растения фертилни ли са и могат ли да дадат ново поколение?

Един голям раздел на дисертацията касае резултатите по определяне съдържанието на основните вторични метаболити с медицинско значение – феноли и флавоноиди. Установено е 7 пъти по-висока съдържание на феноли в по-силно полярния разтворител метанол, отколкото в хлороформения екстракт в условия *in vivo* и възстановяване на това съдържание *ex vitro* след първоначално силно намаление *in vitro* /Фиг. 24/.

Сред множеството получени резултати могат да се отбележат няколко с много ясно изразено приносно значение:

- 1. За първи път е осъществен пълен цикъл на микроразмножаване при три вида от р. *Artemisia* (*A. chamaemelifolia*, *A. lerchiana* и *A. pedemontana*) като получените *in vitro* растения са успешно адаптирани отново *ex vitro* в лабораторни условия и при полски условия.**
- 2. В течение на продължителен период от 2 години висок процент от *ex vitro* растенията /средно 70% за трите вида/ се развиват нормално и достигат фаза на цъфтеж.**
- 3. Осъществена е количествена характеристика на основните вторични метаболити и антиоксидантната им активност на растения *A. chamaemelifolia* в *in vivo*, *in vitro* и *ex vitro* условия.**

Основните резултати по темата на дисертационния труд са публикувани в 4 публикации. От тях 2 са в сборници от международни конференции в България, 1 в сп. *Bulg. J. Agric. Sci.*, с IF 1.14. Една публикация, касаеща *A. lerchiana* и *A. pedemontana* от Черноморското крайбрежие на България е публикувана в Сборник трудове от международна конференция по средиземноморски морска биология в Тирана, Албания. Петата представена публикация не е по темата на дисертацията и има за предмет *Euphrasia officinalis*.

Забелязан е и един цитат от чуждестранни учени (*J Plant Sci Res*, 2013) на статията в *Bulg. J. Agric. Sci.*

Научната продукция на Л. Христова е широко апробирана в 8 международни участия като постерни съобщения. От тях 2 са „Климентови Дни“, 2012 и 2013 г., 2 са в Международна Научна Конференция на Съюза на учените в Стара Загора, 2012 и 2013 г. и по една в Черна Гора, Суботица (Сърбия) и Франция (Tour de Valat, Arles).

Научните изследвания на дисертационния труд са финансирани и от участието в 2 научни проекта от Фонд НИ при СУ за 2012 и 2013 г.

Заклучение: Представеният дисертационен труд третира важен проблем на ентоботаниката. Представени са резултати от *in vitro* размножени и интрадуцирани в естествени полски условия растения от р. *Artemisia*. Сам по себе си този резултат е достатъчен сериозен за успешна защита като дисертационен труд. В допълнение са получени и ценни практически резултати за баланса на основните биологични активни вещества главно феноли и кверцитинови гликозиди при процеса на микроразмножаване и повторна интродукция в природни условия. Запазването на тези вещества в количествен и качествен аспект би имало приложение в бъдеще с цел тяхното по-ефтино получаване и използване в практиката. **Всичко това ми дава основание да препоръчам на членовете на уважаваното Научно жури да оцени високо дисертационния труд на редовен докторант Любов Георгиева Христова и да гласува с „ДА” за присъжданената ѝ на образователната и научна степен „ДОКТОР” по направление 4.3 Биологични науки (Физиология на растенията – *in vitro* култивиране на лечебни растения).**

София, 20.07. 2014 г.

Изготвил рецензията:

/проф. Е. Ананиев/