

## РЕЦЕНЗИЯ

върху дисертационен труд за придобиване на образователната и научна степен “Доктор”

**Тема на дисертационния труд:** “*In vitro* размножаване на представители на род *Artemisia*: възможност за опазване на редки, застрашени и защитени видове лечебни растения от Българската флора”

**Автор на дисертационния труд:** Любов Георгиева Христова, редовен докторант в катедра „Физиология на растенията” на Биологически факултет при СУ „Св. Климент Охридски”

**Рецензент:** доц. д-р Марина Иванова Станилова, Институт по биоразнообразие и екосистемни изследвания, БАН

### Обща характеристика на дисертационния труд, обем и структура

Представеният ми за рецензиране дисертационен труд е разработен по професионално направление 4.3. „Биологически науки” (Физиология на растенията – *in vitro* култивиране на лечебни растения). Темата на дисертационния труд на Любов Христова е актуална и уместна в контекста на постоянно повишаващия се обществен интерес у нас и в чужбина към лечебните растения и традиционното им използване в народната медицина, от една страна, и необходимостта от опазване на много от растителните видове с лечебни свойства, които са редки и застрашени вследствие на различни неблагоприятни фактори, в това число и антропогенни, от друга страна.

Проучването е задълбочено и напълно отговаря на заглавието, като дисертантката не само представя успешното прилагане на метода *in vitro* размножаване при няколко редки вида пелин с произход от български популации, в неговата цялост – до аклиматизация на регенерантите, но също така доказва и запазването на лечебните свойства на размножените по този метод растения, като проследява биосинтетичната им активност в условия *in vitro* и след *ex vitro* адаптацията и аклиматизацията им на открито и я сравнява с тази на нативните растения, събрани от тези популации.

Дисертационният труд напълно отговаря на изискванията за обем и структура, с добре оформена заглавна страница и детайлно съдържание. Застъпени са всички основни раздели (увод, литературен обзор, цел и задачи, материали и методи, резултати и обсъждане, заключение, изводи, справка за приносите на дисертацията, цитирана литература), както и допълнителни раздели (благодарности, използвани съкращения, приложения). Научните публикации на дисертантката по темата, както и участията ѝ в научни форуми и в изследователски проекти, свързани с темата на разработката, са посочени в отделни списъци преди цитираната литература; там е приложена и декларацията за оригиналност на резултатите. Цитираните литературни източници са 392,

от които 385 на английски език, 6 на български и 1 на руски език, като преобладават издания от последните 15 години. Дисертационният труд съдържа 15 таблици (от които 2 в Материали и методи, 12 в Резултати и обсъждане и 1 в Приложението) и е богато онагледен с фигури и фотографии: 65 фигури (от които 10 в Литературния обзор, 1 в Материали и методи, 30 в Резултати и обсъждане и 24 в Приложението) и 12 табла с общо 45 цветни фотографии, изнесени в Приложението, илюстриращи получените резултати. В Приложението са допълнени подробни данни от сравнителното фитохимично изследване на проби от *in vivo*, *in vitro* и *ex vitro* растения от *A. chamaemelifolia* (таблица за съдържанието на етеричните масла и 24 хроматограми от HPLC анализ на фенолни киселини, флавоноиди и кверцетинови гликозиди в лиофилизиран материал). Целият дисертационен труд съдържа 151 страници, като основните раздели са добре балансирани и заемат 106 страници, от които 30 страници се падат на Литературния обзор. Авторефератът също отговаря на изискванията за обем и структура, написан е на 44 страници, отразява ясно и коректно целта и задачите, основните резултати, онагледени с 19 фигури, 3 таблици и 12 табла с цветни фотографии, както и изводите и научните приноси на дисертационния труд.

#### Литературна осведоменост и теоретична подготовка на кандидата

Уводът е стегнат и насочва вниманието към разглеждания проблем, като конкретизира обектите на изследване, набелязва очакваните преимущества при прилагане метода на *in vitro* размножаване, ясно посочва обхвата на планираните проучвания и ги разграничава от знанията, известни до момента от литературните източници. Отличното познаване на състоянието на проблема от дисертантката е отразено в изчерпателния литературен обзор, който обобщава информацията от справочната литература, свързаните с темата нормативни документи и научните изследвания, публикувани от български и чужди автори през последните 20 години.

Обект на изследване са четири вида от род *Artemisia* (семейство Asteraceae), които са под закрилата на Закона за биологичното разнообразие (2002), като три от тях са включени в Червената книга на Република България: *Artemisia chamaemelifolia* Vill. със статут „критично застрашен”, *Artemisia eriantha* Ten. (Европейски ендемит) и *Artemisia lerchiana* Weber – със статут „застрашен”, а видът *Artemisia pedemontana* Balbis. е под защитата и на Закона за лечебните растения на Република България (2000), с ограничителен режим на ползване. Посочени са заплахите за тези видове, свързани както с негативното антропогенно влияние: стопанска дейност и туризъм, така и с факта, че са привързани към местообитания със специфични условия, популациите им са малки и изолирани, с ниски възобновителни способности.

Направен е обзор на терапевтичното приложение на различни растителни видове от род *Artemisia*, основаващо се на многобройни химични и фармакологични изследвания при лечение на сериозни заболявания като малария, хепатит, различни видове рак, възпаления и инфекции, причинени от бактерии, вируси и гъби; отразено е и приложението им в козметичната и парфюмерийната индустрия, както и в хранително-вкусовата за овкусяване и ароматизиране на алкохолни напитки. Дисертантката показва добро познаване на мерките, които се предприемат за *in situ* и *ex situ* опазване на редки и застрашени растителни видове, в т.ч. и създаване на *in vitro* колекции, *in vitro* съхранение чрез бавнорастящи култури, бързо получаване на голям брой нови растения чрез прилагане техниките на *in vitro* микроразмножаване и успешна *ex vitro* адаптация. В същото време изяснява, че *in vitro* изследванията при род *Artemisia* до момента касаят малък брой видове, като само един от целевите видове на дисертационния труд е въвеждан в *in vitro* култура, но с произход от италианска популация.

Изследването на вторичните метаболити на растения от различни естествени находища е много важно поради наличието на хемотипове, установено при някои видове от род *Artemisia*, вкл. и при *A. lerchiana*. Различията в спектъра и съдържанието на вторичните метаболити в растения от различни популации на един и същ вид могат да се окажат от важно значение за приложимостта на екстрактите в терапевтиката, козметиката и хранително-вкусовата промишленост. В тази връзка, изследването на вторичните метаболити в българските популации на четирите вида – обекти на дисертационния труд, определено представлява научен интерес, като е възможно резултатите да имат и научно-приложно значение, в съчетание с ускорено вегетативно *in vitro* размножаване на ценните генотипи. Съдържанието на фенолни киселини като ферулова, хлорогенова, синапена, както и на някои флавоноиди и кверцетинови гликозиди, е от решаващо значение за антиоксидантното, антимикуробно, противовъзпалително и противораково действие на екстрактите от различните видове пелин. Дисертантката притежава задълбочени теоретични знания и ясна представа за необходимостта от фитохимично изследване на българските популации, наред с експерименталното установяване на подходящ протокол за *in vitro* култивиране, *ex vitro* адаптация и аклиматизация на регенерантите към условията на природната среда.

#### Методичен подход при изследванията

Целта на изследванията в дисертационния труд е да се открият подходящи условия за *ex situ* опазване на четири редки и застрашени вида пелин от български популации: *Artemisia chamaemelifolia*, *A. eriantha*, *A. lerchiana* и *A. pedemontana*. За постигане на поставената цел са формулирани и разработени две групи задачи, свързани съответно с

прилагане на биотехнологични методи за *ex situ* опазване на видовете и със сравнителна оценка на съдържанието на вторични метаболити в растения от естествените популации, в *in vitro* култивирани и *ex vitro* адаптирани растения. Първата група задачи включва инициране на *in vitro* култури от семена и/или стъблени експланти от четирите вида, *ex vitro* адаптация и аклиматизация на растения от тях, създаване на *in vitro* колекция от продължително поддържани органи култури от изследваните видове и ускоряване на размножаването при *A. chamaemelifolia* като моделен вид, чрез включване в хранителната среда на оптимално количество от цитокинина бензиладенин. Втората група задачи е отнесена само към моделния вид *A. chamaemelifolia* и включва определяне на съдържанието на феноли и флавоноиди чрез спектрофотометрични и хроматографски методи, изследване на антиоксидантната активност на екстрактите и търсене на корелация с количеството на фенолните съединения в тях, определяне състава на етерично-маслената фракция и изследване на цитотоксичен и адювантен потенциал на хлороформен екстракт от *in vitro* култивирани растения върху човешки туморни клетъчни линии.

За въвеждане в *in vitro* култури са приложени стандартни методи за обеззаразяване на изходния растителен материал и за стимулиране кълняемостта на семената; поддържането на дългосрочни култури е осъществено чрез периодично субкултивиране на основна агарова хранителна среда MS, с витамини по MS или по Gamborg B5; за ускорено микроразмножаване е изследвано влиянието на цитокинина бензиладенин, приложен самостоятелно в хранителната среда в 10 различни концентрации (от 0,1 до 1,0 mg/L), като оценката е извършена чрез отчитане на растежа, размножителния коефициент, образуване на множествени прорастъци, калусогенеза, растежен индекс, коренообразуване, съдържание на сухото вещество, наличие на нежелани ефекти като витрификация и/или некроза. Култивирането е извършвано при стандартни условия на осветеност, фотопериод и температура (16 часа луминесцентна светлина на денонощие,  $23 \pm 1^\circ\text{C}$ ), във вентилирани стъклени съдове, при прехвърляне на свежа среда през 4 седмици. Експериментите по *ex vitro* адаптация са извършени директно в оранжерия, както и в два типа растежна камера с постепенно намаляване на влажността, поддържащи различна степен на контрол на основните параметри: температура, влажност, осветление и вентилация, с последващи етапи в оранжерия или фитотронно помещение; аклиматизацията на открито е проведена на опитно поле през пролетта.

Впечатляващ е броят на усвоените аналитични методи. За анализ на вторичните метаболити са използвани прецизни хроматографски методи: флавоноиди, фенолни киселини и кверцетинови гликозиди са определени с високо-ефективна течна хроматография (HPLC), след предварително лиофилизиране на пробите; терпеноидното

съдържание е анализирано чрез газ хроматография, съчетана с маспектрометрия (GC-MS), след получаване на етерично-маслената фракция чрез водна дестилация в апарат тип Clevenger. Антиоксидантната и антитуморната активност са изследвани в растителни метанолови или хлороформени Soxhlet екстракти, по метод за определяне на нивото на липидна пероксидация, DPPH радикалов метод и ABTS радикалов метод; акумулацията на активни кислородни форми е наблюдавана на флуоресцентен микроскоп. Определено е съдържанието на пластидните пигменти в *in vitro* култури, отглеждани на хранителни среди с различна концентрация на ВАР. Статистическата обработка на данните включва ANOVA анализ, t-тест, корелационен анализ и др.

#### Значимост и убедителност на резултатите, интерпретациите и изводите

Дисертантката успешно е изпълнила планираните задачи и е постигнала поставената цел. Четирите целеви вида от род *Artemisia* са въведени в *in vitro* култури от семена, а *A. lerchiana* – и от стъблени експланти, отбелязани са различия в кълняемостта на семената при отделните видове; размножени са нормални растения чрез субкултивиране, като е определен подходящ състав на основните компоненти в хранителните среди чрез съпоставяне опита на чужди автори с резултатите от собствените експерименти, отбелязани са различия в изискванията на отделните видове към витамините. При *A. chamaemelifolia* ефективността на микроразмножаването е повишена чрез определяне на оптималната концентрация на растежния регулатор ВАР в средата. Резултатите са представени графично по подходящ начин и са убедително онагледени с качествени цветни снимки, а интерпретацията им показва добра теоретична подготовка. Доказано е решаващото значение на прецизния контрол на факторите на околната среда (влажност, температура, осветление) за успеха на метода в етапа *ex vitro* адаптация и аклиматизация на растенията към природните условия. Създадена е *ex situ* колекция на открито от *A. chamaemelifolia*, *A. lerchiana* и *A. pedemontana*, чието съществуване е предпоставка за опазването им *ex situ* и *in situ*, както и за бъдещо използване на растенията в случай, че се установят ценни лечебни свойства на тези български произходи. Значима е също и създадената *in vitro* бавнорастяща колекция. Получените калусови култури са добър бъдещ старт за изследване на *in vitro* биосинтеза на вторичните метаболити в суспендиална култура, предвид отбелязаните различия в спектъра и съдържанието им между *in vitro* и нативните растения; някои компоненти, напр. ценната синапена киселина, е със значително по-високо съдържание в метанолните екстракти от *in vitro* проби в сравнение с това в *in vivo* и *ex vitro* пробите. Направените изводи са ясно формулирани, конкретни и дават отговор на поставените задачи, като показват способността на дисертантката да интерпретира и обобщава получените резултати.

### Критични бележки и въпроси към дисертационния труд

При разработката на дисертационния труд са допуснати и някои пропуски или неточности, които следва да бъдат взети под внимание при по-нататъшната работа на дисертантката, за да се избегнат обърквания, напр. неправилно е използван терминът „произход“ за означаване типа на пробите: от нативни растения, *in vitro* култури или *ex vitro* адаптирани растения, които всъщност произхождат от една и съща популация; процентът на сухото вещество е означен като „добив“; стойностите на свежото и сухото тегло в Табл. 5 са представени в грамове, а в анкетката са отбелязани като милиграми; при представяне на данните на Фиг. 13 не е обосновано изключването на повторенията, при които няма развитие на нови стъбла. Допуснати са и някои технически грешки и пропуски, напр. в раздела Материали и методи е вмъкната таблица без номер, на която са отбелязани само изходните стойности на влажността в растежната камера в ИБЕИ, като е пропуснат важния факт, че тя постепенно се намалява с около 30% в продължение на 4 седмици; осветлението в другата растежна камера вместо в мерни единици е дадено като % от максималното възможно, което е неясно; Литературния обзор неправилно е отбелязано, че *A. lerchiana* не е защитен от ЗБР, въпреки че в Увода тази информация е дадена вярно; има дублиране в номерацията на Снимка 10 в Дисертацията и на Снимка 9 в Автореферата, по-удачно е да се отбележат като Табла, понеже всяко е съставено от по 2 до 8 снимки.

Имам и някои въпроси към дисертантката: 1) Защо *in vitro* колекцията от бавнорастящи култури на четирите вида пелин не се отглежда при по-ниска температура, след като в литературния обзор е отбелязано значението ѝ? 2) Как си обяснява големите различия в успеха на *ex vitro* адаптацията (Фиг. 17), и по-специално между: а) отделните видове, поставени в еднакви оранжерийни условия; б) в рамките на всеки отделен вид, различията между резултатите в оранжерията и в съответната използвана растежна камера? 3) Защо не са изследвани етил-ацетатни екстракти от *A. chamaemelifolia*, след като в Литературния обзор е цитиран източник, според който при 10 вида пелин те имат по-висока антиоксидантна активност в сравнение с метаноловите (стр. 34)?

### Характер на научните приноси и стойност за науката и/или обществото

Напълно приемам справката за научните приноси на дисертационния труд. Прави впечатление, че всички посочени научни приноси са с оригинален характер. За първи път са инициирани *in vitro* култури и са разработени протоколи за микроразмножаване на четирите вида пелин, като при три от тях: *A. chamaemelifolia*, *A. lerchiana* и *A. pedemontana*, е завършен пълният цикъл на микроразмножаване и е създадена *ex situ* колекция при полски условия, наброяваща няколко десетки индивида; двугодишните са

преминали успешно и фаза цъфтеж. Създадена е и *in vitro* колекция от четирите застрашени вида пелин, която се поддържа като бавнорастящи култури. Направени са сравнителни проучвания на съдържанието на вторични метаболити и антиоксидантната активност на *in vivo*, *in vitro* и *ex vitro* растения от български произход на *A. chamaemelifolia*. Установена е висока цитотоксична активност на хлороформен екстракт от *in vitro* култивирана *A. chamaemelifolia* върху клетъчни линии Hela, A549 и HepG2.

Приносите се основават на резултати с научно и научно-приложно значение. Те имат екологична и обществена стойност, свързани са с опазване на растителното биоразнообразие и носят потенциал както за *ex situ* опазване на изследваните застрашени видове пелин и за подсилване на естествените им популации в България, така и за използването им като лечебни растения в борбата с редица сериозни заболявания, при положение, че бъдат култивирани.

Качество на научните трудове, отразяващи изследванията по дисертацията и способности за самостоятелни научни изследвания

Във връзка с дисертационния труд, в периода 2012-2013 г. са публикувани 5 научни статии, в 4 от които Любов Христова е първи автор. Една от публикациите, на която дисертантката е първи и кореспондиращ автор, е отпечатана през 2013 г. в международно специализирано научно списание: Bulg J of Agric Sci 2013; 19(2):57-60 (ISSN 1310-0351), реферирано и с IF 0,136 за 2013г., с вече отбелязан един цитат в специализираното академично списание J of Plant Sci Research, 2013, 29(2):235-239. Останалите публикации са в сборници от международни научни конференции, проведени в Тирана (Албания, 2012г.), Стара Загора (2012 и 2013 г.) и София (2012 г.).

Докторантката е участвала активно в 9 научни конференции през периода 2011 – 2013 г., от които 8 международни, проведени в Черна гора, Кипър, Сърбия, Франция, София и Стара Загора. Едно от участията е с доклад, а останалите – с постер, като на Климентовите дни по случай 125 години от създаването на СУ и 50 години от Биологически факултет (2013 г.) постерът ѝ е отличен с Първа награда.

Всичко това, както и личното ми запознаване с публикациите, ми дава основание да дам висока оценка на качеството на научните трудове, отрязяващи изследванията по дисертацията, както и за успешното представяне на резултатите на научни форуми.

Разработката на дисертационния труд е свързана и с участието на Любов Христова в два научни проекта, финансирани от НФ „Научни изследвания”, с обект на изследване *A. chamaemelifolia*. По-голямата част от изследванията по дисертацията са нейно лично дело, извършени в катедра „Физиология на растенията” при Биологически факултет на СУ „Св. Кл. Охридски”, под вещото ръководство на научния ѝ ръководител проф. д-р В. Капчина-

Тотева, като отделни изследвания са проведени от дисертантката във външни за БФ лаборатории с ползване на тяхната материална база: в Агробиоинститута при ССА, Лабораторията по приложни биотехнологии в Пловдив, при ИМ-БАН, Фитотрона на Биотехнологичната лаборатория за лечебни растения при ИБЕИ-БАН, със съдействието на учени, на които тя е засвидетелствала уважение в раздела с благодарности. Единствено строго специализираните хроматографски анализи са извършени от съответните компетентни специалисти, а изследването на антитуморните свойства на получените от нея екстракти от *A. chamaemelifolia* са свързани с разработка на дипломна работа в БФ, катедра „Цитология, хистология и ембриология”, но интерпретацията на резултатите е изцяло дело на дисертантката.

Темата на дисертационния труд потвърждава трайния интерес на Любов Христова към растителните биотехнологии и свойствата на лечебните растения: тя завършва природо-математическа гимназия в Кюстендил, след което в БФ на СУ придобива степените бакалавър по специалност Биотехнологии (1999 г.) и магистър по Растителни биотехнологии (2003 г.), с дипломна работа върху повлияване биосинтеза на алкалоида галантамин в *in vitro* култури от лечебния растителен вид блатно кокиче, разработена в Биотехнологичната лаборатория за лечебни растения на Института по ботаника, БАН. От 2003г. до 2008г. работи в в ИН-БАН в областта на Лекарствена токсикология, като извън темата на дисертацията участва в още 2 научни проекта, представя постер в IV Балкански конгрес по ботаника през 2006г. и има 3 публикации, една от които с импакт фактор, все в областта на биотехнологиите и *ex situ* опазване на редки и лечебни растения.

**В заключение**, дисертационният труд отговаря на всички изисквания. Изследванията са целенасочени и увенчани с успех, обемът на извършената работа е впечатляващ. Резултатите са коректно представени и богато илюстрирани, интерпретацията им е ясна и адекватна, изказът е ясен. Формулираните изводи са убедителни и значими. Всички приноси са с оригинален характер и имат както научна, така и научно-приложна стойност. Препоръчвам на членовете на почитаемото научно жури да оценят труда по достойнство и да присъдят на Любов Георгиева Христова образователната и научна степен „Доктор” по научно направление 4.3. Биологични науки (Физиология на растенията – *in vitro* култивиране на лечебни растения).

София, 20.07.2014 г.

Подпис: .....  
(доц. д-р М. Станилова)