

РЕЦЕНЗИЯ

върху дисертационен труд за придобиване на образователната и научна степен
„доктор”

Автор на дисертационния труд: Мария Иванова Петрова, главен асистент в
Института по физиология на растенията и генетика, БАН

Тема на дисертационния труд: Биотехнологични подходи за размножаване,
съхраняване и получаване на биомаса от hairy roots при *Arnica montana* L.

Рецензент: Аглика Минева Едрева, доктор на науките, професор в ИФРГ, БАН

1. Дисертационният труд е написан общо на 151 страници, като обхваща увод (2 страници), литературен обзор (22 страници), цел и задачи (1 страница), материали и методи (17 страници), резултати, обсъждане и заключение (66 страници), изводи и приноси (3 страници) и литературен списък от 392 заглавия. Представени са 34 таблици и 31 фигури.
2. Разработеният труд се отличава с изключителна актуалност както в научно, така и в научно-приложно отношение. Понастоящем биологично-активните вещества от лечебните растения се използват все по-широко във фармацевтичната и козметична индустрии, като се явяват отлична алтернатива на синтетичните химични продукти. Произтичащият от това риск от унищожаване на естествените находища на лечебните растения налага прилагането на биотехнологични подходи, което се отнася в голяма степен до ценния, но силно застрашен ендемичен за Европа вид *Arnica montana* L., обект на дисертационния труд.
3. Дисертантката познава много добре състоянието на проблема и оценява творчески литературния материал. Това личи от описанието на литературните източници, където ясно са очертани въпросите, за които липсват или има оскъдни сведения. Това е позволило целенасоченото и мотивирано формулиране на целта и конкретните задачи на дисертационния труд, както и обсъждането на

получените резултати в контекста на съвременната информация по изследвания проблем.

4. Методичните подходи, които се използват в дисертационния труд, са напълно адекватни на целта и задачите му. Това се отнася както до методите за *in vitro* култивиране на растенията и тези за генетична трансформация, така и до фитохимичните методи за идентифициране и определяне на вторични метаболити (ядрено-магнитен резонанс, газова хроматография, газова хроматография/масспектрометрия).
5. а) За първи път е създадена цялостна технология за *in vitro* и *in vivo* отглеждане на ценния застрашен вид лечебно растение *A. montana*. Този важен принос се основава на сериозното проучване и установяване на оптималните параметри на различните етапи от отглеждането на растенията: сравнени са три системи за стерилизиране и десет среди за покълване на семената, двадесет и четири среди за микроразмножаване и единадесет среди за вкореняване, три смеси за адаптиране *ex vitro*, и три различни системи за микроразмножаване. За първи път системата TIS (Temporary Immersion System, система за временно потапяне) е използвана успешно за масово микроразмножаване при *A. montana*. Оригинални са и данните за успешна аклиматизация на *in vitro* растения от *A. montana* в планински условия (Беглика, Родопите).
- б) Разработена е за първи път икономически ефективна система за продължително (6 месеца) *in vitro* съхранение и следващо микроразмножаване на *A. montana*, без риск от заразяване на културите и със запазване на жизнеността и високия размножителен коефициент на растенията. За целта са проучени среди, съдържащи различни по вид и концентрация осмотици (захароза, манитол, сорбитол) и растежни регулатори (6-бензил аминокиселина, индолил-3-оцетна киселина, индолил-3-маслена киселина).
- в) На фона на изключително оскъдните данни (две публикации) за индуциране на нетипични корени (hairy roots) и за състава на биологично-активните вещества в тях, съществен принос на дисертантката е получаването на трансгенни нетипични корени на *A. montana* чрез заразяване с *Agrobacterium rhizogenes* щам ATCC 15834. Трансгенната природа на изолираните четири клона е доказана чрез съвременни молекулярни техники (PCR). Селектиран е бързо растящ клон (TP4), подходящ за машабно култивиране в биореактор. Тези

впечатляващи резултати се основават на сравнителното проучване на важни фактори, като начин на заразяване, плътност на инокулума, продължителност на заразяването и на ко-култивирането, концентрация на антибиотика, и на намирането на подходящи среди за развитието на нетипични корени. Чрез модерни методи (газова хроматография/маспектрометрия) за първи път е показано голямото разнообразие от вторични метаболити в „hairy roots” от *A. montana*.

г) Установено е, че листа и цветове от *in vitro* растения от *A. montana*, отгледани по разработения от дисертантката протокол, съдържат сескитерпенови лактони, като концентрациите им в листата са двойно по-големи от съобщените в литературата. *Ex vitro* отгледаните растения са по-бедни на лактони. Количественият и качествен състав на лактоните е определен с надеждни съвременни методи (газова хроматография, ядрено-магнитен резонанс).

6. Научните или научно-приложни приноси на дисертационния труд се заключават преди всичко в получаване и доказване на нови факти, както и в получаване на потвърдителни факти. Към първата категория могат да се отнесат оригиналните приноси, посочени в по-горния раздел, свързани с получаването на висок добив от качествен *in vitro* материал от *A. montana* и аклиматизирането му (5а и 5б) и селектирането на бързо растящ трансгенен клон (TR4) от нетипични корени, богат на вторични метаболити (5в). Потвърдено е докладваното само в пет публикации на други автори присъствие на сескитерпенови лактони в листа и цветове на *in vitro* растения от *A. montana* (5г).
7. Най-важният научен принос на дисертационния труд е разработването на надеждни биотехнологични подходи, чрез които може да се произведе биомаса (листа, цветове, нетипични корени) от ценния лечебен вид *A. montana*, участващ в състава на голям брой (над 270) фармацевтични препарата. Значителният добив на биомаса и високото съдържание на вторични метаболити (включително сескитерпенови лактони), постигнати чрез тези подходи, определят голямата научно-приложна значимост на дисертацията. От особена важност в това отношение са лактоните, съединения със силно противовъзпалително и антитуморно действие, осъществявано чрез инхибиторни взаимодействия с транскрипционни фактори.

8. Приносите в дисертационния труд до голяма степен са лично дело на дисертанта. Това личи от стила на описанието на резултатите и методите в дисертацията, и се доказва и от факта, че и в четирите публикации и трите участия в научни форуми дисертантката е първи автор.
9. По дисертационния труд са направени четири публикации. Три от тях са в международни списания (две от които с импакт фактор), а една е в сборник от международен симпозиум. Представени са също и данни за две участия с постери в международни симпозиуми, и едно участие с доклад в национална конференция. Забелязани са девет цитирания на публикациите.
10. Препоръчвам дисертантката да насочи бъдещите си изследвания към използването на биореактори за култивиране на нетипични корени. Важно и обещаващо направление е по-детайлното изследване на вторичните метаболити в нетипичните корени, и доказване на присъствието или липсата на сескитерпенови лактони в тях, като се има предвид идентифицирането на лактони в нетипични корени на някои медицински растения, като *Cichorium intybus* (Malarz et al. 2007, Acta Physiol. Plantarum, 29, 127-132; Malarz et al. 2002, Z. Naturforsch. 57, 994-997).
11. Авторефератът е изготвен съгласно изискванията и правилно отразява основните положения и научните приноси в дисертационния труд.
12. Въпроси към дисертантката
 - Известни ли са литературни данни за разлики във фармакологичното действие и физиологичните функции на двата вида сескитерпенови лактони - от хеленалинов (HL) и дихидрохеленалинов (DHL) тип?
 - Как могат да се обяснят разликите в проявите на трансгенните клонове TP3 и TP4, след като и двата клона съдържат гените *rol A*, *rol B* и *rol C*?

Критични бележки

 - Правилният термин е оксидаза на β -индолил оцетната киселина, а не β -индоксил оксидаза (с.25).
 - Към текста на фиг. 14, 15, 16, 17, 19 и 21 е нужно да се добави възрастта на растенията.
 - Текстът на графа 4 към таблица 28 се нуждае от корекция.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Дисертационният труд на главен асистент Мария Иванова Петрова представлява едно впечатляващо, задълбочено и завършено изследване със значителни и оригинални научни и научно-приложни приноси. Той се отличава с несъмнена актуалност на избраната тема, свързана с нарастващото използване на природни източници за медицински цели, в случая ценния лечебен вид *Arnica montana* L; с логичната и аргументирана постановка на изследванията; със съвременното ниво на използваните методични подходи; с големия обем, значимост и надеждност на отлично представените резултати, и с добрия научен език и стил.

По този начин дисертационният труд отговаря напълно на всички изисквания на Закона за развитие на академичния състав в Република България (ЗРАСРБ), Правилника за прилагане на ЗРАСРБ, Правилника за условията и реда за придобиване на научни степени и за заемане на академични длъжности в БАН и ИФРГ, и Правилника за дейността на ЦО-БАН.

Дисертационният труд показва, че докторантката Мария Иванова Петрова притежава задълбочени теоретични знания и професионални умения по научна специалност генетика, като демонстрира качества за самостоятелно провеждане на научни изследвания.

На основание на гореизложеното убедено давам своята положителна оценка за проведеното изследване и предлагам на почитемото научно жури да присъди на Мария Иванова Петрова образователната и научна степен „доктор”, професионално направление 4.3. биологични науки, научна специалност генетика (01.06.06).

София,
18.11.2013

Рецензент:
(проф. дн Аглика Едрева)