

Р е ц е н з и я

върху дисертационен труд за получаване на образователната и научна степен “Доктор”, направление 4.3. Биологични науки, научна специалност „Генетика“ шифър 01.06.06

Автор на дисертационния труд: **Мария Иванова Петрова**, главен асистент в ИФРГ, БАН

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

Рецензент: Венета Михова Капчина-Готева, професор в Биологическия факултет на СУ „Св. Климент Охридски”

Представеният ми за рецензиране дисертационен труд на Мария Иванова Петрова е изработен в секция «Приложна генетика и биотехнология на растенията» на ИФРГ, с помощта на екипи от ИОЦХФ и ИБЕИ, БАН и АБИ, ССА. Структурата и съотношението на отделните раздели на дисертационния труд на Мария Петрова са аналогични на утвърдения модел за докторска дисертация. Дисертацията е написана на 151 страници, със стандартните Увод, Литературен преглед, Материали и методи, Резултати и обсъждане, Заключение и Изводи.

Изчерпателната литературна справка включва 392 заглавия, 50% от които за последните десет години и отразява коректно всички аспекти на разработваният в дисертационния труд проблем. Използваната литература е цитирана правилно както в дисертацията, така и в приложения списък. Актуалността на темата е обоснована от подробния литературен преглед, който обхваща 22 машинописни страници и е разделен на 6 подглави. От целенасочения литературен преглед личи много добрата осведоменост и широка теоретична подготовка на докторантката за таксономия и разпространение; морфологична и цитологична характеристика; биологични особености; фармакологична стойност; прилагане на различни биотехнологични методи и подходи за директно и индиректно *in vitro* култивиране на *Arnica montana* L.; продължително съхранение на *in vitro* култури; получаване на нетипична коренова култура; адаптация *ex vitro*; биологично-активни вещества. Целта на дисертацията е добре формулирана с правилно поставени задачи.

В дисертационния труд е използван достатъчно по обем изходен материал за иницирането на стерилна *in vitro* култура – семена и стерилни експлантите от 3 произхода на *Arnica montana* – Германия, Украйна и Австрия. Чрез използване на комплексен подход

са разработени четирите основни фази на микроразмножаването: въвеждане в култура, мултипликация, вкореняване и адаптация *ex vitro*, включващи:

- установяване на оптимална стерилизация чрез използване на набор от стерилизанти;
- оптимизиране на основните компоненти на хранителната среда с цел повишаване на размножителния коефициент и качество на растенията, вкореняване и адаптация *ex vitro* (захароза, растежни регулатори, торфени смеси);
- оптимални параметри за продължително съхранение *in vitro* на отбрани перспективни клонове;
- прилагане на индиректен метод за размножаване с цел получаване на перспективни клонове;
- използване на високовирulentен, немодифициран щам на *Agrobacterium rhizogenes* за генетична трансформация и получаване на нетипична коренова култура (hairy roots) ;
- прилагане на високоефективни фитохимични методи за количествено определяне на вторични метаболити, характерни за *Arnica montana* L.;
- статистическа обработка чрез подходящи програми в зависимост от характера на изследванията.

Използваните методи са описани коректно. Избраната методология съответства на поставените цел и задачи, което дава основание да се заключи, че получените резултати са достоверни и значими.

Приложението на *Arnica montana* L в повече от 271 препаратата в медицината и козметиката са основа за разработването на биотехнологично производство на стандартизиран растителен материал. Слабо проученото индиректно размножаване, липсата на данни за дългосрочно съхраняване на ценни за фармацията форми *in vitro*, получаването на трансформирана нетипична коренова култура с високо количество на биологично-активни вещества, както и опазването на естествените местообитания чрез създаване на насаждения от високопродуктивни линии, прави настоящото изследване актуално и безспорно първо по рода си, особено по отношение създаването на цялостна технология за микроразмножаване на този ценен и застрашен от изчезване вид.

Глава Резултати и обсъждане е значителна част от дисертационния труд (64 стр.), разделена на шест основни раздела: 1. Микроразмножаване; 2. Продължително съхранение на растенията в условия *in vitro*; 3. Получаване на калусна култура, 4. Индиректен органогенез; 5. Индуциране на hairy roots ; 6. Фитохимични изследвания. Получените резултати от докторантката са интерпретирани в светлината на постиженията

на наши и световни учени. Според представените в дисертацията резултати е извършена голяма по обем работа, статистически обработените резултати от която са представени от докторантката Мария Петрова в много добре оформени 34 таблици и 31 фигури.

Установена е най-добрата схема за стерилизация, вид на експланта (семена и изолирани от тях стерилни растения), което осигурява достатъчен брой стерилни растения за следващата фаза - мултипликация, като генотипа и приложените растежни регулатори или комбинация между тях са основните фактори, определящи различията в регенерационния потенциал на *Arnica montana* L. Броят на получените от един експлант растения (12.32) е повишен чрез прилагането на системата RITA за временно потапяне на експлантите в течна хранителна среда (18.2). Дългосрочното съхранение на ценни *in vitro* клонове от *Arnica montana* L. е обусловено в най-голяма степен от количеството на захарозата (2%), редуцираните наполовина макро и микро соли и добавянето на осмотици в хранителната среда.

Един от важните раздели в дисертацията е селекцията от докторантката на перспективни регенеранти от *Arnica montana* L. чрез използването на директна или индиректна регенерация.

Подходящ избор е прилагането на генетична трансформация за получаване на нетипична коренова култура и подбор на бързорастящ клон с високо количество на ценни за фармацията вторични и други (захари, захарни алкохоли) метаболити, която може да се използва в бъдещи изследвания за култивиране в биореактор.

Интересни за практиката са резултатите за дългосрочно съхранение (6 месеца), които не зависят от генотипа и произхода на изходния материал. Прави впечатление доброто познаване и ползване в дискусията на резултатите от други изследователи при този или други растителни видове, добрият стил и изчистения от чуждици дисертационен труд.

Важен дял от дисертационния труд е използването на модерни и високоефективни фитохимични методи за проследяване количеството на вторични метаболити в *in vitro* размножени растения от *Arnica montana* L., при което е установено по-високо съдържание на сескитерпенови лактони (15.8-22.7мг/г) в листен материал, както и в цветове на адаптирани *ex vitro* витро растения (6.66 при 2.84мг/г за размножаваните по конвенционалния метод). Резултатите са систематизирани и оформени в осем извода, които отразяват правилно получените в дисертационния труд експериментални данни. *Приносител* от проучванията по дисертационната тема на Мария Петрова са с приложен

характер, като получените оригинални и потвърдителни научни факти допринасят за разширяване на познанията ни за възможностите за прилагане на определени биотехнологични подходи в практиката.

Като приноси с *оригинален характер* се очертава създаването на цялостна технология за микроразмножаване и дългосрочно съхранение на ценни форми от *Arnica montana*.

Резултатите за бързорастящ трансгенен клон нетипична коренова култура и *in vitro* растителен материал с по-високо количество на сескитерпенови лактони в листата и цветовете след адаптация *ex vitro*, са от значение за разширяване площите на този ценен за фармацията вид. Приемам формулираните от докторантката изводи и приноси и нямам възражения по тях.

Работата е написана стегнато и ясно, отстранени са малкото технически грешки след презентацията на резултатите пред разширения научен съвет, на който се даде ход за защита на дисертацията. Нямам критични бележки към дисертационният труд, който по обем и представени резултати надхвърля изискванията. Очевиден е факта, че по-дългия период за провеждане на изследванията и работата със специалисти в областта на Ботаниката, Генетиката, Биотехнологиите и особено Фитохимията от други научни институти са оказали положителен ефект както върху получените резултати, така и върху тяхната интерпретация.

Към дисертантката имам следния въпрос:

- Кое от направленията счита, че трябва да се доразвие в бъдещата и научно-изследователска работа по отношение обекта на настоящия дисертационен труд или ще продължи научно-изследователската си работа с други лечебни растения.

Докторантката е представила 4 научни публикации, в които са отразени резултати по темата на дисертацията и тя е първи автор. Три от тях са в реферирани чуждестранни списания, а четвъртата в сборник от международна конференция, което превишава изискваните по закон за получаване на образователна и научна степен „доктор“. Допълнително е представен и списък на три участия в една национална и две международни конференции. Върху два от трудовете по темата на дисертацията са забелязани 9 цитата. Считам, че получените резултати са оригинални и достоверни. Очевидно е, че приносите на дисертацията са личен труд на докторантката Мария Петрова. Авторефератът е изготвен според изискванията и точно отразява основните резултати и научните приноси на дисертационния труд.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Дисертационният труд на Мария Иванова Петрова е съвременно научно изследване в областта на Растителните Биотехнологии. Дисертационният труд и справката за приносите показват доброто познаване както на българската, така и на чуждестранната литература в научната област на изследването, добре подбрани съвременни и модерни методи. Анализите на получените данни са логични, получени са оригинални резултати с приносен характер, което потвърждава, че докторантката е изградена като самостоятелен изследовател, необходимо условие за придобиване на образователната и научна степен „доктор”. Дисертационният труд отговаря на Закона за развитието на академичния състав в Република България (ЗРАСРБ) и приетия от НС на ИФРГ Правилник за неговото приложение.

Всичко това ми дава основание убедено и еднозначно да препоръчам на уважаемото Научно жури да присъди на Мария Иванова Петрова образователната и научна степен „доктор”.

17.11.2013 г.

Рецензент:
(Проф. Венета Капчина-Тотева)