

РЕЦЕНЗИЯ

от проф. д-р Марина Станилова,

Институт по биоразнообразие и екосистемни изследвания, БАН (ИБЕИ-БАН),
член на Научното жури, съгласно Заповед № РД-01-31/14.07.2026 г. на Директора на
ИФРГ-БАН

върху дисертационния труд за присъждане на образователната и научна степен „Доктор” на **Марияна Тодорова Сичанова**, докторант в самостоятелна форма на обучение по професионално направление „4.3. Биологични науки“, област на висше образование: „4. Природни науки, математика и информатика“, докторска програма „Физиология на растенията”, към лаборатория „Растително-почвени взаимодействия“ в Институт по физиология на растенията и генетика – БАН

Научен консултант: **доц. д-р Мария Генева**

Тема на дисертационния труд: **„*In vitro* размножаване на *Stevia rebaudiana* чрез прилагане на аминокиселинни нанофибри и влияние на засушаването върху *ex vitro* адаптираните растения“**

Обща характеристика на дисертационния труд

Дисертационният труд на М. Сичанова е написан на 163 стандартни машинописни страници и е структуриран според изискванията, като включва заглавна страница, благодарности, съдържание, списък на съкращенията, кратко въведение (2 стр.), литературен обзор (39 стр.), работна хипотеза, цел и задачи (3 стр.), материали и методи (15 стр.), резултати (37 стр.), дискусия (29 стр.), изводи (1 стр.), приноси (2 стр.) и цитирана литература (28 стр.). Резултатите са добре онагледени с 9 таблици, 26 фигури и 1 схема; освен това, за по-добро разбиране са приложени 1 фигура в раздел Литературен обзор, 1 фигура и 4 схеми в раздел Материали и методи.

Темата е много актуална, предвид световната тенденция да се ограничи прекомерната употреба на захар и да се замени с безопасни естествени подсладители с ниска калоричност. Продуктите на основата на стевия са подходящи за всички и особено за хората, страдащи от диабет, високо кръвно налягане и затлъстяване, поради което намират все по-широко приложение. *In vitro* методите за ускорено размножаване и осигуряване на разсад са много подходящи при видове с ниска кълняемост на семената, какъвто е случаят със *Stevia rebaudiana*, а прилагането на иновативни техники

има потенциал да повиши ефективността на процеса на размножаване, както и да стимулира биосинтеза и натрупването на метаболитите от практически интерес.

Заглавието на дисертационния труд е ясно и информативно. Целите са ясно дефинирани, а планираните задачи съответстват на поставените цели. Посочени са критериите за оценка на морфологичните признаци на *in vitro* прорастъците, култивирани на хранителни среди с различен състав; предвидени са биохимични и фитохимични изследвания на ензимната антиоксидантна активност и определяне съдържанието на антиоксидантни метаболити, разтворими захари, стрес маркери и биологично-активни вторични метаболити в *in vitro* и *ex vitro* адаптирани растения. Предвидена е и статистическа обработка на данните, с която да се докаже работната хипотеза, а именно, че добавянето на подходящи сребърни наночастици в хранителната среда ще промени биологичния отговор на растенията по отношение на морфогенетичния им потенциал, биохимичния профил и адаптивната им пластичност. Очаква се наличието на наночастици в средата да причини хормезис, а експерименталното определяне на оптималната им концентрация да доведе до оптимизиране на *in vitro* размножаването на *Stevia rebaudiana*. Същевременно, действайки като наноелситори, сребърните наночастици да стимулират натрупването на вторичните метаболити стевиозид, ребаудиозид А и общи феноли. В допълнение, *ex vitro* адаптираните растения, претретиран с AgNFs, да бъдат по-устойчиви на воден дефицит.

Авторефератът обхваща 45 страници и отговаря на изискванията, като съдържа заглавна страница, въведение, цел и задачи, материали и методи, резултати и обсъждане (обединени, на 27 стр.), изводи, приноси, списък на публикациите и на участията на дисертантката в научни форуми, по темата на дисертацията, както и списък на цитиранията на публикациите. Вместо кратко резюме на английски език, авторефератът е представен в пълен текст и на английски език.

Литературна осведоменост и теоретична подготовка на кандидата

Литературният обзор е доста подробен, дисертантката познава добре литературата по темата и може да отсява важното и да го структурира добре. Представена е таксономична и морфологична справка за *Stevia rebaudiana* Bert., изяснено е приложението на вида и е направена химична и фармакологична характеристика с акцент върху ползите за здравето на човека. Направен е кратък преглед на биологичните и екологичните изисквания на вида и на размножаването му в естествени

и производствени условия, като са представени предимствата на тъканните култури *in vitro* като подходяща алтернатива за бързо масово размножаване на стевия. Подробно са разгледани приложението и потенциалът на растителните биотехнологии, значението на състава на хранителните среди, включително на растежните регулатори, за успеха на *in vitro* микроразмножаването и за биосинтеза на биологично-активните вторични метаболити. Особено внимание е отделено на наночастиците и приложението им в растителните биотехнологии, както и на влиянието на сребърните наночастици върху морфологията и физиологията на растенията, включително генотоксичността.

Цитирани са 353 литературни източници на 28 стр., всичките на латиница, повечето от които са публикувани през последните две десетилетия, вкл. и 2025 г., а по-старите се отнасят предимно към някои методи на изследване. Цитирани са публикации и на български учени, работили със стевия (Zayova et al., 2013, 2017, 2022), но е пропусната работата по една дисертация, защитена през 2025 г. в Шуменския Университет и съпътстваща я публикация от 2021 г., в която са сравнени разсади, получени от семена, от стъблени резници и от *in vitro* размножени растения, и като най-перспективни за ефективно производство са посочени разсадите от *in vitro* регенеранти (Ahmed M., Enchev S., Bozhimirov S. Assessment of initial material for stevia selection (*Stevia rebaudiana*). Bulg. J. Agricult. Sci., 2021, 27(3): 536-540.).

Методичен подход

Обосновката на избора на подходящи нискомолекулни производни на аминокиселини е убедителна. Етапите на *in vitro* размножаването са добре описани, както и морфологичните параметри, които служат като критерий за сравняване ефективността на растежа и на размножителния потенциал върху хранителни среди с различен състав. Броят на фитохимичните и биохимичните методи, усвоени от докторантката, е впечатляващ. Спектрофотометрични методи са използвани за определяне активността на ензими с антиоксидантен потенциал, съдържанието на неензимни водоразтворими и мастноразтворими антиоксидантни метаболити, общи феноли и флавоноиди, антирадикалова активност (DPPH метод), фериредуцираща антиоксидантна активност (FRAP метод) и каротеноиди. Определено е съдържанието и на стрес маркерите водороден пероксид, малондиалдехид, пролин и свободни тиолови групи в екстракти от листа. Хроматографски методи (HPLC) са приложени за определяне съдържанието на двата основни стевииол дитерпенови гликозида стевииозид и ребаудиозид А, на които се дължи сладкият вкус на листата, както и на моно- и

дикафеоилови естери на хинова киселина и флавоноида кверцетин-3-О-рамнозид, свързани с разнообразни биологични свойства на вида. Разтворимите захари са определени колориметрично. За определяне на физиологични параметри на *ex vitro* адаптирани и засушени растения е оценен индексът на стабилност на клетъчната мембрана и водното съдържание в листата. Статистическата обработка на данните е направена чрез дисперсионен анализ (One way ANOVA) като значимите разлики са изчислени според теста за най-малка значима разлика (LSD) на Фишер при 5% ниво на значимост, с помощта на софтуерен пакет. Всички използвани методи са подходящи за постигане на поставените цели.

Значимост и убедителност на получените резултати, интерпретациите и изводите

Експериментите са внимателно планирани и обхващат много варианти. Проследено е влиянието на растежния регулатор BAP и на органичните нановлакна носители на сребърни йони (NF-1%Ag и NF-2%Ag, добавени в хранителната среда в 4 концентрации) върху *in vitro* микроразмножаването, вкореняването, растежа и антиоксидантната активност на микропрорастъци от *S. rebaudiana*. Концентрациите на нановлакната са подбрани много удачно, тъй като е отбелязан хорметичен ефект (стимулиране, оптимум и инхибиране), позволяващ да се определи оптималната им концентрация за постигане на поставените цели. Доказана е ключовата роля на разработените наноструктури за стимулиране на ризогенезиса. Установено е синергично действие между пептидомиметичната матрица, осигуряваща достъпен органичен азот, и контролираното освобождаване на сребърни йони, което води до ускоряване на вегетативното развитие, натрупване на биомаса и развитие на устойчив фотосинтетичен апарат, подпомагащ адаптацията към последващ осмотичен стрес. Фитохимичният скрининг за съдържание на стевиолови глюкозиди в екстракти от конвенционално размножени от семена стевии, от *in vitro* размножени на среди, различаващи се по тестваните четири типа органични нановлакна носители на сребро, и от *ex vitro* адаптираните растения, показва, че основни компоненти в екстрактите са стевиозид и ребаудиозид А. Установено е обаче, че съдържанието им и съотношението стевиозид/ребаудиозид А зависи от състава на хранителната среда. Типът на аминокиселинните нановлакна носители в средата повлиява значително и разтворимите захари в екстрактите. Сравнителното изследване на съдържанието на двата основни стевиолови глюкозида при контролните и засушените за 2 и за 5 дни растения показва, че различните сребърни нановлакна носители имат специфично влияние. Подобни изследвания са

направени и при основните фенолни съединения в екстрактите. Всички резултати са убедителни, подкрепени с таблици или фигури, в които са сравнени средните стойности $\pm$ SD при 20 повторения, а достоверните разлики са оценени чрез LSD теста на Fisher ($P \leq 0,05$) след извършване на ANOVA еднопосочен анализ.

Получените данни са подложени на дискусия с позоваване на подходящо подбрани многобройни литературни източници на автори, изследвали влиянието на добавеното в хранителните среди сребро под различна форма: сребърен нитрат и различни типове сребърни наночастици, при размножаването и коренообразуването на най-различни растителни видове (палма, фасул, царевица и др.). Разгледано е значението на концентрацията на сребърните носители върху физиологичните процеси и причините, поради които се наблюдава стимулиране или инхибиране на растежа и биосинтеза на целевите метаболити. Обсъдени са процесите на активиране на защитните механизми при растенията при оксидативен стрес, причинен от третиране с абиотични елиситори и от засушаване и специфичното им влияние върху отделните ензими, участващи в борбата със свободните радикали. Цитиран е опитът на други автори, изследвали влиянието на сребърни нанофибри върху биосинтеза на стевииолни гликозиди в стевия и е направен паралел с получените от дисертантката резултати. Интерпретацията се основава на анализ на процесите от физиологична, биохимична и генетична гледна точка. Дискусията е изчерпателна и води до добре аргументирани изводи.

Критични бележки и препоръки

Литературният обзор би могъл да бъде по-кратък (препоръчително до 1/6 от общия обем на дисертационния труд), фокусиран върху изследвания вид, без излишни общи информации като например потенциала на биотехнологичните методи, които отдавна са се утвърдили в практиката, значението на въглерода и азота за растенията, което е всеизвестно и др. В същото време не е посочено състоянието на проблема в България и не е споменат опитът на Земеделски институт – Шумен, където над три десетилетия се отглежда стевия и е регистриран сорт „Стела”, който се размножава вегетативно и се отличава със стабилност на сортовите характеристики.

В раздел „V.3. Адаптация на растенията към почвен субстрат, аклиматизация и засушаване“ не е отбелязано как и колко често са поливани *ex vitro* адаптиращите се към почвен субстрат растения преди засушаването. В тази връзка е въпросът ми по какъв начин бе избран периодът на засушаване, а именно 2 и 5 дни? Два дни не са ли

прекалено кратък период за засушаване? Имате ли данни за поливането на стевия в стопански насаждения?

Правилно е да се каже „процент на вкоренени растения“, а не „процент на коренообразуване“ и е излишно да се дава формула за изчисляване на процент.

Мерните единици трябва да са навсякъде изписани по един и същ начин, по принцип е общоприето да са на латиница, според системата SI, напр. mg/mL или mg L⁻¹, както са на много места в дисертацията, но често се среща и мг/мл, см, кг, см⁻² и пр.

Въпреки че литературните източници са с пълна библиография, за повечето от тях не е посочен цифров идентификатор на обект (DOI) нито друга стандартна връзка към уебсайт или URL адрес, което затруднява намирането им.

Добре би било при бъдещо продължение на работата върху *in vitro* размножаване на *Stevia rebaudiana* да се обединят усилията с научния екип в Земеделски институт – Шумен, който е изследвал влиянието на генотипа върху развитието и репродукцията на стевия. Прилагането на резултатите от настоящия дисертационен труд, свързани с повишаване устойчивостта на растенията към засушаване чрез претретиране със сребърни наночастици, при българския сорт „Стела“, би имал практическа стойност, с насоченост към създаване на стопанско насаждение, съобразено с климатичните особености в България.

Направените забележки в никакъв случай не омаловажават постигнатите резултати от дисертантката, която съумява да съчетае научно-фундаменталните си изследвания с насоченост към практическо приложение на резултатите.

Характер на научните приноси

Представени са общо 5 оригинални приноса, произтичащи от научната работа по темата на дисертационния труд. Два от тях са свързани с разработването на иновативни биотехнологични подходи за оптимизиране на ускореното *in vitro* размножаване на *Stevia rebaudiana*. Единият касае постигнатото целенасочено регулиране на морфогенезата, биомасата и антиоксидантния капацитет на *in vitro* култури от стевия, чрез модифициране на MS хранителната среда с добавяне на два типа органични нанофибри: валинови пептидомиметици, носители на 1% и 2% колоидно сребро (NF-1%Ag и NF-2%Ag) и нанофибри от соли на аспарагинови производни (NF1-Ag salt и NF2-Ag salt). Другият подход има отношение към оптимизиране на *ex vitro* адаптацията чрез контролирано стимулиране на ризогенезата на *in vitro* растенията, като е установена концентрацията на NF2-Ag salt, при която коренообразуването е най-

интензивно и спомага за оцеляване на растенията на етапа на *ex vitro* адаптацията. Другите три приноса са свързани с повишаване устойчивостта на растенията към засушаване, което е много важно, имайки предвид, че видът е влаголюбив. За първи път е извършено комплексно проучване на влиянието на третиране със сребърни нанофибри по време на *in vitro* култивиране на стевия върху успеха на *ex vitro* адаптацията при оптимална почвена влажност, при кратко и при по-продължително засушаване, като са сравнени измененията в ензимната и неензимната антиоксидантна активност, в съдържанието на стевиол гликозидите, общите разтворими захари, моно- и дикафеоилхиновите киселини и кверцетин-3-рамнозида. Принос с научно-теоретичен характер е установяването на нов механизъм на нано-медирана водна хомеостаза при стевия в условия на воден дефицит, при който претретирането със сребърни нанофибри осигурява по-добра водна хомеостаза в условия на засушаване, свързана с по-добър антиоксидантен защитен механизъм. Представен е и един принос с научно-приложен характер, а именно, че стабилизирането на водното съдържание в листата чрез праймиране със сребърни нанофибри е свързано с намаляване съдържанието на сладките гликозиди, които са ценните търговски метаболити, тоест е необходимо да се пресметне доколко благоприятният биологичен ефект намалява икономическата ефективност на метода. Напълно приемам справката за научните приноси, формулирана от докторантката. Така направената равностметка дава поле за бъдещи изследвания, целящи намиране на баланс между физиологичната устойчивост на растенията и пазарната им стойност, тоест между количеството и качеството на получената биомаса от стевия.

Качество на научните трудове, свързани с дисертацията, и оценка на личния принос на докторанта в изследванията по дисертационния труд

Към дисертационния труд е приложена Декларация за оригиналност и достоверност, в която М. Сичанова декларира, че настоящата разработка съдържа оригинални резултати, получени при проведени от нея научни изследвания с подкрепата или съдействието на научния ѝ консултант, както и че не е използвала неправомерно чужди текстове без посочване на автора и източника им.

Във връзка с дисертационния труд са представени две публикации в престижното международно научно списание *Plants* (MPDI), публикувани през 2022 г. и 2023 г., с висок квантил Q1 и за двете години и JCR-IF (Web of Science) съответно 4.658 и 4.5. Сичанова е първи автор и в двете публикации, което показва значимото ѝ участие в

разработките, въпреки многобройните съавтори. Прави впечатление, че в раздела за приноса на съавторите тя участва само в анализите, концепцията и на двете публикации е на научния ѝ консултант, а методологията и написването е дело на съавторите. Препоръката ми е в бъдеще да се включва по-активно в написването на статиите. За значимостта на публикуваните резултати свидетелства големият брой цитирания на двете публикации, съответно 21 и 3 цитирания от чуждестранни научни колективи, предимно в престижни реферирани и индексирани научни списания.

Дисертационният труд съдържа и резултати извън тези публикации, свързани с изследванията върху *ex vitro* адаптацията на *in vitro* растенията и влиянието на засушаването върху всички проследени параметри. Тези резултати представляват съществена част от изследванията, като три от петте приноса се основават на тях.

По темата на дисертацията са представени и участия с 5 постера на английски език в 5 международни научни форума (в периода 2022 – 2026), като Сичанова е първи автор на всички. Резултати е представила и с устен доклад на български език на Интердисциплинарния докторантски форум в България през 2025.

Заклучение

В заключение, считам, че докторантката е изпълнила всички изисквания за придобиване на ОНС „Доктор“.

Тя е събрала общо 380 кредита, което е значително повече от изискуемия минимум от 200 кредита (необходимите 130 по изпълнение на образователната програма и над два пъти повече по изпълнение на научната програма: 200 от докладване на резултати на научни форуми при изискуем минимум 40 и 50 от публикации по темата на дисертацията при задължителен минимум от 30). Дисертационният ѝ труд отговаря на всички изисквания. Изследванията са добре планирани, резултатите са коректно представени и адекватно интерпретирани. Всички приноси са с оригинален характер и имат научна, а един от тях и научно-приложна стойност. Предвид всичко това, гласувам за и препоръчвам на членовете на уважаемото научно жури да оценят по достойнство и да присъдят на Марияна Сичанова ОНС „Доктор“ по научно направление 4.3. „Биологични науки“, специалност „Физиология на растенията“.

София, 31.08.2026 г.

Подпис:
(проф. М. Станилова)