



## РЕЦЕНЗИЯ

върху дисертационен труд за получаване на образователната и научна степен “доктор” по: област на висше образование - 6. Аграрни науки и ветеринарна медицина, професионално направление 6. 1. Растениевъдство, научната специалност Селекция и семепроизводство на културните растения

**Автор на дисертационния труд:** ПЕРВИН ШЕНГЮН ХАЛКОГЛУ-ХРИСТОВА – редовен докторант към катедра „Генетика и селекция“ при Аграрен университет, гр. Пловдив

**Тема на дисертационния труд:** “*In vitro* култури от *Fabiana imbricata* Ruiz. et Pav. като технологични матрици за получаване на биологично активни вещества”

**Рецензент:** доц. д-р Марина Петрова Марчева, катедра Растениевъдство, при Аграрен Университет Пловдив, област на висше образование - 6. Аграрни науки и ветеринарна медицина, професионално направление 6. 1. Растениевъдство, научната специалност - Селекция и семепроизводство на културните растения определена за член на научното жури със заповед № РД-16-744./ 29. 06. 2021 год. от Ректора на АУ.

**Научни ръководители:** Доцент д-р Светла Янчева. Чл.-кор. проф. д.т.н. Атанас Павлов

### 1. Кратко представяне на кандидата.

ПЕРВИН ШЕНГЮН ХАЛКОГЛУ-ХРИСТОВА е родена 26. 08. 1991 г. Завършва висшето си образование, степен бакалавър, в Аграрен Университет Пловдив, през 2014 година, като агроном – растителен биотехнолог. Успешно придобива магистърска степен в същия университет, специалност агроном – растителна защита през 2015 година. От 2016 година е редовен докторант в катедра „Генетика и селекция“ към АУ Пловдив с научна специалност - Селекция и семепроизводство на културните растения (Растителни биотехнологии). По време на своето обучение провежда двумесечна специализация в Технически университет Дрезден, Германия. Взема участие в DAAD project с цел обучение в рамките на двустранен договор на УХТ с научен ръководител чл.кор. проф. Ат. Павлов. През 2018 г. повишава своята квалификация, като се включва в обучение по програма ENTER Expert Workshop и получава сертификат “Cooperative learning for sustainable development”. Первин Халкоглу се отличава с добра комуникативност и адаптивност към работа в екип. Преподавателската ѝ дейност е свързана с извеждане на часове по растителни биотехнологии за бакалаври от

различни специалности в АУ Пловдив. Участвала е в няколко научни форума на национално ниво и с международно участие. Има практически опит като гл.експерт към Лабораторията по растителни биотехнологии към АУ Пловдив.

## **2. Актуалност на проблема.**

Растителният свят изобилства от видове, използвани в различни сфери на човешкото потребление. Хранително – вкусовата, химичната, технологична и фармацевтична промишленост залагат до голяма степен на ресурси, получени директно или след преработка, от различни културни или малко познати видове. Установяване на техните биологично активни вещества и начините за употреба се развиват непрестанно. *Fabiana imbricata* Ruiz et Pav. е ценно лечебно растение, което е малко известно в Европа. Съществуват редица проблеми за конвенционалното му размножаване и отглеждане. Разработването на подходящи техники за клетъчно и тъканно култивиране открива възможност за размножаване и проучване с цел получаване на биологично активни вещества при контролирани условия.

## **3. Цел, задачи, хипотези и методи на изследване.**

След изключително подробен и добре структуриран преглед на съществуващата до момента научна информация са открити пропуски в знанията в конкретни сфери. Направените изводи обуславят необходимостта от провеждането на настоящото проучване. Целта е формулирана ясно и точно. Поставените задачи отговарят на етапите на проучване на разработвания проблем. Избраната методика е подходяща, общоприета и достатъчна. Посочен е софтуер за „оформяне и представяне на резултатите“ – Word, Excel, би трябвало да се фокусира върху такъв за тяхното анализиране, като SPSS и Breeze TM.

## **4. Онагледеност и представяне на получените резултати.**

Дисертацията е представена на 118 страници. Материалът е разпределен в 9 основни раздела с множество под-раздели. Въведението е кратко – 1 страница, но за сметка на това достатъчно информативно и насочващо към избраната тематика. Литературният обзор заема 23 страници, разпределени в 5 глави с по до 5 под – глави. Представени са 191 автора, публикували в последните 40 години, от които само 3 на кирилица. На отделна страница са посочени изводите от прегледа на коментирания научна информация. Целта и задачите са компактни, конкретни и ясни – на 1 страница. Материала и методите са подробно описани на 13 страници в 6 глави и отразяват пълно провежданите експерименти – от залагането на тест на кълняемост на семената, през въвеждане в култура и опити с различни хранителни среди и светлини, получаване на калусни и суспензиални култури, проучване на биореакторна система с временно потапяне, до екстракция и анализ на биологично активни вещества и статистическа обработка на резултатите. Резултатите и обсъждането следват хода на проведените и описани експерименти и са представени най-обширно - на 46 страници, с 31 фигури и снимки и 16 таблици. В приложение са дадени още 2 таблици за формулите и

литературата за основни и вторични метаболити. Изводите са изведени на 3 страници. Приноси не са посочени.

## 5. Обсъждане на резултатите и използвана литература.

Получените резултати са представени в 4 глави, богато илюстрирани а таблици, снимки и фигури.

Детайлно е описана неспособността на закупените търговски семена да покълнат в лабораторни условия. Проследена е успешната стерилизация на изходните експлант и първоначалното им развитие на безхормонална среда. Анализирани са ефектите на добавяне на различни растежни регулатори ( BAP, IBA) и определена най-подходяща среда за пролиферация на леторастите. Като страничен ефект посочено витрифицирането при конкретни концентрации на ауксините. За да се предотврати е направен опит с добавяне на активен въглен в средата. Тази оптимизация води до почти двукратно по-висока пролиферация и липса на симптоми на хиперхидратация.

Проследени са морфологичните характеристики на растенията, отглеждани на различни хранителни среди. Коренообразуването протича във всички варианти без нужда от допълнителен етап и условия за него. Адаптациата е с най-голям процент преживяемост на регенерантите с последна субкултура върху безхормонална среда.

Изследването на влиянието на светлинния източник - LED с различен спектър на светлината и флуоресцентни лампи като контрола, показва различна ефективност спрямо характеристиките на растенията *Fabiana imbricata* Ruiz. et Pav. Установено е, че светлинния източник от бяла флуоресцентна светлина е най-подходящ за мултипликация, в сравнение с LED източниците на светлина..

Проведеният експеримент с автоматизирана система за временно потапяне (тип RITA®) показва по-голяма ефективност поради отчетените по-високи стойности на показателите, характеризиращи растежа в сравнение с конвенционалната *in vitro* система. Основното предимство на биореакторната система е, че тя осигурява автоматизиране на процеса, минимално пространство и производство на големи количества биомаса, независимо от високата стойност на инвестицията за оборудване.

За първи път е проведен експеримент с дигитална холографска микроскопия (DHM) за измерване размера на клетъчните кълъстери в суспензионните култури от *Fabiana imbricata* Ruiz. et Pav., който доказва, че може успешно да се използва за: броене на клетки, измерване на размера на клетките и клетъчните кълъстери, анализ на жизнеспособността на клетъчни култури и др.

Полифенолният профил на *Fabiana imbricata* Ruiz et Pav. е анализиран чрез HPLC анализи на растения *in vitro*, *in vivo*, калуси, получени от тях растителни клетъчни суспензии. Определени са основните метаболити - галова, протокатехинова, хлорогенова, ванилова, сирингинова, кафеена, салицилова и розмаринова киселина и са идентифицирани *in vitro* културите с различна степен на диференциация, които показват по-висока антиоксидантна способност, доближаваща се до тази на проба от растение *in vivo*.

Опитите са провеждани в Лабораторията по растителни биотехнологии към АУ

Пловдив, физична лаборатория с Дигитален холографски микроскоп (DHM), разработен в АУ Пловдив, Лабораторията за анализи на катедра „Аналитична химия“ на Университета по хранителни технологии – Пловдив, HPLC анализите са извършени в Лабораторията по приложни биотехнологии, филиал на БАН – Пловдив. Изпитвани са голям брой повторения и е направена статистическа обработка на резултатите, където е приложимо. В хода на лабораторните експерименти редовния докторант Первин Халкоглу е усвоила необходимите методи за *in vitro* култивиране и химичен анализ на БАВ. Представената дисертация е изцяло дело на нейните усилия, труд и упоритост.

### **6. Приноси на дисертационния труд.**

Дисертационният труд завършва с формулирането на 15 извода. Те отразяват коректно получените резултати. Анализът е методичен и задълбочен. Представянето е ясно, стегнато и конкретно.

Като научни и научно – приложни приноси от представеният дисертационен труд могат да се посочат:

#### **Научни приноси**

Доказано е, че растителният материал *in vitro*, получен от изходни растения *Fabiana imbricata* Ruiz. et Pav., е подходящ за използване като продуцент на биологично активни вещества.

Проучено е влиянието на различни фактори (добавки, растежни регулатори и светлина) върху регенерацията на тази култура:

- ефектът на добавяне на активен въглен върху пролиферацията на леторастите и преодоляване на негативни физиологични състояния като витрификация и малформации на регенерантите;

- бяла флуоресцентна светлина е доказано най-подходяща за мултипликация в сравнение с LED източниците;

- установено е по-добро закаляване на регенерантите и по-висока преживяемост при адаптацията *ex vitro* при култивиране на последната субкултура върху хранителна среда без растежни регулатори.

За първи път е проведен спектрофотометричен анализ на *in vivo* и *in vitro* култури от *Fabiana imbricata* Ruiz. et Pav., чрез които е доказана висока антиоксидантна активност на анализиранияте екстракти. Установено е, че светлинният режим, спектърът и фотопериодът в комбинация с избрана хранителна среда оказват съществен ефект върху производството на вторични метаболити от недиференцирани *in vitro* системи и промяната на тези параметри може да се използва за моделиране синтеза на целеви биологично активни вещества.

За първи път е изведен експеримент с дигитална холографска микроскопия (DHM), който е лесно приложим за определяне броя и размера на клетки и клетъчните клъстери в суспензионните култури на *Fabiana imbricata* Ruiz. et Pav.

#### **Научно-приложни приноси**



Разработена и оптимизирана е хранителна среда за микроразмножаване на *Fabiana imbricata* Ruiz. et Pav., в която балансът на растежни регулатори осигурява висок процент на мултипликация.

След индуциране на различни по морфология и развитие калусни култури *Fabiana imbricata* Ruiz. et Pav. са избрани подходящи за индуциране на растителни клетъчни суспензии. Суспензионните култури са доказано по-подходящи за получаване на целеви метаболити заради по-бързото натрупване на биомаса в сравнение с калусните култури и *in vitro* растения.

Проучен е полифенолният профил на растения *in vivo* и *in vitro*, калуси и клетъчни суспензии от *Fabiana imbricata* Ruiz et Pav. чрез HPLC. Доказано е разнообразието на синтезираните съединения в проучваните *in vitro* системи с различна степен на диференциация. Определен е техният потенциал като технологични матрици за получаване на целеви метаболити.

## **7. Критични бележки и въпроси.**

Приветствам идеята за проучване на представената тема и не мога да омаловажа нейните достойнства. Дисертационният труд е планиран, структуриран, проведен и представен коректно и подробно. Анализът на резултатите е задълбочен и адекватен. Не са допуснати методични или стилови грешки при изпълнението и описването на постигнатото.

Позволявам си съвсем дребни забележки:

Независимо от подробния литературен обзор не откривам основания за формулиране на първия извод от него. Не са посочени опити за промишлено използване, доказващи наличието на проблеми. Няма нужда от подобен извод, за да се подчертае, че получаване на биологично активни вещества в контролирани условия на една *in vitro* система за регенерация би било успешно и ефективно.

Написването на самият дисертационен труд е венеца на всички положени усилия. Добре би било в него да се коригират дребни грешки, свързани с правопис, номериране и поясняване на легенда към някои таблици.

Ще си позволя и два въпроса:

Защо тестът за кълняемост е продължил 22 седмици ?

Разполагате ли с информация в момента има ли търсене и ако да- в какви препарати се влагат анализирани от Вас съединения?

## **8. Публикувани статии и цитирания.**

В отговор на минималните национални изисквания за присъждане на образователната и научна степен „Доктор“ и изискванията на Правилника за развитието на академичния състав в Аграрен Университет Пловдив, докторант Первин Халкоглу-Христова е публикувала своите резултати в рецензирани и реферирани в Scopus/Web of Science списания. В представената справка са посочени три статии на английски език, публикувани през 2019 г., пряко свързани с темата на дисертационния труд, както и участие в още три публикации (2015 -2016г.) в други проекти в това направление.

В изготвената справка не са посочени цитати на публикуваните резултати.

Представеният автореферат отразява обективно структурата и съдържанието на дисертационния труд.

### **ЗАКЛЮЧЕНИЕ:**

Въз основа на научените и приложените, от докторанта/ката, различни методи на изследване, правилно изведените експерименти, направените обобщения и изводи считам, че представеният дисертационен труд отговаря на изискванията на ЗРАСРБ и Правилника на Аграрния университет за неговото приложение, което ми дава основание да го оценя **ПОЛОЖИТЕЛНО**

Позволявам си да предложа на почитаемото Научно жури също да гласува положително и да присъди на

**ПЕРВИН ШЕНГЮН ХАЛКОГЛУ-ХРИСТОВА**

образователната и научна степен **“доктор”** по научната специалност „Селекция и семепроизводство на културните растения“ (Растителни биотехнологии)

**Дата:** 30. 08. 2021 г.  
гр. Пловдив

**РЕЦЕНЗЕНТ:** .....  
(доц. д-р Марина Марчева)