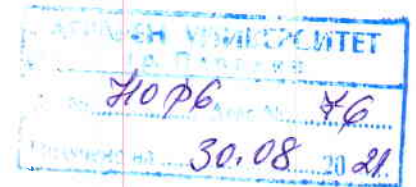


РЕЦЕНЗИЯ



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,

научна 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”.

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

Рецензент: Проф. д-р Нася Борисова Томлекова.

Отдел „Селекция“, при Институт по зеленчукови култури „Марица“, гр. Пловдив,

област на висше образование - 6. Аграрни науки и ветеринарна медицина,

професионално направление 6. 1. Растениевъдство,

научна 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 Аграрен университет.

1. Кратко представяне на кандидата.

Первин Шенгюн Халкоглу е завършила от 2010 до 2015 год. висше образование със степени „Агроном - Растителен биотехнолог“ като бакалавър и „Агроном - Растителна защита“ като магистър и двете в Аграрен университет, Пловдив. През 2016 година, непосредствено след завършването на университета тя е зачислена в редовна докторантура по Селекция на растенията (Растителни биотехнологии) в Аграрния университет.

Като докторант тя е осъществила специализация в Германия (Дрезденския технически университет). Взела е участие в DAAD-проект и в двустранен договор с УХТ програма ENTER Expert Workshop и получила сертификат за обучението си. Липсва информация в документите за владеене на чужд език, но от специализацията е видно владеене на такъв. Главен експерт е към Лабораторията по растителни биотехнологии и е извеждала часове по растителни биотехнологии за бакалаври в АУ - Пловдив.

Представеният от Первин Халкоглу комплект материали на хартиен носител по дисертацията е в съответствие с изискванията на Закона за развитие на академичния

състав в РБ и Правилника за неговото приложение.

2. Актуалност на проблема.

Известни са различни начини за получаване на биологично-активни вещества от растителни видове. Обектът на представеното изследване, *Fabiana imbricata* Ruiz et Pav. е малко известен в Европа. Налице са ограничаващи фактори, които влияят на ефективността на производството им от този вид. Работата в рамките на настоящата дисертация допринася за преодоляването на недостатъците, възникнали при конвенционалното му размножаване и отглеждане. За разлика от класическата селекция, методите на *in vitro* култивирането осигуряват бързо възпроизводство и чрез тях се постига производство на биологично-активни вещества при напълно контролирани условия. Оптимизирането на критичните фактори за *in vitro* култивиране на целевия вид е от решаващо значение за производството им.

Актуалността на темата трябва да се разглежда в теоретичен и в практичен аспект. Освен за решаването на производството на биологично-активни вещества, което е със стопанско значение, въвеждането им в тъканното култивиране е от важност за изследователската работа на биотехнолозите и за генетиката и редица други научни области.

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

В целта е посочено въвеждането на недостатъчно проучения растителен вид *Fabiana imbricata* Ruiz. et Pav. в *in vitro* култури, което ясно фокусира върху създаване на технологични матрици за производството на биологично активни вещества.

Поставените задачи отговарят на етапите на проучване на разработвания проблем и са проведени в правилно избрана последователност.

Изборът на растителен вид, изследван по отношение на ценността му и характеризирани по отношение на податливостта му за *in vitro* култивиране е правилен. *Fabiana imbricata* Ruiz. et Pav. е с потенциал да се разшири спектърът за производство на биоактивни вещества с полезни качества и би послужил също и за решаване на редица биотехнологични проблеми. Изходните растения материал за *in vitro* експериментите е доставен от Multicoflore – semences de plantes ornamentales и разсадник Paddock Plants от Англия.

Идеята за провеждането на научните изследвания методически е построена издържано. Анализите са изведени с подходящо избрани съвременни методи, описани правилно, усвоени и успешно приложени от докторанта, като някои от работните протоколи са оптимизирани. Описани и използвани са етапите: Въвеждане в *in vitro* култура; Микроразмножаване на *Fabiana imbricata* Ruiz et Pav., като е оптимизирана хранителната среда за мултипликация, Адаптиране на регенерантите. Проучено е влиянието на светлинния източник, потапянето тип RITA® в етап на мултипликация. Сравнявани са морфологични параметри на отгледани на различни хранителни среди растения. Направените повторения (24) в стъклените съдове, броят на експлантите и отчетените параметри за оценка на ефективността на нововъведените стъпки в

протоколите са правилно подбрани. Допълнително са избрани методите за получаване на калусни култури, на растителни клетъчни и суспензионни култури заедно с дигитална холографска микроскопия, което прави един внушителен брой приложени методи за въвеждане на целевия растителен вид в *in vitro* култура. Към тях се добавят още и методи за екстракция и анализ на полифеноли, спектрофотометричното определяне на концентрациите им, определяне на антиоксидантна активност чрез улавяне на радикала с DPPH метод и ABTS метод (модифициран в дисертацията), FRAP метода (също модифициран), CUPRAC метод (с модификации). Биохимичният HPLC анализ за определяне на полифенолни съединения и на флавоноиди (приложен с градиент при елуирането и с 11 свидетеля за фенолите и 6 – за флавоноидите) е най-общо казано трети тип анализ и изисква много специфични знания. Внушителен е броят на приложените методи, а той осигурява пълнота и задълбоченост на изследванията и постигане на поставената цел.

За обработка на резултатите са приложени SPSS и Breeze TM, Excel, а са оформени с Word. Достоверността в изследванията е осигурена с достатъчен брой повторения, съответстващи на изискванията за методите.

4. Онагледеност и представяне на получените резултати.

Дисертацията е написана на 118 страници. Заглавието обхваща съдържанието. Въведението хипотетично насочва към целевите вещества за изследване и подходи, растителния вид, идентифицираните проблеми, и значимостта при решаването им. След изключително подробен и добре структуриран преглед на съществуващата до момента научна информация са открити пропуски в знанията в конкретни сфери с практическо приложение. Литературната справка се състои от 191 литературни източника предимно на латиница, а 3 на кирилица. Те обхващат 40-годишен преглед на публикуваната литература по темата. Направените изводи в края на раздела обуславят необходимостта от провеждането на настоящото проучване.

Дисертацията е добре балансирана по раздели и включва 9 основни раздела, а в тях подраздели. Богатата, добре онагледена, подходящо и целенасочено систематизирана информация в този раздел ми дава основание да считам, че докторантът е много добре осведомен по основните постижения, свързани с проблемите, над които работи в дисертационния си труд.

Целта е формулирана точно, като задачите са избрани така, че да осигурят изпълнението ѝ.

Материалът и методите са представени подробно в 6 глави: тест на кълняемост на семената, битехнологични (въвеждане в култури с различни хранителни среди, калусни и суспензиални култури, с отчитане на физични параметри, проучване на биореакторна система с временно потапяне), биохимични (екстракция и различни типове анализи на биологично активни вещества) и статистически.

Резултатите (на 46 страници) са описани в 4 глави по реда на експериментите и подбраните методи и са представени детайлно, онагледени с 16 таблици и 31 фигури и снимки с добро качество. Обсъждането следва резултатите. В приложение са 2 таблици

с формули и литературни данни за основни и вторични метаболити.

Изводите са представени на 3 страници. Следва заключение с приноси, а последните не са формулирани отделно.

5. Обсъждане на резултатите и използвана литература.

Дисертационният труд представя ценна научна информация, получена в резултат на разнопосочни експерименти, описана в четири глави. Изключително добро впечатление прави представянето на анализирани данни в таблици, снимки и графики.

Резултатите от експериментите са представени детайлно. Успешно изходните експлантите са стерилизирани и въведени в *in vitro* култура с първоначално безхормонална среда и е установен ефектът на растежните регулатори BAP, IBA в различни концентрации. Определена е най-подходяща среда за пролиферация на латорастите. Срещу описаното витрифициране при някои концентрации на ауксините в средата е добавен активен въглен, като пролиферацията е засилена двукратно, без да има хиперхидратация. Трябва да се отбележи като успех използването на активен въглен като подход за преодоляване на негативен физиологичен феномен, какъвто е витрификацията.

Във всички варианти на проведените експерименти е осигурено вкореняване на регенерантите. Направена е характеристика на растенията, отглеждани на различните хранителни среди, във връзка с получаването на успешно вкореняване и адаптация. В този смисъл прилагането на безхормонална среда в последната субкултура се оказва изключително удачен подход. Различният спектър на светлината, LED светлинният източник и флуоресцентни лампи влияе различно върху признаците на растенията, като флуоресцентната светлина е най-подходяща за мултипликация.

Изпитаната автоматизирана система за временно потапяне (тип RITA®) демонстрира ефективност и са отчетени по-високи стойности на показателите, характеризиращи растежа в сравнение с конвенционалната *in vitro* система. Безспорно предимство на биореакторната система е, че тя осигурява автоматизиране на процеса, минимално пространство и производство на големи количества биомаса и е оправдана стойността на инвестицията за оборудване.

Оригинален момент в дисертационния труд е използването на дигитална холографска микроскопия (ДХМ) за измерване размера на клетъчните клъстери в суспензионните култури от *F. imbricata*. ДХМ се използва за първи път, доказвайки успешно приложение за броење на клетки, измерване на размера на клетките и клетъчните клъстери, анализ на жизнеспособността на клетъчни култури и др.

Втората част на дисертационния труд е насочена към анализ на биологично активни вещества в растения и *in vitro* култури с различна степен на диференциация на вида *Fabiana imbricata* Ruiz et Pav.

Полифенолният профил е анализиран чрез HPLC на растения *in vitro*, *in vivo*, калуси, получени от тях растителни клетъчни суспензии. Допълнително е направен и анализ на ключови метаболити - галова, протокатехинова, хлорогенова, ванилова, сирингинова, кафеена, салицилова и розмаринова киселина. Резултатите имат

оригинален характер и позволяват идентифициране на целеви метаболити в *in vitro* културите с различна степен на диференциация, при определени условия на култивиране. Установената висока антиоксидантна способност се доближава до стойностите на проба от растения *in vivo*.

Удачното съчетаване на компетентностите на двамата научни ръководители намира отражение в цялостното разработване и интерпретиране на резултатите от дисертационния труд. Опитите са проведени в различни лаборатории на АУ Пловдив, Университета по хранителни технологии – Пловдив, филиала на БАН – Пловдив.

Дизайнът на експерименталната работа включва изпитване на голям брой повторения и направена адекватна статистическа обработка на резултатите. В хода на лабораторните експерименти редовния докторант Первин Халкоглу е усвоила необходимите методи за *in vitro* култивиране и химичен анализ на БАВ.

Дисертационният труд завършва с формулирането на 15 извода, които отразяват детайлно получените резултати.

6. Приноси на дисертационния труд.

Дисертационният труд определено представлява иновативен тип проучване, което носи в себе си, както научни, така и приложни приноси. Като основни такива си позволявам да посоча:

Научни приноси

- Доказано е, че *in vitro* култури на *Fabiana imbricata* Ruiz. et Pav. са подходящи за използване за произвеждане на биологично активни вещества с широк спектър.
- Оптимизирана е хранителна среда за микроразмножаване на *F. imbricata*, в която балансът на растежни регулатори осигурява висок процент на мултипликация.
- Индуцираните калусни култури се различават се по морфология и растежни характеристики и на тяхна база са селектирани 3 култури, подходящи за клетъчни суспензии.
- За първи път с дигитална холографска микроскопия (DHМ) е определен броя и размера на клетки и клетъчни клъстери в суспензионни култури на *F. imbricata*.
- Използвайки HPLC анализ е установен полифенолният профил на растения *in vivo* и *in vitro*, калуси и получени от тях клетъчни суспензии от *F. imbricata*. Доказано е разнообразието на синтезираните полифенолни съединения в проучваните *in vitro* системи с различна степен на диференциация.
- За първи път е проведен спектрофотометричен анализ на *in vivo* и *in vitro* култури от *F. imbricata*, чрез които е доказана висока антиоксидантна активност на анализирания екстракт.

Научно-приложни приноси

- За първи път в България е получен *in vitro* материал от *F. imbricata*, подходящ за използване като източник на биологично активни вещества.
- Добавянето на активен въглен (АС) в хранителната среда оказва стимулиращ

ефект върху пролиферацията на летораста и води до преодоляване на негативни физиологични състояния.

□ Използването на хранителна среда без растежни регулатори е удачен подход за закаляване на регенерантите и осигурява висока преживяемост на растенията при адаптацията *ex vitro*.

□ Установено е, че за растежа и развитието на растенията *F. imbricata* бялата флуоресцентна светлина е най-подходяща за етап мултипликация в сравнение с LED източниците.

□ Доказано е, че суспензионните култури на *F. imbricata* са подходящи за получаване на целеви метаболити поради това, че достигат максимум на нарастване на биомаса за кратък период на култивиране (8-10 дни) в сравнение с калусните култури и *in vitro* растения (28 дни).

□ Определен е потенциалът на *in vitro* култури от *F. Imbricata*, като технологични матрици за получаване на целеви метаболити.

7. Критични бележки и въпроси.

Оценявам достойнствата на представената тема и съчетаването на използваните методи за постигане на основната цел. Дисертационният труд представлява една логически завършена научна разработка, която е планирана, структурирана и изведена прилагайки съвременна методология.

Анализът на резултатите е задълбочен и съпоставен с други подобни разработки.

Бих предпочела терминът „Определяне съдържанието“ на феноли, флавоноиди и др. да се замени с „Определяне концентрацията“, тъй като се определят не в цяло растение, а на определено тегло растителна маса, от която са екстрахирани. Свидетелите за флавоноидите не са посочени в раздел „Материал и методи“. Не на всички снимки и схеми е посочено авторството.

Бих желала да поставя следните въпроси:

1. Как е избран като научен обект видът *F. Imbricata*?
2. Как бихте обяснили ефектът на спектъра на светлината върху промяната на метаболитния профил на различни *in vitro* култури.

8. Публикувани статии и цитирания.

В представената справка за наукометрични показатели са посочени достатъчно публикации, които покриват 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 изготвената справка не са посочени цитати на публикуваните резултати, но към публикуваните разработки е проявен интерес от различни научни списания.

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:.....
(Проф. д-р Нася Томлекова)