

Рецензия

от проф. дсн Лилян Крумов Сотиров, пенсионер
Стара Загора

Относно: дисертационен труд за присъждане на образователна и научна степен „доктор“ по научна специалност в АФ при ТРУ. „**Фенотипна и генетична характеристика на балканските ендемити Гризобахова (*Moehringia grisebachii* Janka) и Янкиева кутевка (*Moehringia jankae* Griseb. ex Janka)**“ с автор Мария Тодорова Желязкова и научен ръководител проф. д-р Светлана Георгиева и научен консултант доц. дн Нели Грозева. Област на висше образование: 4. Природни науки, математика и информатика, Професионално направление: 4.3. Биологични науки, Докторска програма: Генетика.

I. Информация за дисертанта

Дисертантът се е обучавал по докторска програма към катедра „Генетика, развъждане и репродукция“ при Аграрен факултет на ТРУ по научна специалност „Генетика“. Обучението е осъществено в редовна форма през периода 2017 – 2020 г.

Кратка биографична справка

Мария Желязкова Тодорова е родена на 14.01.1986 г., гр. Стара Загора. Завършва висшето си образование в Тракийски университет, Аграрен факултет, специалност „Екология и опазване на околната среда“. Завършила е магистратура по специалност „Генетика“ в ПУ „Паисий Хилендарски“, гр. Пловдив, Биологически факултет, за периода 2014 – 2016 г. Досега е участвала в 3 научни проекта. Владее английски език на ниво В1. Придобила е и добра компютърна грамотност. Завършила е също следдипломна квалификация в Педагогически Факултет при Тракийски Университет по специалността учител. Понастоящем е докторант към кат. „Генетика, развъждане и репродукция“ по докторска програма „Генетика“, професионално направление 4.3. Биологически науки.

Оценка на представения проект за дисертация

Представеният ми за рецензиране труд съдържа 225 стандартни машинописни страници, които включват текст, таблици 47, фигури 76, приложения 30 и литературен списък. Цитирани са 346 автора от които 17 на кирилица, а останалите на латиница. Темата на представения за защита проект на дисертация е актуална, защото съгласно прогнози на Организацията по прехрана и земеделие (FAO) населението на планетата през 2050 г. ще достигне 9,1 милиарда и ще има нужда от 70% увеличение на производството на храни. В настоящата ситуация, действията за ефективното и продуктивното използване на земеделските земи представляват глобално предизвикателство за опазване на биоразнообразието. В същото време, FAO съветва да бъде запазено генетичното биоразнообразие на растенията, поради важноста му за бъдещата продоволствена сигурност. По данни на Международния съюз за опазване на природата, една трета от световните растителни видове са застрашени на различно ниво. Основните причини за загуба на биоразнообразие се дължат на човешки дейности, като унищожаване на хабитати, замърсяване, изменение на климата, нашествие на екзотични видове, селскостопански практики, промяна в начина на живот и нарастването на човешката популация.

Цел и задачи – целта е ясно формулирана, а задачите напълно постижими.

I. Литературен преглед

Литературният преглед дава достатъчно пълна и точна информация, която обслужва и изяснява напълно избрания научен проблем.

II. Материал и методи

Проучването е осъществено през три последователни вегетационни периода от 2017 до 2019 г. Приложен е маршрутен метод за установяване на разпространението на видовете.

За да се определи местоположението и състоянието на *M. jankae* и *M. grisebachii* в България са посетени и проучени територии в Източна Стара планина (Природен парк, Сините камъни), Средна гора (село Розовец - връх Братан - село Свежен - село Песнопой), Тракийска низина (Хасково - Симоновград), Тунджанска хълмиста равнина (село Маточина - село Михалич – село Варник), Североизточна България (Шумен - село Кюлевча - село Троица – село Мадара).

Използвани са следните методи за изследване:

1. Проучване на морфологична изменчивост на *M. jankae* и *M. grisebachii*

Проучена е морфологичната изменчивост на видовете *Moehringia grisebachii* Janka и *Moehringia jankae* Griseb ex Janka от род *Moehringia* (*Caryophyllaceae*). В морфологичния анализ са включени общо 23 популации от двата вида. Растителният материал е събиран през вегетационен период 2017 - 2019 г.

2. Проучване на кариотипа и кариотипната изменчивост на *M. jankae* и *M. grisebachii*. В кариологичното проучване са включени по 10 популации на двата *M. jankae* и *M. grisebachii*, сем. *Caryophyllaceae*. За тази цел са използвани семена, събирани от естествените местообитания на видовете през вегетационен период 2017 – 2019. Подробно е описан метода за получаване на метафазни пластини и начинът за тяхното отчитане.

3. Проучване на генетично разнообразие на *M. jankae* и *M. grisebachii*

За проучване на генетичното разнообразие са включени 11 популации на *M. jankae* и 29 популации на *M. grisebachii*. Растителният материал е събиран през вегетационен период 2017 – 2019г. от отделни местности, обхващащи максимално данните за площта на разпространение на двата вида в България. Подробно е описан метода за ДНК изолация и PCR амплификацията. За проучване на генетичното разнообразие на *M. jankae* и *M. grisebachii* са тествани 20 ISSR праймери, като 15 от тях са избрани за настоящето изследване. Подборът на ISSR праймерите е извършен основно на базата на литературни данни от сходни изследвания обхващащи вида (*M. jankae*), както и изследвания обхващащи род *Moehringia* и сем. *Caryophyllaceae*.

III. Резултати и обсъждане

Посетени са районите, които видовете обитават според литературни източници и чрез маршрутен метод са обходени посочените местности, както и близки до тях, а именно: Източна Стара планина, Средна гора, Тракийската низина, Тунджанска хълмиста равнина и Североизточна България. Представен е богат снимков материал на посетените райони. На територията на Източна Стара Планина Национален Парк „Сините Камъни“ са регистрирани общо 13 популации на *Moehringia jankae*, а за *Moehringia grisebachii* са регистрирани общо 34 популации съответно 3 в Североизточна България, 20 в Източна Стара планина на територията на Природен парк „Сините камъни— и 11 в Средна гора. По време на теренните проучвания засилено антропогенно въздействие не е регистрирано (освен на територията на Национален историко археологически резерват Мадара, Североизточна България). Според авторката потенциални заплахи за всяка една от установените популации на двата балкански ендемита съществуват, поради привързаността им към специфични местообитания – процепи на скали и силната им зависимост от влажността през вегетационния период. Като се има предвид, че *M. jankae* и *M. grisebachii* са с ограничено разпространение в страната и че семенното възобновяване на всички изследвани популации на двата вида е далеч от теоретично възможното, е наложително да продължат наблюденията върху установените до момента популации, да се положат усилия за откриване на нови популации и да се изследват в детайли механизмите за тяхното размножаване. Направена е фенотипна характеристика на *M. Jankae* като са извършени морфологични измервания на 24 количествени признака при 6 популации. Същото е направено и за *M. Grisebachii* като са измерени 24

количествени признака при 17 популации. Получените резултати са представени в таблици. От проведените изследвания става ясно, че фенотипното разнообразие на *M. jankae* и *M. grisebachii* достига значително ниво както между отделните индивиди в популациите, така и между отделните популации. Анализът на вариансата и на двата вида дава почти идентични резултати, и затвърждава, че вътрепопулационното разнообразие е значително по-високо от междупопулационното такова.

Определен е хромозомния брой на *M. jankae* и *M. grisebachii* като в кариологичното проучване са включени 10 от регистрираните популации на *M. jankae* и по 10 от регистрираните популации на *M. grisebachii* на територията на Средна гора и Източна Стара планина. Хромозомният брой и на двата вида е съобщен за първи път. Установеният диплоиден хромозомен брой на *M. jankae* и *M. grisebachii* е $2n = 2x = 24$. Регистрирана е вътрепопулационната, междупопулационната и междувидовата кариотипна изменчивост. За *M. Jankae* е установен диплоидният хромозомен брой на вида $2n = 24$. В изследваните 10 популации са регистрирани метацентрични (m), субметацентрични (sm) и интерцентрични хромозоми, като доминиращи са метацентричните. Регистрирани са следните кариотипове: $2n = 24m$ (24 метацентрични хромозоми) за 3 популации (Mj6, Mj8 и Mj9), $2n = 22m + 2sm$ (22 метацентрични и 2 субметацентрични хромозоми) за 3 популации (Mj2, Mj3 и Mj7), $2n = 20m + 4sm$ (20 метацентрични и 4 субметацентрични хромозоми) за 2 популации (Mj1 и Mj4), $2n = 18m + 6sm$ (18 метацентрични и 6 субметацентрични хромозоми) за 1 популация (Mj5) и $2n = 20m + 2sm + 2i$ (20 метацентрични, 2 субметацентрични и 2 интерцентрични хромозоми) за 1 популация. В престаения проект за първи път се съобщават кариологични данни за *M. grisebachii*. Установен е диплоидният хромозомен брой $2n = 24$. В изследваните 20 популации са регистрирани метацентрични (m), субметацентрични (sm) и интерцентрични (i) хромозоми, като доминиращи са метацентричните. Регистрирани са следните кариотипове: $2n = 24m$ (24 метацентрични хромозоми) при 8 популации (MgR1, MgR5, MgR7, MgSl1, MgSl2, MgSl3, MgSl4, MgSl10); $2n = 22m + 2sm$ (22 метацентрични и 2 субметацентрични хромозоми) при 8 популации (MgR2, MgR3, MgR4, MgR6, MgR8, MgR9, MgSl5, MgSl8); $2n = 20m + 4sm$ (20 метацентрични и 4 субметацентрични хромозоми) при 2 популации (MgR10 и MgSl7); $2n = 20m + 2sm + 2i$ (20 метацентрични, 2 субметацентрични и 2 интерцентрични хромозоми) при 1 популация (MgSl6); $2n = 20m + 4sm + 2i$ (20 метацентрични, 4 субметацентрични и 2 интерцентрични хромозоми) при 1 популация (MgSl9). За доказателство на получените резултати е представен богат снимков материал и са построени идиограми. Извършени са измервания на хромозомите и резултатите са представени в таблици.

ДНК анализ

Според авторката генетичното разнообразие може да бъде оценено като се използват морфологични характеристики, молекулни маркери или комбинация от двете. Изследванията на генетично разнообразие на базата на морфологични характеристики не винаги са надеждни, тъй като морфологията при растенията е силно повлияна от факторите на околната среда. Много по надеждна е оценката на генетичното разнообразие на базата на ДНК маркери, за които е доказано, че са по-независими от фактори на околната среда.

А. Генетично разнообразие в естествени популации на *Moehringia jankae*.

В настоящата работа е извършена оценка на генетичното разнообразие при 11 популации на *M. jankae* чрез ISSR маркери. Общо 59 полиморфни локуса са идентифицирани чрез амплификация с 5 селектирани ISSR праймера, вариращи в диапазон от 180 до 2000 bp. Получените резултати са представени в таблици от № 26 до № 34.

Б. Генетично разнообразие в естествени популации на вида *Moehringia grisebachii*.

За отчитане на генетично разнообразие на *Moehringia grisebachii* са тествани 28 популации на вида с 15 ISSR маркера. На Фигура 67 и Фигура 68 са илюстрирани част от резултатите на анализа. Общо 251 полиморфни локуса са идентифицирани чрез амплификацията, вариращи в диапазон от 120 до 2500 бд. Получените резултати са представени в таблици от № 36 до № 42.

В. Анализ на междувидовата генетична изменчивост на *M. jankae* и *M. grisebachii*.

В 39 популации от двата вида са регистрирани общо 275 полиморфни локуса чрез амплификация с общо 15 ISSR праймера. От всички използвани праймери 8 са 100% полиморфни. Данните до тук, обобщени в Таблица 44, 45 и Фигура 73 посочват, че при сравнение на двата вида *M. grisebachii* показва по-високо генетично разнообразие. Средните изчислени стойности на вида за N_e , I , H_e и uH_e , съответно са 1.39, 0.38, 0.24, 0.25 и са по-високи от средните изчислени стойности за вида *M. jankae* ($N_e = 1.29$, $I = 0.27$, $H_e = 0.18$ и $uH_e = 0.19$). Също така броят полиморфни локуси и броят редки фрагменти установени в популациите на *M. jankae* (57.04% и 23) е по-малък от тези установени в популациите на *M. grisebachii* (86.97% и 85). Клъстерният анализ на базата на данните от ISSR маркери ясно разпределя популациите, както по вид, така и по местообитания, но също демонстрира, че между популациите на двата различни вида *M. jankae* и *M. grisebachii* има по-голямо сходство, отколкото между популациите на *M. grisebachii* в двата основни ареала на вида – Източна Стара планина и Средна гора (Фигура 76). Направено е детайлно обсъждане на генетичното разнообразие отчетено с ISSR маркери чрез сравняване на собствените резултати с тези на много други автори. Направена е и съпоставка на морфологията, кариологията и ДНК анализа при ендемичните видове *Moehringia jankae* Griseb. ex Janka и *Moehringia grisebachii* Janka.

Изводи

На базата на получените резултати са направени 10 извода, които според мен правдиво отразяват извършената от дисертанта работа.

Приноси

Приносите посочени от дисертанта са разделени на 2 групи:

1. Теоретични приноси – 3 броя.
2. Приноси с научно-приложен характер – 1 бр.

Направени са и 4 препоръки, които вероятно се отнасят за бъдещата работа на дисертанта. Към представения проект има и 30 приложения.

Резултатите представени в настоящия проект са популяризирани чрез 7 научни публикации в наши научни списания като в 6 от тях дисертанта е водещ автор.

Списък с публикации по проекта на дисертационния труд:

1. Zhelyazkova, M., Grozeva, N., Gerdzhikova, M., & Terzieva, S. (2018). The Balkan endemics *Moehringia jankae* Griseb. ex Janka and *Moehringia grisebachii* Janka in Bulgaria. *Trakia Journal of Sciences*, 16(4), 261.
2. Zhelyazkova, M., Georgieva, S., Kostova, M., Gencheva, D., and Grozeva, N. (2019). Preliminary study on genetic diversity in *Moehringia jankae* griseb. ex janka based on inter-simple sequence repeat (issr) markers. *Bulgarian Journal of Agricultural Science*, 25(Suppl. 3), 148-157.
3. Zhelyazkova, M., Georgieva, S., and Grozeva, N. (2019). Study of population variability of the endemic species *Moehringia grisebachii* janka (Caryophyllaceae) in Bulgaria. *Bulgarian Journal of Agricultural Science*, 25(Suppl. 3), 169-177.
4. Zhelyazkova, M., Grozeva, N. and Georgieva, S. (2020a). Karyotype studies of endemic species *Moehringia grisebachii* (Caryophyllaceae) from Sredna Gora Mts, Bulgaria. *Bulgarian Journal of Agricultural Science*, 26 (1), 202–206

5. Zhelyazkova, M., Grozeva, N. and Georgieva, S. (2020) Karyological study of Balkan endemics *Moehringia jankae* Griseb. ex Janka and *Moehringia grisebachii* Janka (Caryophyllaceae) in Bulgaria. *Bulg. J. Agric. Sci.*, 26 (Suppl. 1), 58-71
6. Grozeva, N., Zhelyazkova, M., Gerdzhikova, M., Tzanova, M., Pavlov, D., Georgieva, S. and Georgiev, D. (2020) Morphological and karyological variability of the Balkan endemics *Moehringia jankae* Griseb. ex Janka and *Moehringia grisebachii* Janka (Caryophyllaceae) from Eastern Balkan Range (Bulgaria). *Bulg. J. Agric. Sci.*, 26 (Suppl. 1), 30-47
7. ZHELJAZKOVA, MARIYA, SVETLANA GEORGIEVA, NELI GROZEVA. GENETIC DIVERSITY OF THE BALKAN ENDEMIC SPECIES MOEHRINGIA JANKAE GRISEB. EX JANKA AND MOEHRINGIA GRISEBACHII JANKA (CARYOPHYLLACEAE) FROM BULGARIA USING ISSR MARKERS. *ECOLOGIA BALKANICA* (IN PRESS)

Оценка на автореферата

Авторефератът отразява коректно съдържанието на дисертационния труд и според мен би дал на читателите достатъчно ясна представа за представените в дисертационния труд резултати.

Критични бележки, препоръки и въпроси

Нямам критични бележки, но бих попитал авторката има ли сведения за евентуално съдържание на биологично активни вещества в изследваните растения, които да бъдат използвани за медицински цели.

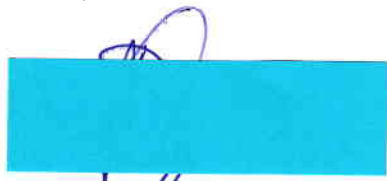
Заклучение

На базата на задълбочения анализ на представения проект за дисертация бих препоръчал на почитаемото жури да присъди на дисертанта образователната и научна степен „доктор“.

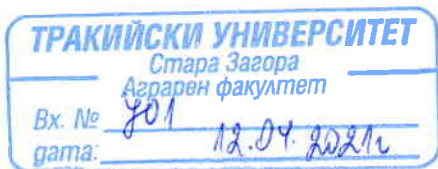
Дата: 06.04.2021 г.

Стара Загора

Подпис:



проф. д-р Л. Сотиров



Review

from Prof. DSc Lilyan Krumov Sotirov, retired, Stara Zagora

Subject: dissertation work for awarding the educational and scientific degree "Doctor" in the scientific specialty in AF at TRU. Maria Todorova Zhelyazkova and research supervisor Prof. Dr. Svetlana Georgieva and scientific consultant Assoc. Prof. Nelly Grozeva. Field of higher education: 4. Natural sciences, mathematics and informatics, Professional field: 4.3. Biological Sciences, Doctoral Program: Genetics.

I. Information about the dissertation

The dissertation was studied in a doctoral program at the Department of Genetics, Breeding and Reproduction at the Faculty of Agriculture of TRU in the scientific specialty "Genetics".

The training was carried out in a regular form in the period 2017 - 2020.

Brief biographical reference

Maria Zhelyazkova Todorova was born on January 14, 1986, in the town of Stara Zagora. She graduated from the Thracian University, Faculty of Agriculture, majoring in "Ecology and Environmental Protection". She graduated with a master's degree in Genetics at the University of Plovdiv "Paisii Hilendarski", Plovdiv, Faculty of Biology, for the period 2014-2016. So far she has participated in 3 research projects. Fluent in English at level B1. She has also acquired good computer literacy. She also graduated from the Faculty of Pedagogy at the Thracian University with a degree in Teacher Education. She is currently a doctoral student at dept. "Genetics, breeding and reproduction" in the doctoral program "Genetics", professional field 4.3. Biological sciences.

Evaluation of the submitted project for dissertation

My peer-reviewed paper contains 225 standard typewritten pages, which include text, tables 47, figures 76, applications 30, and a bibliography. 346 authors are cited, 17 of them in Cyrillic and the rest in Latin. The topic of the submitted dissertation project is relevant because, according to the Food and Agriculture Organization (FAO), the world's population in 2050 will reach 9.1 billion and will need a 70% increase in food production. In the current situation, action for the efficient and productive use of agricultural land is a global challenge for biodiversity conservation. At the same time, the FAO advises that the genetic biodiversity of plants be preserved because of its importance for future food security. According to the International Union for Conservation of Nature, one third of the world's plant species are endangered at various levels. The main causes of biodiversity loss are due to human activities, such as habitat destruction, pollution, climate change, the invasion of exotic species, agricultural practices, lifestyle changes and the growth of the human population.

Goal and tasks - the goal is clearly stated and the tasks are completely achievable.

I. Literature review

The literature review provides sufficiently complete and accurate information that serves and fully clarifies the chosen scientific problem.

II. Material and methods

The study was conducted during three consecutive vegetation periods from 2017 to 2019. A route method was applied to establish the distribution of the species. To determine the location and condition of *M. jankae* and *M. grisebachii* in Bulgaria has visited and studied territories in the Eastern Stara Planina (Nature Park, Sinite Kamani), Sredna Gora (Rozovets village - Bratan peak - Svezhen village - Pesnopoy village), Thracian lowland (Haskovo-Simeonovgrad), Tundzha hilly plain (Matochina village) Mihalich - the village of Varnik), Northeastern Bulgaria (Shumen - the village of Kyulevcha - the village of Troitsa - the village of Madara).

The following test methods were used:

1. Study of morphological variability of *M. jankae* and *M. grisebachii*

The morphological variability of the species *Moehringia grisebachii* Janka and *Moehringia jankae* Griseb ex Janka of the genus *Moehringia* (Caryophyllaceae) was studied. A total of 23 populations of both species were included in the morphological analysis. The plant material was collected during the vegetation period 2017 - 2019.

2. Study of the karyotype and karyotype variability of *M. jankae* and *M. grisebachii*. The cytology study included 10 populations of both *M. jankae* and *M. grisebachii*, family Caryophyllaceae. For this purpose, seeds collected from the natural habitats of the species during the vegetation period 2017 - 2019 were used. The method for obtaining metaphase plates and the method for their reading are described in detail.

3. Study of genetic diversity of *M. jankae* and *M. grisebachii*

Eleven populations of *M. jankae* and 29 populations of *M. grisebachii* were included for the study of genetic diversity. The plant material was collected during the vegetation period 2017 - 2019, from individual localities, covering as much as possible the data on the area of distribution of the two species in Bulgaria. The method for DNA isolation and PCR amplification is described in detail. To study the genetic diversity of *M. jankae* and *M. grisebachii*, 20 ISSR primers were tested, 15 of which were selected for the present study. The selection of ISSR primers was performed mainly on the basis of literature data from similar studies covering the species (*M. jankae*), as well as studies covering the genus *Moehringia* and the family Caryophyllaceae.

III. Results and discussion

The areas inhabited by the species according to literature sources were visited and the indicated areas, as well as those close to them, were traversed by a route method, namely: Eastern Stara Planina, Sredna Gora, the Thracian lowland, Tundzha hilly plain and Northeastern Bulgaria. A rich photographic material of the visited areas is presented. A total of 13 populations of *Moehringia jankae* have been registered on the territory of Eastern Stara Planina Sinite Kamani National Park, and a total of 34 populations have been registered for *Moehringia grisebachii*, respectively 3 in Northeastern Bulgaria, 20 in Eastern Stara Planina on the territory of Sinite Kamani Nature Park, and 11 in Sredna Gora. During the field research, increased anthropogenic impact was not registered (except on the territory of the National Historical and Archaeological Reserve Madara, Northeastern Bulgaria). According to the author, potential threats to each of the identified populations of the two Balkan endemics exist due to their attachment to specific habitats - rock crevices and their strong dependence on humidity during the growing season. Given that *M. jankae* and *M. grisebachii* are of limited distribution in the country and that the seed regeneration of all studied populations of the two species is far from the theoretically possible, it is imperative to continue the observations on the populations established so far, efforts to discover new populations and to study in detail the mechanisms for their reproduction.

A phenotypic characteristic of *M. Jankae* was made by performing morphological measurements of 24 quantitative traits in 6 populations. The same was done for *M. Grisebachii* by measuring 24 quantitative traits in 17 populations. The results obtained are presented in tables. Studies have shown that the phenotypic diversity of *M. jankae* and *M. grisebachii* reaches a significant level both between individuals in populations and between populations. The analysis of the variance of both species gives almost identical results, and confirms that the intrapopulation diversity is significantly higher than the interpopulation one.

The chromosomal number of *M. jankae* and *M. grisebachii* was determined and 10 of the registered populations of *M. jankae* and 10 of the registered populations of *M. grisebachii* on the territory of Sredna Gora and Eastern Stara Planina were included in the karyological study. The chromosome number of both species was reported for the first time. The established diploid chromosome number of *M. jankae* and *M. grisebachii* is $2n = 2x = 24$. Intrapopulation, interpopulation and interspecific karyotype variability was registered. For *M. Jankae*, the diploid chromosome number of the species $2n = 24$ was found. Metacentric (m), submetacentric (sm) and intercentric chromosomes were registered in the studied 10 populations, with metacentric ones dominating. The following karyotypes were registered: $2n = 24m$ (24 metacentric chromosomes) for 3 populations (Mj6, Mj8 and Mj9), $2n = 22m + 2sm$ (22 metacentric and 2 submetacentric chromosomes) for 3 populations (Mj2, Mj3 and Mj7), $2n = 20m + 4sm$ (20 metacentric and 4 submetacentric chromosomes) for 2 populations (Mj1 and Mj4), $2n = 18m + 6sm$ (18 metacentric and 6 submetacentric chromosomes) for 1 population (Mj5) and $2n = 20m + 2sm + 2i$ (20 metacentres), 2 submetacentric and 2 intercentric chromosomes) for 1 population. Cariological data on *M. grisebachii* are reported for the first time in the presented project. The diploid chromosome number $2n = 24$ was determined. Metacentric (m), submetacentric (sm) and intercentric (i) chromosomes were registered in the studied 20 populations, with metacentric ones dominating. The following karyotypes were recorded: $2n = 24m$ (24 metacentric chromosomes) in 8 populations (MgR1, MgR5, MgR7, MgS11, MgS12, MgS13, MgS14, MgS110); $2n = 22m + 2sm$ (22 metacentric and 2 submetacentric chromosomes) in 8 populations (MgR2, MgR3, MgR4, MgR6, MgR8, MgR9, MgS15, MgS18); $2n = 20m + 4sm$ (20 metacentric and 4 submetacentric chromosomes) in 2 populations (MgR10 and MgS17); $2n = 20m + 2sm + 2i$ (20 metacentric, 2 submetacentric and 2 intercentric chromosomes) in 1 population (MgS16); $2n = 20m + 4sm + 2i$ (20 metacentric, 4 submetacentric and 2 intercentric chromosomes) in 1 population (MgS19). To prove the obtained results, a rich photographic material is presented and idiograms are constructed. Chromosome measurements were performed and the results are presented in tables.

DNA analysis

According to the author, genetic diversity can be assessed using morphological characteristics, molecular markers or a combination of both. Genetic diversity studies based on morphological characteristics are not always reliable, as plant morphology is strongly influenced by environmental factors. Much more reliable is the assessment of genetic diversity based on DNA markers that have been shown to be more independent of environmental factors.

A. Genetic diversity in natural populations of *Moehringia jankae*.

In the present work, the assessment of genetic diversity in 11 populations of *M. jankae* was performed using ISSR markers. A total of 59 polymorphic loci were identified by amplification with 5 selected ISSR primers ranging from 180 to 2000 bp. The results obtained are presented in Tables № 26 to № 34.

B. Genetic diversity in natural populations of *Moehringia grisebachii*.

To account for the genetic diversity of *Moehringia grisebachii*, 28 populations of the species with 15 ISSR markers were tested. Figure 67 and Figure 68 illustrate some of the results of the analysis. A total of 251 polymorphic loci were identified by amplification, ranging from 120 to 2500 bp. The results obtained are presented in Tables № 36 to № 42.

C. Analysis of the interspecific genetic variability of *M. jankae* and *M. grisebachii*.

A total of 275 polymorphic loci were registered in 39 populations of both species by amplification with a total of 15 ISSR primers. Of all the primers used, 8 were 100% polymorphic. The data summarized so far in Tables 44, 45, and Figure 73 indicate that a

comparison of the two *M. grisebachii* species shows higher genetic diversity. The average calculated values of the species for N_e , I , H_e and uH_e , respectively, are 1.39, 0.38, 0.24, 0.25 and are higher than the average calculated values for the species *M. jankae* ($N_e = 1.29$, $I = 0.27$, $H_e = 0.18$ and $uH_e = 0.19$). Also, the number of polymorphic loci and the number of rare fragments found in the populations of *M. jankae* (57.04% and 23) is smaller than those found in the populations of *M. grisebachii* (86.97% and 85). Cluster analysis based on data from ISSR markers clearly distributes populations, both by species and by habitat, but also demonstrates that between the populations of the two different species *M. jankae* and *M. Grisebach* there is a greater similarity than between the populations of *M. grisebachii* in the two main habitats of the species - Eastern Stara Planina and Sredna Gora (Figure 76). A detailed discussion of the genetic diversity reported with ISSR markers was made by comparing our own results with those of many other authors. A comparison of the morphology, karyology and DNA analysis of the endemic species *Moehringia jankae* Griseb. ex Janka and *Moehringia grisebachii* Janka.

Conclusions

Based on the results obtained, 10 conclusions were made, which in my opinion truthfully reflect the work done by the dissertation.

Yields

The contributions indicated by the dissertation are divided into 2 groups:

1. Theoretical contributions - 3 pieces.

2. Contributions with scientifically applied character - 1 pc.

4 recommendations were made, which probably refer to the future work of the dissertation.

There are also 30 applications to the presented project.

The results presented in this project are popularized through 7 scientific publications in our scientific journals and in 6 of them the dissertation is a leading author.

List of publications on the project of the dissertation:

1. Zhelyazkova, M., Grozeva, N., Gerdzhikova, M., & Terzieva, S. (2018). The Balkan endemics *Moehringia jankae* Griseb. ex Janka and *Moehringia grisebachii* Janka in Bulgaria. *Trakia Journal of Sciences*, 16(4), 261.

2. Zhelyazkova, M., Georgieva, S., Kostova, M., Gencheva, D., and Grozeva, N. (2019). Preliminary study on genetic diversity in *Moehringia jankae* griseb. ex janka based on inter-simple sequence repeat (issr) markers. *Bulgarian Journal of Agricultural Science*, 25(Suppl. 3), 148-157.

3. Zhelyazkova, M., Georgieva, S., and Grozeva, N. (2019). Study of population variability of the endemic species *Moehringia grisebachii* janka (Caryophyllaceae) in Bulgaria. *Bulgarian Journal of Agricultural Science*, 25(Suppl. 3), 169-177.

4. Zhelyazkova, M., Grozeva, N. and Georgieva, S. (2020a). Karyotype studies of endemic species *Moehringia grisebachii* (Caryophyllaceae) from Sredna Gora Mts, Bulgaria. *Bulgarian Journal of Agricultural Science*, 26 (1), 202–206

5. Zhelyazkova, M., Grozeva, N. and Georgieva, S. (2020) Karyological study of Balkan endemics *Moehringia jankae* Griseb. ex Janka and *Moehringia grisebachii* Janka (Caryophyllaceae) in Bulgaria. *Bulg. J. Agric. Sci.*, 26 (Suppl. 1), 58-71

6. Grozeva, N., Zhelyazkova, M., Gerdzhikova, M., Tzanova, M., Pavlov, D., Georgieva, S. and Georgiev, D. (2020) Morphological and karyological variability of the Balkan endemics *Moehringia jankae* Griseb. ex Janka and *Moehringia grisebachii* Janka (Caryophyllaceae) from Eastern Balkan Range (Bulgaria). *Bulg. J. Agric. Sci.*, 26 (Suppl. 1), 30-47

7. ZHELYAZKOVA, MARIYA, SVETLANA GEORGIEVA, NELI GROZEVA. GENETIC DIVERSITY OF THE BALKAN ENDEMIC SPECIES MOEHRINGIA JANKAE GRISEB. EX JANKA AND MOEHRINGIA GRISEBACHII JANKA (CARYOPHYLLACEAE) FROM BULGARIA USING ISSR MARKERS. ECOLOGIA BALKANICA (IN PRESS)

Evaluation of the abstract

The abstract correctly reflects the content of the dissertation and in my opinion would give readers a clear enough idea of the results presented in the dissertation.

Critical notes, recommendations and questions

I have no critical remarks, but I would ask the author if there is any information about the possible content of biologically active substances in the studied plants to be used for medicinal purposes.

Conclusion

Based on the in-depth analysis of the presented dissertation project, I would recommend to the esteemed jury to award the dissertation the educational and scientific degree "Doctor".

Date: April 6, 2021.

Stara Zagora

Signature:

A solid red rectangular box redacting the signature of the reviewer.

Prof. DSc L. Sotirov