

## ТРАКИЙСКИ УНИВЕРСИТЕТ, АГРАРЕН ФАКУЛТЕТ

### СТ А Н О В И Щ Е

От: **проф. Татяна Иванова Влайкова, д.б.**

Катедра Медицинска химия и биохимия, Медицински факултет,  
Тракийски Университет, Стара Загора

Научна специалност: „Биохимия“, професионално направление: 4.3.  
Биологически науки

Относно: дисертационен труд за присъждане на образователна и научна степен **„доктор“** по научна специалност „Генетика“, професионално направление: 4.3. Биологически науки, в АФ на ТРУ

Автор на дисертационния труд: **Мария Тодорова Желязкова**

Тема на дисертационния труд: **Фенотипна и генетична характеристика на балканските ендемити Гризобахова (*Moehringia grisebachii Janka*) и Янкиева кутевка (*Moehringia jankae Griseb.ex Janka*)**

Научен ръководител: **проф. д-р Светлана Георгиева**

Научен консултант: **доц. дн Нели Грозева**

**Основание** за представяне на становището: участие в състава на научното жури по защита на дисертационния труд съгласно Заповед №510/08.03.2021 на Ректора на ТРУ.

#### **1. Информация за дисертанта**

Дисертантът, **Мария Тодорова Желязкова**, се е обучавал по докторска програма по научна специалност „Генетика“ към катедра „Генетика, развъждане и репродукция“ на Аграрен факултет на ТРУ

Обучението е осъществено в редовна форма през периода 10.03.2017 – 13.04.2020г

#### **2. Обща характеристика на представения дисертационен труд**

*Актуалност на темата:* В съвременния свят на активна и агресивна човешка дейност по отношение на използването на природните ресурси, видовото разнообразие както в царството на животните, така и в царството на растенията е значително застрашено. По данни на Международния съюз за опазване на природата, една трета от световните растителни видове са застрашени. Сред тях са и ендемичните видове, каквито са и двете растения, обект на дисертационния труд на Мария Желязкова: *Moehringia grisebachii* Janka и *Moehringia jankaе* Griseb. ex Janka. Като част от общото биоразнообразие, генетичното разнообразие е основна предпоставка за приспособяването и оцеляването на популациите. Но най-често популациите на ендемитите са сравнително малочислени и представени с индивиди разпръснати в широк ареал, което създава проблем на ендемичния генофонд. Опознаването на тяхната оригиналност, история, настоящо разпространение и популационна структура е основна задача с цел опазване и съхранение на тази уязвима част от българската флора.

Ето защо, темата на дисертационния труд на Мария Желязкова е актуална, а резултатите от проведените проучвания върху морфологичната, кариологичната и генетична изменчивост при двата ендемични за България вида от род *Moehringia*, предоставят информация, която е важна и неизменна част от изготвянето на консервационни програми за опазване на тези редки видове.

*Структура и обем:* Дисертационния труд е написан на 225 страници и е добре балансиран по отношение на обем на отделните части: 2 стр. Увод, 38 стр. Литературен обзор; 2 стр. Цел и задачи; 10 стр. Материали и методи; 91 стр. Резултати и обсъждане; 2 стр. Изводи и по 1 страница Препоръки и Приноси. За визуализиране на използваните методи и на получените резултати в дисертационния труд са изготвени 47 таблици, 76 фигури и 30 Приложения.

В 22 от приложенията са представени индивидуалните морфологични параметри на всички изследвани обекти, а в други 4 са представени индивидуалните кариоморфологични параметри на изследваните обекти, което смятам за излишна информация, отежняваща и увеличаваща обема на дисертационния труд. Обобщените средни стойности на параметрите за видовете от съответните местообитания, представени в текста и фигурите на дисертационния труд са напълно достатъчни за извеждането на резултатите. .

В дисертацията е използвана литература от 346 източника, 17 от които са на кирилица и 329 на латиница. Прави впечатление, че само около 22% (77/346) от литературните източници са от последните 10

години (2011-2020 г.), което ми дава основание да дам препоръка на дисертанта в бъдещи научни съобщения и публикации да включва по-актуални литературни източници, особено като се има предвид, че в при изследванията са използвани модерни молекулярно-биологични методи.

*Литературен обзор:* Литературният обзор включва изчерпателна информация относно понятията биоразнообразие и генетично разнообразие, факторите и процесите, които влияят на генетичното разнообразие в популациите; причините за намаляване на биоразнообразието при растенията; категориите растения по отношение степента на застрашеност, възприети в съвременната природозащитна практика. В друга част от литературният обзор е направен преглед на висшата флора в България и са описани характеристики на семейство *Caryophyllaceae*, към което принадлежат видовете, които са обект на дисертационния труд от род *Moehringia*. Мария Желязкова прави и преглед на ролята на хромозомния анализ за изучаване на биоразнообразието и на молекулярните маркери за оценка на генетичното разнообразие при растенията.

Литературният обзор е написан компетентно на добър литературен български език с лесен за четене и възприемане научен стил. В него ясно проличават задълбочените знания и информираност на Милена Желязкова и изградените умения да прави аналитично обобщение на научната литература. Смятам, че литературният обзор на дисертационния труд би имал още по-завършен вид, ако в края му Милена Желязкова бе направила кратко обобщение, в което да бъдат изведени неизяснените аспекти и което да служи като основа за извеждането на целта и задачите на дисертационния труд.

Смятам, че целта добре и пълно определя същността на разработения труд, а задачите са поставени в логична последователност и са формулирани конкретно и точно и са адекватни за постигане на поставената цел.

*Материали и методи:* В проучванията на морфологичната изменчивост на видовете *M. grisebachii* и *M. jankaе* от род *Moehringia* (*Caryophyllaceae*) са включени общо 23 популации от двата вида, като са измерени 24 количествени белези. В проучванията на кариотипа и кариологична изменчивост са анализирани семена, събирани през вегетационни периоди от естествените местообитания на 30 популации на двата вида, а при проучванията на генетичното разнообразие са включени 29 популации. Лабораторните методи са адекватни за постигане на поставените задачи и включват подготовка на препарати за кариологично изследване, изолиране на геномна ДНК, PCR-базиран ISSR анализ (

анализ на inter-simple sequence repeats). Тези методи са реализирани в лабораторията по ДНК анализ при катедра „Генетика, развъждане и репродукция“ на АФ при ТрУ, Стара Загора.

Статистическите методи са подходящи, описани са подробно и показват личното участие на докторанта в тяхното реализиране.

Подготвените от докторанта прапарати на растенията за кариологично изследване са анализирани в Института по биоразнообразие и екосистемни изследвания към БАН.

### **3. Оценка на получените научни и научно-приложни резултати**

При теренните проучвания на разпространението на двата ендемични вида, Мария Желязкова и нейният научен консултант доц. Грозева, установяват, че в България Балканският ендемит *M. jankae* формира популации само на територията на Природен парк „Сините камъни— Източна Стара планина (общо 13 популации), като броят на индивидите в популациите варира от 8 до 73, докато *M. grisebachii* има по-широко разпространение: регистрирани са общо 34 популации в Североизточна България, в Източна Стара планина и в Средна гора, като числеността на индивидите в популациите варира от 5 до 256 индивида. На базата на тези резултати те правят заключение, че се наблюдава намаляване на площта на разпространение на тези два ендемични вида в България.

Проучванията за определяне на фенотипната изменчивост, водят до изводите, че вътрепопулационната изменчивост е по-значима и при двата вида в сравнение с междупопулационната. По-силно изменчиви са вегетативните признаци, докато генеративните (дължина и ширина на плода и на семената) са по-слабо изменчиви.

Значими с приносен характер са резултатите от кариологичните анализи, при които за първи път са установени диплоидните хромозомни набори (и за двете растения е  $2n=24$ ); определени са и са сравнени дължините на хромозомните набори и е доказано, че регистрираните кариотипове са симетрични, с доминиране на метацентрични хромозоми. Установени са 5 различни кариотипа, които се повтарят и при популациите на двата вида.

Молекулярно-биологичните анализи (ISSR анализа) потвърждават данните от морфологичния анализ, за по-значимо вътрепопулационното разнообразие видовете, в сравнение с междупопулационното и междувидовото такова.

Съществени резултати са тези доказващи че, популациите на *M. grisebachii* и *M. jankae*, разпространени на територията на Източна Стара планина са с по-високо сходство помежду си в сравнение с популациите

на *M. grisebachii* разпространени в Североизточна България и Средна гора, като при клъстерния анализ тези популации са включени в друг общ клъстер. Въпреки високото сходството между популациите на *M. grisebachii* и *M. jankaе*, разпространени на територията на Източна Стара планина, ISSR анализът убедително разграничава популациите в отделни клъстери, както по вид, така и по местообитания и доказва идентичността на *M. grisebachii* и *M. jankaе* като отделни видове.

#### **4. Оценка на научните и научно-приложни приноси**

Изведените от резултатите и изводите приноси са дефинирани кратко и ясно. Приемам приноси във вида, в който са представени. Положително оценявам подготвените препоръки за разработване на консервационна програма и изготвяне на мерки с цел съхранение и опазване на видовете от род *Moehringia* в България.

#### **5. Оценка на публикациите по дисертацията**

Във връзка с дисертацията са подготвени и публикувани 6 научни статии, от които 1 е в списание с квантил Q3 в международната база данни Scopus (*Bulgarian Journal of Agricultural Science*), но няма импакт фактор, други 4 са доклади от научни форуми, публикувани в притурка на същото списание (*Bulgarian Journal of Agricultural Science*), една статия е публикувана в българско списание, което не се реферира в Scopus или Web of Science (*Trakia Journal of Science*). В сипъка има и още една (7ма) публикация, която е отбелязана под рубриката „под печат“, но за нея не установих в документите писмо от редакцията за потвърждаване на този факт. Въпреки тази последна забележка, смятам, че Мария Желязкова има достатъчно богата публикационна активност по темата на дисертацията, която е повече от достатъчна за придобиване на ОНС „доктор“. В 6 от всичките 7 публикации, Мария Желязкова е първи автор, което безусловно доказва нейния личен принос.

#### **6. Оценка на автореферата**

Запозната съм с автореферата и намирам, че той отразява напълно и адекватно съдържанието и постиженията на дисертацията.

#### **7. Критични бележки, препоръки и въпроси**

Нямам критични бележки по същество по темата, методите, и резултатите, освен споменатите по-горе, свързани с големия брой приложения, представящи информация за индивидуалните показатели на изследваните обекти и препоръката за актуализиране на литературните източници и подготвянето на обобщение към литературния обзор.

#### **Заклучение**

Дисертационният труд на Мария Желязкова я очертава като млад изследовател, със самостоятелно мислене и солидни познания в областта

на ботаниката и екологията с насоченост към опазване на биоразнообразието на растенията.

Достойнствата на дисертационния труд, публикационната активност, личният принос на Мария Желязкова и изпълнените изисквания за необходимите количествени и качествени критерии ми дават **пълно основание** да предложа на уважаемите членове на научното жури да присъди на **Мария Тодорова Желязкова** образователната и научна степен „**ДОКТОР**“ в област на висше образование 4. Природни науки, математика и информатика, професионално направление 4.3. Биологически науки, научна специалност „Генетика“.

09.05.2021  
Стара Загора

Подпис:   
/Проф. Татяна Влайкова, дб/



## ТРАКИЙСКИ УНИВЕРСИТЕТ, АГРАРЕН ФАКУЛТЕТ

### STATEMENT

От: **Prof. Tatyana Ivanova Vlaykova, PhD.**

Department of Medical Chemistry and Biochemistry, Faculty of Medicine, Trakia University, Stara Zagora

Scientific specialty: "Biochemistry", professional field: 4.3. Biological sciences

Regarding: PhD thesis for obtaining of PhD degree in scientific specialty: "Genetics", professional field: 4.3. Biological sciences, in Faculty of Agriculture, Trakia University, Stara Zagora

Author of the PhD thesis: ***Maria Todorova Zhelyazkova***

Title of the PhD thesis: Phenotypic and genetic characteristics of the Balkan endemics species *Moehringia grisebachii* Janka and *Moehringia jankae* Griseb. ex Janka

Scientific supervisor: Prof. Svetlana Georgieva, PhD

Scientific consultant: Assoc. Prof. Neli Grozeva, DSci

**Grounds** for presenting the opinion: member of the scientific jury for the defense of the PhD thesis according to Order №510 / 08.03.2021 of the Rector of Trakia University.

#### **1. Information about the PhD student**

The PhD student, Maria Todorova Zhelyazkova, has studied in a PhD program in the scientific specialty "Genetics" at the Department of Genetics, Breeding and Reproduction at the Faculty of Agriculture of Trakia University.

The training was carried out in regular form during the period 10.03.2017 - 13. 04.2020.

#### **2. General characteristics of the presented dissertation (PhD thesis)**

*Relevance of the topic:* In the modern world of active and aggressive human activity in terms of the use of natural resources, species diversity in both the animal kingdom and the plant kingdom is significantly threatened.



According to the International Union for Conservation of Nature, one third of the world's plant species are endangered. Among them there are the endemic species, such as both plants, which are the subject of Maria Zhelyazkova's dissertation: *Moehringia grisebachii* Janka and *Moehringia jankae* Griseb. ex Janka. As part of the overall biodiversity, genetic diversity is a key prerequisite for the adaptation and survival of populations.

But most often, the populations of endemic plants are relatively small and represented by individuals scattered over a wide region, which creates a problem of the gene pool of the endemic plants. The study of their originality, history, current distribution and population structure is the major task in order to preserve and protect this vulnerable part of the Bulgarian flora.

Therefore, the topic of Maria Zhelyazkova's dissertation is relevant, and the results of studies on morphological, karyological and genetic variability of the two Bulgarian endemic species of the genus *Moehringia*, provide information that is a significant and integral part of the preparation of conservation programs for protection of these rare species.

*Structure and volume:* The PhD thesis is written on 225 pages and is well balanced in terms of the volume of the individual parts: 2 pages Introduction, 38 pages Review of the literary; 2 pages Purpose and tasks; 10 pages. Materials and methods; 91 pp. Results and discussion; 2 pages Conclusions and 1 page each Recommendations and Contributions. To visualize the methods used and the results obtained in the dissertation, 47 tables, 76 figures and 30 Appendices were prepared.

In 22 of the appendices, the individual morphological parameters of all studied objects are presented, and in another 4 appendices the individual karyomorphological parameters of the studied objects are presented. All these I consider as unnecessary information, aggravating and increasing the volume of the dissertation. The mean values of the parameters of the species from the different habitats, presented in the text and the figures of the dissertation are completely sufficient for obtaining of the results.

The references of the dissertation consist of 346 sources, 17 of which are in Cyrillic and 329 in Latin. It is noteworthy that only about 22% (77/346) of the literature sources are from the last 10 years (2011-2020). This gives me a reason to recommend, when there are future scientific communications and publications more contemporary literary sources have to be included, especially considering that modern molecular biological methods are used in the research.

*Review of the literature:* The review of the literature includes comprehensive information concerning the biodiversity and genetic diversity, the factors and processes that affect genetic diversity in populations; the reasons



for the reduction of plant biodiversity; the categories of plants in terms of the degree of threat, adopted in modern conservation practice.

Another part of the review of the literature summarizes the higher flora in Bulgaria and describes the characteristics of the family *Caryophyllaceae*, which includes the species that are the subject of the dissertation of the genus *Moehringia*. Maria Zhelyazkova also reviews the role of chromosomal analysis in studying biodiversity and molecular markers for assessing plant genetic diversity.

The review of the literature is competently written in good literary Bulgarian with an easy to read and understand scientific style. It clearly shows the in-depth knowledge of Milena Zhelyazkova and the developed skills to make an analytical summary of the scientific literature. I believe that the review of the literature of the dissertation would have been even more complete if at the end Milena Zhelyazkova had made a short summary in which to specify the unclear aspects and to serve as a basis for defining the aim and tasks of the dissertation.

I think that the aim of the thesis well and fully determines the essence of the work, as well as the tasks are set in a logical sequence and are formulated accurately and are appropriate to achieve the aim.

*Materials and methods:* The studies of the morphological variability of the species *M. grisebachii* and *M.jankae* of the genus *Moehringia* (*Caryophyllaceae*) included a total of 23 populations of both species, as 24 quantitative traits were measured. The studies of karyotype and karyological variability, there were analyzed seeds collected during the growing seasons from the natural habitats of 30 populations of both species, while the genetic diversity studies included 29 populations.

Laboratory methods are adequate to achieve the task set and include preparation of samples for karyological examination, isolation of genomic DNA based on PCR-based ISSR analysis (inter-simple sequence repeat). These methods were carried out in the laboratory for DNA analysis at the Department of Genetics, Breeding and Reproduction of AF at TrU, Stara Zagora.

The statistical methods are appropriate; they are described in details and show the personal participation of the PhD student in their implementation.

The plant samples prepared by the PhD student for karyological research were analyzed at the Institute of Biodiversity and Ecosystem Research at the Bulgarian Academy of Sciences.

### **3. Evaluation of the obtained scientific and scientific-applied results**

In the field studies of the distribution of the two endemic species, Maria Zhelyazkova and her scientific consultant Assoc. Prof. Grozeva have found out that in Bulgaria the Balkan endemic specie *M. jankae* forms populations only at

the territory of the "Sinite Kamani" Natural Park of the Eastern Balkan mountains (13 populations in total), as the number of individuals in the populations varies from 8 to 73. While *M. grisebachii* has a wider distribution: a total of 34 populations have been registered in Northeastern Bulgaria, in the Eastern Balkan Mountains and in Sredna Gora Mountains, as the number of individuals in the populations varies from 5 to 256 individuals. Based on these results, they have concluded that there is a decrease in the area of distribution of these two endemic species in Bulgaria.

Studies for evaluation of phenotypic variability have led to the conclusion that intrapopulation variability is more significant in both species than interpopulation variability. Vegetative traits are more variable, while generative traits (length and width of fruit and seeds) are less variable.

Significant with contribution character are the results of karyological analyzes, in which the diploid chromosome sets have been established for the first time (for both plants it is  $2n = 24$ ); the lengths of the chromosome sets were also determined and compared and it was proved that the registered karyotypes were symmetrical, with a predominance of metacentric chromosomes. Altogether, 5 different karyotypes have been identified, which are observed in the populations of both species.

Molecular biological analyzes (ISSR analysis) have confirmed the data from the morphological analysis that the more significant intrapopulation diversity of the species have been found, compared to the interpopulation and interspecies diversity.

Significant results are those proving that the populations of *M. grisebachii* and *M. jankae* distributed in the territory of the Eastern Balkan Mountains have a higher similarity to each other compared to the populations of *M. grisebachii* distributed in Northeastern Bulgaria and Sredna Gora mountain, which in cluster analysis these populations are included in one common cluster. Despite the high similarity between the populations of *M. grisebachii* and *M. jankae*, distributed in the Eastern Balkan Mountains, the ISSR analysis convincingly distinguishes the populations in individual clusters, both by species and habitats and proves the identity of *M. grisebachii* and *M. jankae* as separate species.

#### **4. Evaluation of scientific and scientific-applied contributions**

The contributions derived from the results and conclusions are defined briefly and clearly. I accept contributions in the form in which they are presented. I appreciate the prepared recommendations for the development of a conservation program and preparation of measures for the conservation and protection of species of the genus *Moehringia* in Bulgaria.

### **5. Evaluation of the publications associated with the dissertation**

Containing results of the dissertation 6 scientific articles have been prepared and published, 1 of which is in a journal refereed in the international database Scopus and has a quartile Q3 (Bulgarian Journal of Agricultural Science), but there has no impact factor; other 4 articles are reports from scientific forums published in the supplements of the same journal (Bulgarian Journal of Agricultural Science); and there is also an article published in a Bulgarian journal that is not refereed in Scopus or Web of Science (Trakia Journal of Science).

There is another (the 7th) publication in the list, which is marked under the heading "under publication", but for it I did not find in the documents a letter from the editorial office to confirm this fact. Despite this last remark, I think that Maria Zhelyazkova has a sufficiently rich publishing activity on the topic of the dissertation, which is more than enough to acquire the PhD degree. In 6 of all 7 publications, Maria Zhelyazkova is the first author, which unconditionally proves her personal contribution.

### **6. Evaluation of the abstract of the PhD thesis**

I am familiar with the abstract of the PhD thesis and I find that it fully and adequately reflects the content and achievements of the dissertation.

### **7. Critical remarks, recommendations and questions**


In practice I have no critical remarks on the subject, methods, and results, other than those mentioned above, related to the large number of applications presenting information about the individual indicators of the studied objects and the recommendation to update the literature and prepare a summary of the literature review.

### **CONCLUSION**

The PhD thesis of Maria Zhelyazkova outlines her as a young researcher, with independent thinking and solid knowledge in the field of botany and ecology with a focus on conserving plant biodiversity.

The merits of the PhD thesis, the publishing activity, the personal contribution of Maria Zhelyazkova and the fulfilled requirements for the necessary quantitative and qualitative criteria, give me **full grounds** to propose to the respected members of the Scientific Jury to award **Maria Todorova Zhelyazkova** the educational and scientific degree "**PhD**" in the field of higher education 4. Natural sciences, mathematics and informatics, professional field 4.3 Biological sciences, **scientific specialty "Genetics"**.

09.05.2021  
Stara Zagora

Signature:   
/Prof. Tatyana Vlaykova, PhD/