

РЕЦЕНЗИЯ

от доц. д-р Марина Станилова, Институт по биоразнообразие и екосистемни изследвания,
БАН (ИБЕИ-БАН)

на дисертационния труд за придобиване на образователната и научна степен „Доктор” –
професионално направление 4.3. Биологични науки (научна специалност „Ботаника”)
на **Ина Йосифова Анева**, редовен докторант в отдел „Растително и гъбно разнообразие и
ресурси”, секция „Приложна ботаника”, ИГ „Ресурсна оценка и мониторинг на редки,
лечебни и ароматни растения”, с научен ръководител: доц. д-р Люба Евстатиева
и научен консултант доц. д-р Калина Алипиева

Тема на дисертационния труд: **“Биологично и фитохимично *in situ* и *ex situ* проучване на
видове с природозащитен статус от род *Sideritis* L. в България”**

Обща характеристика на дисертационния труд, обем и структура. Темата на дисертационния труд на Ина Анева обхваща проучване на трите вида с консервационно значение от р. *Sideritis* L. (Lamiaceae), включени в Червена книга на Република България: *S. scardica* (Балкански ендемит, с категория „застрашен“), *S. syriaca* (рядък вид за българската флора, ограничен в Странджа, с категория „критично застрашен“) и *S. lanata* (рядък вид за българската флора, ограничен в Струмска долина, с категория „застрашен“). Първите два вида се използват като лечебни растения, поради което антропогенният натиск върху тях е силен. Настоящото проучване допълва, актуализира и разширява предходни изследвания върху рода. Темата е много актуална и значима поради все по-големия интерес към планинския чай и необходимостта от устойчиво ползване на лечебните видове растения с природозащитен статус. Целта е ясно формулирана, отразена още по-конкретно в заглавието на дисертацията, в което е уточнено, че са планирани както *in situ* така и *ex situ* проучвания. Задачите съответстват на поставената цел и малко я надхвърлят с допълване и на фармакологично изследване.

Обемът на извършената работа е впечатляващ, като включва теренни проучвания, лабораторни изследвания, камерална работа за обработка на данните и интерпретация на резултатите и дейности за подпомагане на култивирането като най-сигурен подход за опазване на лечебните видове в природата. Посетени са 18 находища на трите целеви вида, намиращи се в няколко флористични района (Пирин, Славянка, Средни Родопи, Странджа и Струмска долина), някои от които неколккратно, в периода 2012-2016 г., с общо 112 дни теренна работа; наблюдавано е развитието и на 21 култивирани площи на *S. scardica* и *S. syriaca*, разположени край различни селища в югозападна България и по Черноморието.

Направени са флористичен анализ, оценка на състоянието на находищата, морфометрични, ембриологични и фитохимични изследвания, статистически анализ на резултатите, електронно-микроскопски наблюдения и определяне на цитотоксичната активност на екстракти от *S. scardica*. Създадена е експериментална площ в Западни Родопи за култивиране на мурсалски чай.

Дисертационният труд е оформен като цялостно книжно тяло от 296 страници, съдържащо задължителните части: съдържание, увод, цел и задачи, литературен обзор, материали и методи, резултати и обсъждане, изводи, приноси и използвана литература, както и допълнителни раздели: благодарности, използвани съкращения, приложения. Спазени са изискванията за оформяне на заглавната страница, размера на шрифта и междуредието. Дисертантката е предпочела да даде заключението не като резюме на всички резултати непосредствено преди изводите, а под формата на заключителни коментари, обобщения и заключения в края на някои от под-разделите в част Резултати и обсъждане. Това има някои предимства, особено във връзка с направените препоръки за подобряване състоянието на видовете, но от друга страна създава разпокъсаност на заключението и води до някои повторения и многословност в изводите.

Дисертационният труд е богато онагледен: 29 таблици (от които 1 в Литературния обзор, 4 в Материали и методи и 24 в Резултати и обсъждане), 119 фигури (от които 2 в Литературния обзор, 8 в Материали и методи и 109 в Резултати и обсъждане), както и 4 приложения, обхващащи общо 59 страници, между които 34 стр. с таблици на флористичния състав на трите целеви вида, 23 карти на изследваните находища, 3 стр. с таблици от статистическата обработка на морфометричните данни от 7 находища на *S. scardica* и 3 находища на *S. syriaca* и 3 стр. таблица с GPS координати и екологичните условия на естествените находища и на култивираните площи, от които са взети проби за фитохимични анализи. В раздел Резултати и обсъждане са представени 63 фигури с различни типове диаграми и 93 фотоса, много от които групирани по няколко във фигура.

Литературна осведоменост и теоретична подготовка на кандидата. Литературният обзор обхваща 42 страници и показва много добра осведоменост и теоретична подготовка на Ина Анева. Разгледани са таксономичната структура и разпространението на рода, морфологичната характеристика, разпространението, местообитанията, състоянието на популациите и консервационния статус на всеки целеви вид, направен е преглед на кариологичните и молекулярни изследвания, а също и на фитохимичния състав на различни видове от рода, разпространени в целия му ареал, както и на тяхното използване в народната медицина. Доста внимание е отделено и на фармакологичната активност на видове от р.

Sideritis. Накрая е направен и кратък преглед на възможностите и начините за култивиране на лечебните видове от рода.

Литературните източници покриват всички области на изследване, обхванати в дисертационния труд. Цитирани са общо 327 заглавия, от които 83 на кирилица и 244 на латиница. Прави впечатление широкият диапазон на използваната литература, разпределен доста равномерно в няколко десетилетия, като най-старият източник е от 1907 г., а най-новите – от 2015 г. Повечето източници на латиница са от чужди автори, като освен на английски има и няколко на френски и немски език.

Методичен подход. Дисертационният труд се отличава с интердисциплинарност, поради което докторантката е усвоила и приложила множество разнообразни методи. При изследване на естествените находища е използван маршрутен метод, при флористичния анализ – трансектен метод за събиране на възможно най-много семенни и спорови видове растения, общ елементарен флорен анализ с описване на флористичния състав на цялата площ на находищата, а за *S. scardica*, който се среща в 3 флористични района, е направен и клъстерен анализ за определяне степента на сходство между находищата. Установени са геоелементите, биологичните типове и жизнените форми. Площта на находищата е определена чрез сваляне на GPS координатите, плътността и числеността на видовете – със Single plot и Multi plot метод, според големината и фрагментираността на популациите, с малки отчетни площадки, разположени на случаен или систематичен принцип в зависимост от степента на еднородност на плътността на популацията. Определено е проективното покритие на вида, както и способността за естествено възобновяване чрез съотношението на вегетативните и репродуктивните индивиди. Морфометричните изследвания включват 13 оригинални и 4 производни показатели на индивиди от 7 находища на *S. scardica* и 3 на *S. syriaca*, при статистическата обработка на данните са приложени дисперсионен, корелационен и клъстерен анализ. Структурата и повърхността на власинките са наблюдавани със сканиращ електронен микроскоп. Биологията на размножаване е оценена чрез определяне жизнеността на полена по ацетокарминовия метод, жизнеността на семената по тетразоловия метод, структурата на мъжката и на женската генеративни сфери върху трайни микроскопски препарати на цветни пъпки. За фитохимичния анализ на феноли и флавоноиди е приложена екстракция с етанол и метанол на изсушена надземна маса във фаза пълнен цъфтеж; количественото определяне на общи полифеноли и на флавоноиди е спектрофотометрично, а качественият състав на фенолните съединения е определен с течна високоефективна хроматография, с адсорбционен и йонно-масов детектор (LC/DAD/ESI-MSn). Цитотоксичната активност на лиофилизиран метанолов екстракт е изследвана върху клетъчна линия от

злокачествен тумор на дебелото черво, растяща на специфична хранителна среда, чрез прилагане на SRB-колориметричен метод и микроскопско отчитане.

Значимост и убедителност на получените резултати, интерпретациите и изводите. Получените резултати в хода на изследването дават отговор на поставените задачи. Изводите са многобройни (общо 18), което съответства на големия брой задачи и на обема на изследванията. Те са разпределени в три групи съобразно направленията на изследване: за състава и състоянието на естествените находища, за биологичните особености и за фитохимичните анализи и активности.

Прави впечатление много детайлното представяне на резултатите от флористичния анализ и оценката на състоянието на видовете в естествените находища (общо 90 страници). Дадена е информация за всяко находище поотделно, както и обобщена за находищата по флористични райони и по видове. Установен е общият брой видове във всяко находище, в т.ч. ендемити, лечебни растения и консервационно значими видове, както и разпределението на видовете по флорни елементи (геоелементен анализ) и проективното покритие на растителността, като се търси връзка с екологичните условия, надморската височина, почвите и др. абиотични и биотични фактори. Най-голям брой ендемити е установен в находищата на *S. scardica*: 21% от всички видове в съобществата; правилно е направено заключението за високата степен на автохтонност на флората, което е свързано с формообразуващите огнища на Балканския полуостров. Флористичното сходство между находищата на вида е представено в дендрограма и детайлно са интерпретирани причините за близостта им: надморска височина, географско положение, тип местообитание. На основание голямото видово разнообразие в находищата на *S. scardica* и *S. syriaca* е направено заключението, че чрез опазването им ще се съхрани и уникалното видово разнообразие в тях.

В направената оценка на състоянието на популациите на *S. scardica* е представена ниската им плътност, неравномерността на разпределение на индивидите, значението на почвения слой за размера на растенията, както и високата степен на антропогенен натиск като основен застрашаващ фактор в леснодостъпните находища. Направени са препоръки за подобряване състоянието на вида чрез включването му в Прил. 3 на Закона за биологичното разнообразие, реинтродукция на *ex situ* размножени индивиди, образователни мероприятия в еко-училища и култивиране от местното население. Подобни препоръки са направени и за *S. syriaca*, чиито популации са в критично състояние. Макар и определено като неблагоприятно, състоянието на *S. lanata* е относително най-стабилно, тъй като не е лечебен вид и препоръките за подобряването му са свързани с опазване на местообитанията, а не с увеличаване на числеността му.

На базата на много трудоемкия морфометричен анализ са установени някои различия между *S. scardica* и *S. syriaca*, като нивото на фенотипна изменчивост е високо до много високо. Същевременно са отбелязани специфични белези за популацията до Червената стена, която заема междинно място и за таксономичното ѝ определяне са препоръчани допълнителни проучвания.

Ембриологичните изследвания хвърлят допълнително светлина върху проблемите на разпространение на *S. syriaca*. Видът е определен като полово размножаващ се, с висока поленова и семенна жизненост и съответно висок репродуктивен капацитет, но подобно на *S. scardica*, ниската пластичност на мъжката и женската генеративна сфера ограничават адаптивните му механизми.

Количествените фитохимични анализи при *S. scardica* са повторени в три последователни години и дават надеждна информация за съдържанието на полифенолни съединения и флавоноиди. Направени са сравнителни изследвания между отделните видове, между находищата на *S. scardica*, както и между диворастящите и култивираните растения от *S. scardica* и *S. syriaca*. Допълнително е изследвана зависимостта на съдържанието на тези биологично-активни вещества от надморската височина и скалната основа, както и динамиката им през пролетта и лятото в някои култивирани площи. Правилно е установена тенденция към увеличаване съдържанието на фенолите и флавоноидите с увеличаване на надморската височина, като аномалиите при някои височини са обяснени с комплексното въздействие на екологичните фактори. При спазване на условията за правилно пробовземане и сушене, не се наблюдават съществени различия в концентрациите на феноли и флавоноиди през годините. Култивирането на *S. scardica* и *S. syriaca* е определено като целесъобразно предвид високото съдържание на биологично-активните вещества, равняващо се и дори превишаващо в някои случаи това на диворастящите. Отбелязано е и голямото значение на достатъчната осветеност и на умереното поливане за нормалния растеж и биосинтез. Съдържанието на общи полифеноли и флавоноиди е значително по-ниско при *S. lanata*.

Цитотоксичната активност на метанолов екстракт от *S. scardica* върху клутъчна линия от злокачествен тумор, е висока, което дава нови перспективи за приложението на този лечебен растителен вид.

Финансираният от МОСВ (ПУДООС) през 2013 г. проект за опазване и устойчиво ползване на *S. scardica*, дава възможност за създаване на посадъчен материал от мурсалски чай в оранжерията на ИБЕИ, създаване на опитна площ в Западни Родопи за култивиране на вида в природни условия, разясняване на критичното му състояние на местните хора и предоставяне на разсад и консултации за създаване на насаждения. В резултат на

изпълнението на проекта, през март 2016 г. Министерът на околната среда и води издава заповед за пълна забрана за събиране на *S. scardica* от естествените му находища.

Критични бележки към дисертационния труд. Обемът на дисертацията значително надвишава препоръчителния (296 стр. с приложенията вместо 200, съответно 37 стр. Автореферат вместо 30). Структурата също е леко изменена (целта и задачите са дадени в края на увода вместо да се обособят в отделен раздел след литературния обзор; резултатите са обединени с обсъждането; вместо заключение, включващо кратко резюме на резултатите, декларация за оригиналност и изводи, са дадени само изводи; декларацията за оригиналност и достоверност е включена само в Автореферата; обобщеното заключение е заменено с няколко обособени заключителни коментара, обобщения на резултатите и междинни заключения в края на някои от подразделите).

При сканинг електронномикроскопското проучване на власинки от *S. scardica* и *S. syriaca* не е посочен критерий за установяване на отличителни белези между тях. В Извод 8 е отбелязано, че епидермисът на стъбло, лист и чашка при двата вида е със сходни белези на структурата и повърхността на покривните власинки, но в резултатите е посочено наличие на жлезисти власинки само по стъблото на *S. syriaca*. В случай, че това не се счита за видов белег, как се обяснява липсата им при *S. scardica*?

Би било интересно да бъдат сравнени морфометричните параметри на диворастящите индивиди с тези в култивираните площи, предвид влиянието на агротехническите мероприятия върху добива, още повече, че е отбелязано значението на дебелината на почвения слой за размера и проективното покритие на индивидите.

Във връзка с Извод 17 не става ясно дали има конкретни основания да се твърди, че в България съществуват находища на *S. taurica*. Така формулираният извод внушава мисълта, че находището Големия Валог в Странджа не е на *S. syriaca*, а на друг вид от род *Sideritis*. Хемотаксономичните резултати достатъчни ли са да се твърди, че посочените видове, приети във Флора на Европа като синоними, всъщност са различни видове?

Много от фигурите имат само номерация, но нямат заглавия, което затруднява възприемането на информацията.

Някои изводи биха могли да бъдат обединени (напр. 2 и 3; 4 и 5; 9, 10 и 11) или по-кратки (напр. 4, 5).

Характер на научните приноси, стойност за науката и обществото. Докторантката е представила приносите от настоящото проучване в две групи: 9 с научен характер и 5 с научно-приложен, като повечето са оригинални. Приемам това разделяне, както и самите

приноси, с малка забележка по отношение на подредбата им: Принос 4 и второто изречение на Принос 2 следва да бъдат обединени с Принос 1, тъй като го допълват; аналогично Принос 3 представлява логично продължение на първото изречение на Принос 2. Безспорна е стойността на мащабното проучване върху разпространението в България на трите целеви вида от р. *Sideritis*, направено за първи път, при което е оценено състоянието на популациите им и са открити 2 нови находища на *S. scardica*, при това на значително по-ниска надморска височина. Флористичната характеристика на 18 естествени находища в 5 флористични района на България и геоелементният анализ, с отбелязване на консервационно значимите и ендемичните видове, са много ценни от гледна точка на бъдещи дейности по опазване на растителното разнообразие в страната. Новите знания, получени при изследване степента на изменчивост на морфометричните белези на *S. scardica* и *S. syriaca*, повдигат необходимостта от изясняване таксономичното положение на находището на *S. scardica* при Червената стена (Принос 5). Значението на особеностите на биологията на размножаване, които са изследвани за първи път при *S. syriaca*, е важно при изясняване причините, довели до критично застрашен статус на вида (Принос 6). Новите научни фитохимични и фармакологични данни, представени в Приноси 7, 8 и 9, са от особено важно значение за лечебните свойства на проучваните видове от р. *Sideritis*, растящи в естествените находища и в култура. Научно-приложните приноси са много добре формулирани и са пряко свързани с установяване на ресурсите и опазването им *in situ* (Приноси 10 и 11) и с реалните възможности за въвеждане на лечебните видове *S. scardica* и *S. syriaca* в агрокултура (Приноси 12, 13 и 14). Похвален е ентузиазмът на докторантката, с който е участвала в редица дейности, ориентирани към прилагане на научните резултати от проучването си: писмо до МОСВ с искане *S. scardica* да бъде върнат в Прил. 3 на Закона за биологичното разнообразие, увенчало се с успех през март 2016, когато е издадена заповед за пълна забрана за събиране на вида от естествените му находища; създадена експериментална площ от 100 m² за култивиране на *S. scardica* в Западни Родопи, изготвяне на наръчник за култивирането му и организиране на срещи с жители от 30 селища с цел разясняване критичното състояние на вида и предоставяне на разсад и информация за култивирането му, като единствен начин за устойчиво ползване.

Качество на научните трудове, отразяващи изследванията по дисертацията. Резултатите от настоящото проучване са обобщени в 10 публикации по темата, от които 5 в научни списания и 5 в сборници от конференции. Една от публикациите от 2015 г. е в списание с импакт фактор (Biochemical Systematics and Ecology, IF 1.17), което е изискване на НС на ИБЕИ при присъждане на ОНС „Доктор“. Една статия, публикувана през 2013 г., е цитирана 2 пъти, което говори за значимостта на представените резултати. На 5 от публикациите Анева е първи и кореспондиращ автор, а на една – единствен автор. Прави впечатление и големият

брой участия в национални и международни научни форуми: общо в 12, с 15 доклади и постери. В тази връзка, общият брой събрани кредити е 1010 (при минимално изискуеми 250), като голямата част идват от публикационната дейност.

Лично участие на докторанта в изследванията. Изследванията по дисертацията са предимно лично дело на докторантката. Теренните проучвания, свързани с флористичния анализ, оценката на състоянието на популациите и морфометричните изследвания, са направени по време на командировките ѝ до всички находища на целевите видове в България и до наблюдаваните 21 култивирани площи. Ина Анева се отличава с много добра комуникативност и желание за сътрудничество с колеги от страната и чужбина, което се е отразило благоприятно върху придобитите умения за различни лабораторни анализи: ембриологичните изследвания са направени от дисертантката под ръководството на доц. Е. Янкова в Ембриологичната лаборатория на ИБЕИ, сканинг електронно-микроскопското наблюдение е извършено в Химически факултет на СУ „Св. Кл. Охридски“, количественото определяне на фенолите и флавоноидите – в ИОХФЦ-БАН, качественият състав на фенолните съединения – в Университета в Скопие, съвместно с колеги от Македония, а цитотоксичната активност на екстрактите от *S. scardica* – по време на едномесечна специализация в Институт по токсикология на храните, Университет по ветеринарна медицина в Ханوفر, Германия. Анева е прегледала хербарните образци в няколко хербариума: на Биологически факултет на СУ (SO), на Отдел Растително и гъбно разнообразие и ресурси на ИБЕИ (SOM), на Аграрния университет в Пловдив (SOA), както и в Скопски университет (Македония) и в Аристотелов университет в Солун (Гърция). В допълнение, тя е депозирала в SOM хербарни материали от всички изследвани находища.

Заключение относно присъждане на ОНС „Доктор“. Дисертационният труд на Ина Анева безспорно отговаря на всички изисквания. Поставени са амбициозни задачи, засягащи няколко области на биологичните науки, които са постигнати с много труд и целенасоченост и при голяма степен на самостоятелност. Изследванията са изчерпателни, добре обмислени и успешно реализирани, обемът на извършената работа е внушителен. Резултатите са богато онагледени с фигури и таблици, ясно интерпретирани, убедителни и значими от научна гледна точка. Изводите са верни. Приносите са предимно с оригинален характер и имат както научна, така и научно-приложна стойност. Публикациите по темата са много и качествени. Препоръчвам на членовете на уважаемото научно жури да оценят по достойнство и да присъдят на ас. Ина Йосифова Анева образователната и научна степен „Доктор“ по научно направление 4.3. Биологични науки (научна специалност 01.06.03 „Ботаника“).