

РЕЦЕНЗИЯ

на дисертация за присъждане на ОНС „Доктор“ по професионално направление 4.3. Биологически науки, Научна специалност „Зоология“ на тема „Молекулярно-популационни изследвания на местни породи кучета в България“ с автор **Мирослав Кирилов Маринов** и научен ръководител доц. д-р **Георги Радославов**

Рецензент: проф. д-р Румяна Силвиева Миронова, Институт по молекулярна биология „Академик Румен Цанев“ към Българска академия на науките

Кучето, *Canis lupus familiaris*, е първото опитомено от човека диво животно. Следите на неговото одомашняване се крият назад във времето и са тясно преплетени с живота и битата на *Homo sapiens*. Въпреки дългата история на взаимоотношенията между кучето и човека до момента липсват категорични отговори на въпросите един или няколко са били центровете на одомашняване на кучето от сивия вълк (*Canis lupus lupus*), кой (или кои) са били тези центрове, когато точно се е случило това и кога е започнала целенасочената човешка дейност, довела до съвременното разнообразие от породи. Един от надеждните подходи за отговор на тези въпроси е молекулярно-генетичният, който се прилага в областта на кинологията сравнително отскоро (от началото на века). За Балканския полуостров, в т.ч. и за нашата страна, до момента липсват молекулярно-генетични данни за съвременните местни породи кучета и вълци, както и за техните древни предшественици. Това определя значението и актуалността на дисертационния труд на Мирослав Маринов, който представя първите експериментални данни за генетичния профил, генетичното разнообразие и филогения на местни български породи кучета, както и на древни кучета, обитавали нашите земи.

На пръв поглед дисертацията прави впечатление със своята компактност, съдържателност и приятно естетическо оформление. Написана е на общо 98 стр. и включва обичайните за една дисертация раздели – увод, литературен обзор, цели и задачи, резултати, дискусия, изводи и приноси. Илюстративният материал наброява 22 фигури и 5 таблици като Фиг. 7 е представена на две места в дисертацията - в главите „Литературен обзор“ и „Резултати“. Макар че това не е общоприето, го намирам за удачно, тъй като улеснява възприемането и осмислянето на текста. Имам забележка към легендите на някои фигури, които не са достатъчно изчерпателни. Например на Фиг. 1 не е ясно съкращенията UT, UTd и SC какво означават. В дисертацията са цитирани общо 83 литературни източника, само един от които е на кирилица. Отделните части на дисертацията са добре балансирани и са написани на добър езиков и научен стил. Почти не открих съществени грешки с изключение на израза „древният ДНК анализ“ (стр. 73) вместо „анализът на древна ДНК“.

В литературния обзор са разгледани съвременните представи за произхода и одомашняването на кучето, базирани на молекулярно-генетичен анализ на майчина (мтДНК), бащина (Y-хромозомна) или смесена (ядрена ДНК) наследственост. Цитираните изследвания са провеждани с различни по обем извадки, основно от съвременни кучета и вълци, както и с археозоологичен материал от праисторически кучета и каниди. Днес е общоприето да се смята, че в центровете на одомашняване съществува най-голямо генетично разнообразие от съвременни кучета. На тази база са предположени четири центъра на одомашняване на кучето, всички локализирани в Евразия - Източна Евразия, Централна Азия, Близкия Изток и Европа. Докторантът разглежда обективно и

задълбочено експерименталните данни в полза на една или друга хипотеза. Тези хипотези често са противоречиви. Така например на базата на анализ на ядрена ДНК привържениците на хипотезата на vonHoldt и сътр. за Близкоизточния произход на кучето опровергават митохондриалната хипотеза за неговия Източноевразийски произход. От друга страна хипотезата за Централноазиатския произход на кучето почива върху внушителна по обем извадка от 5000 съвременни кучета и пълно секвениране на тяхната ядрена ДНК, като изводите са подкрепени и от анализ на митохондриални и Y-хромозомни маркери. Произходът и филогенията на кучето са разгледани и в светлината на данни от изследвания на мтДНК маркери в археозоологичен материал. Разгледано е генетичното разнообразие на древни популации кучета в три гурпи – Европа (1), Централна Азия, Северна и Южна Америка (2) и Югоизточна Азия, Австралия и Океания (3). Митохондриален клад В е слабо представен в древна Европа (Апенините), но е вторият по-честота (след А) в съвременните кучета и откриването му с висока честота в съвременни популации вълци от Балканите указва на Югоизточна Европа като възможен център на одомашняване. **Въпрос: Има ли докторантът предпочитана хипотеза за произхода на кучето, коя според него е най-правдоподобна и намира евентуална подкрепа в данни, получени с други методи (морфометрични, зооархеологични)?** В края на литературния обзор са разгледани четири местни български породи кучета. Две от породите са ловни (български барак (ББ) и българско гонче БГ) и две охранителни, каракачанско куче (КК) и българско овчарско куче (БОК), като породата БОК е селектирана след 1970 г. с цел създаване по-скоро на куче компаньон, отколкото на охранителна порода. Четирите породи, предмет на изследване в дисертацията, все още не са признати от международната киноложка организация FCI (Fédération Cynologique Internationale).

В светлината на литературния обзор целите и задачите на дисертацията са убедително аргументирани. Липсата на единно схващане за произхода на кучето до голяма степен се дължи на липсата на данни за различни географски региони, в т. ч. за Балканския полуостров. Целта на дисертацията е кратко и ясно формулирана - да се установи генетичното разнообразие на местни породи кучета в България на базата на митохондриални генетични маркери. За постигането на тази цел са набелязани четири конкретни задачи. Използваните методи са напълно адекватни на поставените цел и задачи. Анализирани са общо 130 кучета от четирите породи като чрез проследяване на родословието им е избегнато изследването на родствени животни. Анализирани проби от древните кучета са 25 и се отнасят към четири исторически епохи (Неолит, Халколит, Бронз и Късна Античност). Като генетичен маркер е използван хипервариабилен участък 1 (HVR1) от D-loop региона на митохондриалния геном. Маркерът е подходящ, тъй като е най-изследвания генетичен маркер при кучето и депозиранието множество секвенции в GenBank улесняват анализа и интерпретацията на резултатите. Следвани са стандартни протоколи за изолиране на ДНК, амплификация (PCR) и секвениране. Изолирането на древна ДНК (дДНК) е извършвано в специализирани помещения за избягване на контаминацията на ДНК. В случаи на неспецифична амплификация на дДНК е провеждан допълнителен PCR (nested PCR). Данните от секвенирането са обработвани с подходящи компютърни програми, генериращи данни за хаплотипната принадлежност, хаплотипното и нуклеотидно разнообразие, степента на еднородност на дадена популация и филогенетичните взаимоотношения на мтДНК хаплотипите. За графично представяне и

обобщаване на филогенетични връзки е използван принципен компонентен анализ (PCA), в който всяка хаплогрупа е третирана като дискретна променлива.

В две отделни части на глава „Резултати“ са представени данните за съвременните местни породи кучета и за древните обитатели на нашите земи. В съвременните български породи са установени общо 38 хаплотипи, от които 19 уникални. Освен това в два от уникалните хаплотипи е намерен неописан досега полиморфизъм в резултат на транзиция в рамките на субклад D2b, която е дефинирана като специфична за района на Балканите. Тези резултати допринасят за обогатяване на базите данни за хаплотипното разнообразие при съвременните кучета. Най-голямо генетично разнообразие е наблюдавано при БОК и най-малко при КК, а тестът за еднородност показва, че популацията на БГ е по-еднородна от тази на КК. Направен е изводът, че популацията на БГ е с най-запазена чистопородна структура. **Въпрос: Как може да се обясни фактът, че генетичното разнообразие при КК е по-малко от това при БГ, но популацията на БГ е по-еднородна от тази на КК?** Принципният компонентен анализ ясно разделя групата на ловните от групата на овчарските кучета и предполага техния независим произход. Разпределението на честотите на основните кладове при съвременните български кучета следва това в световен мащаб, т.е. най-представен е клад А, следван от В, С и D като всяка от четирите породи показва уникално разпределение на честотите на отделните субкладове. Наблюдавана е отчетлива разлика в генетичния профил на ловните и овчарските породи – висока честота на субклад С1 и липса на клад D при ловните и обратно – липса на клад С и висока честота на субклад D2 при овчарските кучета. Открит е специфичен за БОК субклад (A1g). Уникалната комбинация от субкладове, както и наличието на специфични такива се явяват своеобразни генетични „паспорти“ за идентификация на отделните групи/породи. Създаването на БОК чрез кръстосването на КК с азиатски породи кучета намира добро потвърждение в данните от молекулярно-генетичния анализ: Намерени са субкладове от A2 до A5, които са с азиатски произход, както и общ субклад за КК и БОК (A1ab). На практика този резултат е показателен за акуратно проведените експериментални и биоинформатични изследвания от докторанта и за достоверността на докладваните резултати.

Анализираната извадка от древните кучета е значително по-малка, но това е обяснимо както с ограниченото разнообразие от археозоологичен материал, така и с трудности при изолирането на дДНК. Изследването е започнало с 25 проби, но е определена хаплогрупувата принадлежност само на 16 от тях поради проблеми с амплификацията на дДНК. **Въпрос: За определяне на хаплогрупите на древните кучета е използван по-малък участък от HVR1 региона, а не цялата секвенция от 730 нд, използвана за определяне на хаплогрупите на съвременните кучета. Може ли това да бъде причина за неточно определяне на хаплогрупувата принадлежност на древните кучета?** Те са отнесени към три хаплогрупи – А, В и D. Прави впечатление отсъствието на клад С. Докторантът анализира базите данни за 230 древни кучета и открива, че клад С е присъствал в праисторическите кучета, основно от Западна Европа и Скандинавия, което предполага европейски произход на клад С в съвременните местни породи кучета.

Глава „Дискусия“ е обстойна и задълбочена. Получените резултати са дискутирани в контекста на исторически данни за живота и бита на *Homo sapiens*, морфометрични данни за древни кучета и текстове на древногръцки философи. Анализът на експерименталните резултати и обсъждането им в светлината на съвременната научна литература води до важни изводи. В българските породи кучета се наблюдават както

типично европейски, така и типично азиатски митохондриални субкладове като генетичният профил на ловните породи указва по-скоро на техния европейски произход. Филогенетичните изследвания очертават ясна граница между ловните и овчарските кучета, което говори за изолирана популационна структура на двете групи породи. Не е установена генетична интрогресия на четирите породи с географско близки популации. Откриването на два уникални хаплотипа в неустановения досега субклад D2b със специфична само за нашите овчарски кучета нуклеотидна замяна предполага местен произход на тези породи. Макар че изследваната извадка от древни кучета е малка, включването в биоинформатичните анализи на бази данни за 250 древни кучета позволява на докторанта да заключи, че древните популации са били по-хомогенни от съвременните. Кладове А и В се откриват в древните кучета, обитавали нашите земи, както и в други южноевропейски региони, но не са характерни за древна Централна и Западна Европа, от където следва, че най-вероятно във времето и в резултат на миграционни процеси древните южноевропейски популации са заменили европейските. На базата на собствени и литературни данни за разпространението на клад В сред древните и съвременни популации вълци и кучета е допуснато възможно одомашняване на Балканите от местни балкански вълци.

В края на дисертацията са формулирани общо 12 извода, 6 приноса с оригинален характер и два с потвърдителен, които вярно отразяват представените в дисертацията резултати и към тях нямам забележки и въпроси. По темата на дисертацията са публикувани две статии в международни списания, които се реферират в Scopus и Web of Science. Общият импакт фактор на статиите е 5.7 и към момента на написване на дисертацията е забелязано едно цитиране. Всички разчетени секвенции (около 150 на брой) са депозирани в GenBank. Резултатите са представени на 4 национални научни форуми, включително на такива с международно участие чрез 3 устни доклада и един постер. На едно от мероприятията докторантът е получил грамота за добро представяне.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Дисертационният труд на Мирослав Маринов е актуален и уникален за нашата страна и региона на Балканите. Получени са значими научни резултати, които обогатяват съвременната представа за произхода, одомашняването и филогенията на *Canis lupus familiaris*. Доказателство за това е публикуването на резултатите в четени и цитирани международни списания. Някои от резултатите имат определена практическа стойност, като доказване чистотата на някои от породите и откриването на специфични генетични маркери за тяхната идентификация, което би допринесло за признаване на българските породи кучета от международната киноложка организация. Дисертационният труд отговаря на всички формални изисквания на Закона за Развитието на Академичния състав в Република България и на Правилника за неговото приложение, както и на правилниците на Центъра за обучение и на Института по биоразнообразие и екосистемни изследвания на БАН, което ми дава основание да гласувам убедено „ЗА“ присъждане на образователната и научна степен „Доктор“ на Мирослав Кирилов Маринов по професионално направление 4.3. Биологически науки, Научна специалност „Зоология“.

17.01.2020 г.

Рецензент:
/проф. Р. Миронова/