

Вх. № 149/НО-05/15.02.2021 г.

До
Научното жури определено със
Заповед на Директора на ИБЕИ-БАН
№ 98 / 29.12.2020 г.

РЕЦЕНЗИЯ

върху дисертационен труд за получаване на образователната и научна степен „доктор” по: област на висше образование 4. Природни науки, математика и информатика, професионално направление 4.3. „Биологични науки“, научна специалност: 01.06.03 – Ботаника

Автор на дисертационния труд: маг. инж. Стоян Стефанов Стоянов

Научен ръководител: проф. д-р Светлана Темелкова Банчева

Тема на дисертационния труд: „Таксономично проучване на род *Vupleurum* L. (Ariaceae) в България“.

1. Актуалност на проблема.

Таксономичните проучвания на дадена естествена организмова са основополагащи за установяването на нейния състав, изменчивост, таксономична структура и филогения. Въпреки че растителната таксономия и систематика имат вече близо тривековна история, изучаването на разнообразието чрез прилагане на различни методи продължава и днес да надгражда постигнатото, да подлага на критичен анализ предходните изследвания и да актуализира таксономичните схеми. Всичко това определя таксономията като една динамична и винаги актуална наука. Нейните резултати са пряко свързани с изучаването, инвентаризацията и опазването на биологичното разнообразие. *Vupleurum* е един от най-големите родове в семейство Ariaceae, наброяващ около 150 вида. Актуалността на темата произтича от остаряването на информацията за род *Vupleurum* във „Флора на Европа“, в която според Tutin (1968) родът е представен с 39 вида. А днес европейските видове на този род, според Евро-Медитеранската база данни, са вече над 55. Това увеличение на разнообразието на рода с почти 40% се дължи, както на промените в ранга на някои вътревидови таксони, така и на описването на нови видове за науката. Разработката за род *Vupleurum* във „Флора на НР България“ на Асенов (1982) също се нуждае от актуализиране. Промените се дължат на издигането на някои вътревидови таксони от ранг на подвид в ранг на вид, на съобщаването на нови видове за страната и на отхвърлянето на погрешно посочвани за България видове.

2. Степен на познаване състоянието на проблема и творческа интерпретация на литературния обзор.

Направеният литературен обзор по темата показва, че проблемът е важен и актуален в световен мащаб, което налага разработване на въпроса и в България. Обзорът е актуален и информативен. Цитирани са общо 183 литературни източника, от които 73 на

кирилица и 110 на латиница. Дисертанта демонстрира отлично познаване и творческо интерпретиране на широк кръг от български и чуждестранни научни публикации, свързани с темата на изследване.

3. Цел и задачи на изследването.

Целта на изследването е формулирана ясно и точно – **биосистематично проучване за установяване на видовия състав, таксономичната структура и разпространението на род *Vupleurum* в България.** За постигане на целта са били поставени 8 задачи, които, считам, че са релевантни и правилно формулирани.

4. Обект и материал на изследването.

В настоящия дисертационен труд обект на изследването са представителите на род *Vupleurum* във флората на България. Актуализирана е информацията за едногодишните видове *Vupleurum* в България, съобразно разработката на Snogerup & Snogerup (2001), и са включени данни и за многогодишните представители на рода. Таксономичната схема на българските видове *Vupleurum* е анализирана в по-широк контекст като е направен опит за изясняване на връзките и групирането на българските преставители с близкородствените балкански и малоазиатски видове.

Установяването на видовия състав и таксономичната структура на род *Vupleurum* в България се основава на преглед и ревизия на 912 хербарни образеца (в т.ч. 111 собствени сборове, събрани в периода 2003–2018), съхранявани в хербариумите на Института по биоразнообразие и екосистемни изследвания–БАН (SOM), Софийския университет (SO), Аграрния университет в Пловдив (SOA), регионалния природонаучен музей в Пловдив, Националния музей на Чехия (PR) и Карловия университет в Прага (PRC).

Номенклатурните промени, настъпили по отношение на третирането на някои вътревидови таксони, и издигането им в ранг на вид (Snogerup & Snogerup 2001) също са отразени при актуализирането на видовия състав на рода за България.

Разпространението на видовете на род *Vupleurum* в България е установено въз основа на информацията от хербарните образци и данни от литературните източници, свързани с флористични и геоботанически проучвания на български и чуждестранни изследователи в различни части на България.

За видовете *Vupleurum* с природозащитен статус е посочена категорията, определена по критериите на IUCN, както и присъствието им в Закона за биологичното разнообразие и Червена книга на Република България (Пеев и др. 2015).

5. Методи на работа.

Експерименталната част от изследването е проведена на съвременен научно равнище с използване на подходящи методики на проучване. В работата са използвани и усвоени няколко групи от методически подходи.

5.1. Теренни проучвания

Теренните проучвания включват голяма част от флористичните райони на България. С по-голяма концентрация са проучванията в южните части на страната, поради високото разнообразие на едногодишните видове. Планинските райони на страната, и по-конкретно Средна и Западна Стара планина, Витоша и Рила са посетени във връзка с изследването на многогодишните представители на род *Vupleurum*.

Хорологичната информация от хербарните и литературните източници за всеки вид е обобщена в табличен вид по флористични райони и е илюстрирана върху картна основа с флористичните райони и UTM гридове 10 × 10 km. Флористичното райониране следва Флора на Народна Република България (Йорданов 1966).

За определянето и ревизирането на хербарните образци е използвана бинокулярна лупа. Наблюдението и заснемането на митотичните пластинки при кариологичните изследвания е направено с Trinocular Stereo Microscope Nikon Eclipse 50i с вградена фотокамера при увеличение 100×/1.25 и имерсионна течност. За снимането на общ план и детайли на растенията на терен е използван фотоапарат Cannon EOS 350D. Макрофотографиите на венчелистчета и плодовете са направени със Stereo Microscope Zeiss Stemi 2000-C (zoom 0.65×–5.0×), оборудван с фотоапарат Cannon EOS 350D.

5.2. Сравнително-морфологичен метод

Морфологичните описания на българските видове на род *Vupleurum* са изготвени въз основа предимно на собствени наблюдения и по литературни данни. Те включват следните по-важни белези – общ хабитус и тип разклоняване на стъблото, форма и жилкуване на листата, форма, жилкуване и брой на прицветници и присъцветници, брой и размери на лъчите на сенника, форма, размери и багра на венчето, и особеностите на плодовете (форма, размери, наличие на образувания, размер на стълбчето и стилоподиума, брой и размер на маслените канали и др.).

Таксономичната принадлежност на събрания хербарен материал и на образците от хербарните колекции е определена с помощта на някои от съвременните таксономични разработки за род *Vupleurum* (Tutin 1968; Snogerup & Snogerup 2001). С оглед коректното прилагане на имената на таксоните е извършено изследване на някои от достъпните типови образци.

Цитатните блокове включват източника, където видът е публикуван за първи път (протолога), всички издания на Флора на България (Velenovsky 1891, 1898; Стоянов и Стефанов 1925, 1933, 1948; Стоянов и др., 1967; Асенов 1982) и Флора на Европа (Tutin 1968). За видове, при които не са настъпили в номенклатурни и таксономични промени, се цитират само оригиналното произведение, първоизточника за флората на България, Флора на Европа и том 8 от многотомната флора на България (Асенов 1982).

Въз основана па прилагането на сравнително-морфологичния метод при прегледа на хербарните образци са извършени таксономични ревизии и са отразени настъпилите номенклатурни промени по отношение на някои вътревидови таксони.

5.3. Кариологичен метод

Хромозомният брой и кариотипът са изследвани в митотични метафазни пластинки, получени главно от коренови връхчета и по-рядко от първите листа (котиледоните) на покълнали в петри семена (за едногодишните) и от коренови връхчета на отгледани в саксии индивиди (за многогодишните).

Кореновите връхчета предварително са обработени по стандартна методика, като оцветяването е с хематоксилин по Gomori (Melander & Wingstrand 1953). За характеризиране на морфологията на хромозомите е използвана номенклатурата, съгласно Levan & al. (1964), в основата на която лежи позицията на центромерата спрямо дължината на хромозомите.

5.4. Анатомино-морфологичен анализ на мерикарпите

За целта на анатомичното изследване мерикарпи от всички изследвани видове са били рехидратирани в дестилирана вода за 24 часа, след което фиксирани във ФОА.

Последващата обработка е извършена по общоприетата класическа парафинова методика (Romeis 1948). Включеният в парафин материал е нарязан с ротационен микротом Leica (с дебелина на срезите от 8 до 10 μm) и доведен до трайни микроскопски препарати, чрез включване на срезите в препарата Enthelan. Оцветяването на напречните прерези е направено с хематоксилин по Heidenhain (1886). Наблюденията са проведени със светлинен микроскоп Olympus CX21. Микрофотографиите са направени с дигитална камера Infinity Lite, 1.4 megapixel.

5.5. ISSR (Inter Simple Sequence Repeat) – Междумикросателитни маркери

ISSR методът е високо информативен и съчетава бързината на RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) с надеждността на SSR (Simple Sequence Repeat) методите. Тези особености, в комбинация с по-високата му възпроизводимост, го правят по-удобен от останалите при изследване на генетични вариации, особено в близкородствени видове (Nagaoka & Ogihara 1997). Този метод е приложен за избрани видове от род *Vupleurum*.

Методът за проучване на генетичното разнообразие включва следните етапи:

Изолране на геномна ДНК. Геномната ДНК е изолирана посредством модифициран СТАВ-метод (Doyle & Doyle 1987) без последващо пречистване. За целта е използван съхраняван в силикагел и добре изсушен листен материал, събран от естествените находища на род *Vupleurum*. Качеството и концентрацията на изолираната геномна ДНК са определени с помощта на Nanodrop ND-1000 спектрофотометър (Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA). *PCR-реакции на амплификация.* За охарактеризиране на генетичното разнообразие на видовете *Vupleurum* са използвани 8 ISSR маркера, подбрани от общо 35, въз основа на високата им степен на полиморфизъм. PCR-амплификацията е проведена на PCR-апарат TC-5000 (Techne, Staffordshire, UK).

5.6. Статистически анализ на получените резултати от ISSR анализа.

За характеризирание на генетичната структура и разнообразие на популациите от *B. boissieri* са използвани GelAnalyzer 2010a и GenAlEx2010a v.6.4. Амплифицираните недвусмислени бендове са отчетени с програмата GelAnalyzer 2010a, с цел автоматизиране на анализа и са разпределени за съставяне на матрица според липса/наличие на съответния банд. Генотипирането се допълва и с визуална проверка с цел да се сведат до минимум грешките при анализа.

6. Онагледеност и представяне на научните резултати.

Представеният за рецензиране дисертационен труд е добре структуриран в седем глави. Дисертацията съдържа 143 страници, 84 фигури (в т.ч. 5 фигури с микрофотографии на венчелистчета, 6 с микрофотографии на митотични пластинки на кариотипове, 17 с микрофотографии на мерикарпи и напречни прерези), 10 таблици и 1 Приложение, в което са описани прегледаните и ревизирани хербарни образци и източниците на хорологична информация. Това отлично онаглеждава представените в дисертационния труд резултати от изследването.

7. Обсъждане на резултатите.

Резултатите от теренните, морфологичните, таксономичните, кариологичните, анатомичните и генетичните изследвания, са подробно и на високо професионално ниво обсъдени в текста на дисертационния труд в четвърта глава и са направени съответните заключения и изводи, произтичащи от тях. Може да се констатира факта, че дисертанта Стоян Стоянов се е изградил като опитен учен-изследовател в областта на ботаниката.

8. Изводи и препоръки.

В резултат на извършената работа дисертанта предлага 12 извода и 9 приноса.

Изводи:

7.1. Балканският полуостров се явява един от центровете на биоразнообразие на едногодишните видове *Vupleurum*, което се потвърждава и от таксономичния състав на рода в България, включващ 14 едногодишни и 3 многогодишни вида.

7.2. В таксономията на *Vupleurum* най-висока таксономична стойност имат формата, жилкуването и структурата на присъцветниците и прицветниците, особеностите на венчелистчетата и характеристиките на мерикарпа.

7.3. Най-често срещаното основно хромозомно число при българските представители на *Vupleurum* е $x=8$. Само при два вида (*B. flavum* и *B. ranunculoides*) е установено основно число $x=7$.

7.4. Липсата на хибриди, дори между много сходни видове, както и полиплоиди, особено при едногодишните видове *Vupleurum*, води до заключението, че основният еволюционен механизъм в рода е бързото и лесно изграждане на генетични бариери въз основа главно на хромозомна изолация. По-рядко срещана еволюционна тенденция в рода е промяна в основното хромозомно число – установена е низходяща дисплоидия.

7.5. Броят и размерите на маслените канали в плода имат важна таксономична стойност сред представителите на секция *Juncea*.

7.6. Установено е ниско генетично разнообразие в популациите на *B. boissieri* в България и Румъния, но с ясна пространствена диференциация между тях.

7.7. Установено е групиране в общ клъстер на пространствено отдалечени популации при Кацелово, Острица и Аксаково, което дава основание да се смята, че ареалът на вида в миналото вероятно е бил много по-обширен.

7.8. Североизточна България и по-конкретно Добруджа се явява най-ценната територия за род *Vupleurum* в България. В нея попадат реликтни части от ареалите на два от най-редките видове на род *Vupleurum* на Балканите – *B. boissieri* и *B. pauciradiatum*.

7.9. *Vupleurum boissieri* и *B. pauciradiatum* могат да се разглеждат като индикатори за реликтни степни местообитания и характерни видове за природно местообитание 62С0 Понто-Сарматски степи. *Vupleurum tenuissimum* и *B. euboeum* са привързани към халофитните местообитания.

7.10. Представителите на секция *Aristata*, чийто център на разнообразие са Западните Балкани и Егейския район, се срещат главно в южните части на страната и се явяват средиземноморски елементи в българската флора. *Vupleurum apiculatum* и *B. flavum* са авфтохтонни елементи на нашата флора, докато *B. odontites* е неофит.

7.11. При секция *Aristata* морфологично най-близките видове са разпространени в съседни географски области – южните Балкани и западните части на Мала Азия – т.е. дискретността в белезите между отделните таксони е обусловена както от генетични бариери, така и от географската изолация.

7.12. По-голямата част от представителите на секция *Juncea*, като *B. aequiradiatum*, *B. asperuloides*, *B. boissieri*, *B. commutatum*, *B. euboeum* и *B. pauciradiatum* имат дизюнктивни Балкано-Анадолски ареали и в пределите на Мала Азия те се срещат симпатрично с техните близки родственици.

8. Приноси на дисертационния труд.

Приносите в докторската работа могат да бъдат разделени на 2 групи – научно-фундаментални и научно-приложни:

8.1. Научно-фундаментални приноси:

- Извършено е сравнително-морфологично изследване на представителите на род *Vupleurum* в България и е уточнен таксономичния му състав. Направени са морфологични описания на възприетите 17 вида и са актуализирани данните за тяхното разпространение;
- Установени са три нови вида *Vupleurum* за флората на България – *V. ranunculoides*, *V. pauciradiatum* и *V. boissieri*, и е потвърдено разпространението на наскоро посочения по литературни данни вид *V. euboicum*. Отхвърлени са три таксона, погрешно посочвани за България – *V. baldense* subsp. *gussonei*, *V. gerardi* и *V. tenuissimum* subsp. *gracile*. Погрешно използваното име *V. sibthorpiatum* е заменено с *V. falcatum* subsp. *cernuum*;
- За пръв път е изготвен ключ за разграничаване на секциите на род *Vupleurum* в България и е съставен нов ключ за определяне на видовете.
- За пръв път белезите на венчелистчетата са анализирани като таксономично значими за разграничаване на секциите и видовете в род *Vupleurum*;
- За пръв път за науката са установени хромозомните числа на 10 едногодишни вида *Vupleurum* – *V. aequiradiatum*, *V. affine*, *V. apiculatum*, *V. asperuloides*, *V. boissieri*, *V. commutatum*, *V. euboicum*, *V. flavum*, *V. pachnospermum* и *V. pauciradiatum*;
- Установено е, че анатомичното устройство (броят и размерите на маслените канали) на мерикарпите пряко корелира с морфологичните белези и е важна характеристика за междусекционно и вътресекционно групиране на видовете;
- За пръв път е направено изследване на генетичното разнообразие на популациите на *V. boissieri*.

8.2. Приноси с научно-приложен характер:

- Направени са оценки по Критериите на IUCN за видовете *Vupleurum longifolium*, *V. ranunculoides*, *V. odontites* и *V. flavum* във връзка с публикуването на Red List of Bulgarian vascular plants и са разработени статии за три вида за Червена книга на Р. България, Том 1. Растения и гъби – *Vupleurum longifolium*, *V. ranunculoides* и *V. odontites*;
- Изготвено е Предложение до МОСВ и е обявена Защитена местност „Находище на уехтрицова урока – село Острица” за опазване на *Vupleurum uechtritizianum*.

9. Оценка на степента на личното участие на дисертанта в приносите.

Приносите в представената за рецензиране работа са лично дело на дисертанта, за което може да се съди по представените публикации по темата на доктората и голямата продължителност на периода, в който докторанта е работил по дисертацията.

10. Критични бележки.

Представения дисертационен труд е разработен перфектно и може да служи като учебник за подобен вид докторати, както и за подробен богато илюстриран определител на видовете от род *Vupleurum*. Вижда се, че над текста е работено дълго време и е постигната рядко срещана в подобен труд прецизност. Все пак ще си позволя една малка терминологична бележка:

1. Желателно е вместо латинския и английския термин „хабитат“ да се използва българското „природно местообитание“ или просто „местообитание“.
2. Термина „авфтохтонен“, който се среща на стр. 130 и 131 е правилно да се изписва „автохтонен“.

<https://ibl.bas.bg/rbe/lang/bg/%D0%90%D0%92%D0%A2%D0%9E%D0%A5%D0%A2%D0%9E%D0%9D%D0%95%D0%9D/>
<https://bg.wikipedia.org/wiki/%D0%90%D0%B2%D1%82%D0%BE%D1%85%D1%82%D0%BE%D0%BD%D0%B8%D1%8F>

11. Автореферат.

В представения автореферат е отразена изцяло и подробно същността на дисертацията и може да се констатира, че той напълно отговаря на изискванията на Закона. Автореферата е разработен на 42 страници и включва 10 фигури, 3 таблици и списък от 33 литературни източници, цитирани в него.

12. Публикувани статии по темата на доктората.

Част от резултатите от изследванията на автора, свързани с дисертационния труд, са представени и обсъдени в 3 публикации излезли в периода 2009-2019 година.– един доклад на IV Балкански ботанически конгрес и 2 статии в престижното ботаническо списание „Phytotaxa“ което притежава импакт-фактор. Две от публикациите са самостоятелни и една е в съавторство, като докторанта е на първо място. Също така, резултатите от проучването са докладвани и апробирани на две международни конференции в чужбина през 2018 и 2019-та година. Дисертанта е установил 4 цитирания на тези публикации в престижни международни списания.

13. Лични впечатления от дисертанта.

Познавам Стоян Стоянов още от студентските му години в Лесотехническия университет в София. Като студент той беше активен член на Студентския клуб по опазване на природната среда и проявяваше особен интерес към ботаниката и дендрологията. По време на разработването на дипломната му работа, свързана с ботаническо изследване на Природен парк „Русенски лом“, той откри нов вид за флората на България, което говори за ботаническата му подготовка още през студентските му години.

14. Заключение.

Въз основа на усвоените и приложените от докторанта разнообразни методи на изследване, направените обобщения и изводи считам, че докторанта отлично се е справил с поставената цел и задачи и представеният дисертационен труд изцяло отговаря на изискванията на ЗРАСРБ и Правилника за условията и реда за придобиване на научни степени и за заемане на академични длъжности, което ми дава основание да го оценя високо.

Позволявам си да предложа на членовете на почитаемото научно жури, при успешна защита, да гласува положително и да присъди на маг. Стоян Стефанов Стоянов образователната и научна степен “доктор” по научната специалност: 01.06.03 – Ботаника

Дата: 10.02.2021 г.

ИЗГОТВИЛ РЕЦЕНЗИЯТА:

(проф. д-р Александър Ташев)