

РЕЦЕНЗИЯ

от

Проф. д-р, дбн Параскева Владимирова Михайлова,

Институт по биоразнообразие и екосистемни изследвания, БАН

на дисертационен труд за присъждане на научна степен “**доктор на науките**” в област на висше образование: **4. Природни науки, математика и информатика**; професионално направление: **4.3. Биологични науки**; научна специалност “**Генетика**”

Автор: Проф. д-р Евгения Нешова Иванова, Пловдивски Университет „Паисий Хилендарски“, Биологически факултет, катедра „Биология на развитието“

Тема: Популационно-генетична изменчивост на *Apis mellifera* L. в България

Предмет на рецензиране

Със заповед № **P33-5391** от **21.11.2016** г. на Ректора на Пловдивския университет „Паисий Хилендарски“ (ПУ) съм определена за член на научното жури за осигуряване на процедура за защита на дисертационен труд на тема „Популационно-генетична изменчивост на *Apis mellifera* L. в България” за придобиване на научна степен „доктор на науките“ на ПУ в област на висше образование: **4. Природни науки, математика и информатика**; професионално направление: **4.3. Биологични науки**; научна специалност: **Генетика**. Автор на дисертационния труд е **проф. д-р Евгения Нешова Иванова, Пловдивски Университет „Паисий Хилендарски“, Биологически факултет, катедра „Биология на развитието“**

Представеният от проф. д-р Евгения Нешова Иванова комплект материали на хартиен носител е в съответствие с чл. 45 (4) от Правилника за развитие на академичния състав на ПУ и включва следните документи: молба до Ректора на ПУ за разкриване на процедурата за защита на дисертационен труд; автобиография в европейски формат; нотариално заверено копие от диплома за образователна и научна степен „доктор“, протокол от предварителното обсъждане в катедрата; автореферат; списък на публикациите по темата на дисертационния труд; дисертационен труд; справка за спазване на специфичните изисквания на съответния факултет; декларация за оригиналност и достоверност на приложените документи; копия на публикациите по темата на дисертационния труд; списък на участия в международни научни форуми с цел популяризиране на получените

резултати; списък с цитирания и доказателства за тях на електронен носител; комплект документи на хартиен носител от т. 1 до т. 12 – 4 броя; на електронен носител – 8 броя.

Проф. Иванова е приложила всички необходими документи, изготвени съгласно Правилника за развитие на академичния състав на ПУ. Представени са копия от 20 научни публикации по тематиката на дисертационния труд, съответни цитирания, свързани с дисертационния труд, както и списък на участие в национални и международни форуми.

Кратки биографични данни. Проф. д-р Е. Иванова завършва през 1982г. магистратура в ПУ „Паисий Хилендарски“ - преподавател по „Биология“ с втора специалност „Химия“. През 1996 получава образователната и научна степен „Доктор“ по научната специалност „Генетика“. До 2006 г. работи като гл. асистент по „Генетика“ в ПУ, „Паисий Хилендарски“. До 2012 г. е доцент по „Генетика“, а от 2012 е професор по „Генетика“ към ПУ „П. Хилендарски“. Чете редица лекции в тази област, като Обща генетика, Медицинска генетика, Биологични основи на поведението и генетика, ръководител е на упражненията по Обща генетика, на семинари по Биологични основи на поведението и генетика, координатор на магистърска програма „Генетика“, координатор на магистърска програма „Биология и психология на развитието“, ръководител на лекции в ОКС „Магистър“ по Генетика на човека, Генетика на поведението, Принципи на генетичното консултиране, Генетична диагностика. От 2012 до 2016 г. е професор и директор на Филиал – Смолян към ПУ. Тук чете лекции по Обща генетика и Генетика на поведението и провежда множество упражнения. От 2015 г. е ръководител на катедра „Биология на развитието“ към ПУ „П. Хилендарски“ с всички административни и научни задължения като зав. катедра. Автор и съавтор е на общо 107 публикации, с общ импакт фактор 22.496 /H индекс - 8/. Изготвила е 5 учебника и учебни помагала. Намерени са 222 цитирания. Участвала е в 22 научни проекта, от които на 9 е ръководител. Ръководител е на докторанти в областта на „Генетиката“. Член е на: Съюза на Учените в България (СУБ); член на Европейската асоциация по апидология (European Association for Bee Research); на Управителния съвет на Националната развъдна асоциация по пчеларство (НРАП); на Research Network for Sustainable Bee Breeding (RNSBB). Участвала е в 46 международни научни форуми по тематиката и целесъобразност на поставените цели и задачи

Обектът на проучване в дисертационния труд на проф. Е.Иванова, медоносната пчела, е важен от теоретична и практическа гледна точка вид. Той широко се използва за

проследяване и изясняване на редица теоретично-биологични проблеми: еволюция, пол детерминиращ механизъм, популационна генетика, селекционна дейност, поведение и др. Заедно с това медоносната пчела има важно стопанско и медицинско значение: тя е основен опрашител в живата природа, производител на пчелен мед, пчелен восък, пчелно млечице и др. Тя е незаменим обект в хранителната индустрия и медицината. Разработването на популационно-генетичната характеристика на медоносната пчела от България, Балканския п-ов и някои Европейски страни има важно стопанско и теоретично значение за охарактеризиране структурата на популацията, генетичните процеси в нея и съхраняването на генетичния фонд. Проблемът е особено важен, като се имат предвид тревожните сигнали в цял свят за повишената смъртност при медоносната пчела, загиването на цели популации и пчелни семейства, както и значимото генетично замърсяване. Всичко това определя актуалността на дисертационния труд; неговата разработка създава възможност нашата страна да се включи в активната научно-изследователска и приложна дейност към проект на ЕС и специално в работната група „Разнообразие и жизненост на медоносните пчели“, където активно участват проф. Иванова и нейният екип.

Изучаването на генетичната характеристика на подвида *Apis mellifera macedonica* от България, Балканския п-ов и други страни от Европа - основна цел на докторския труд, има важно стопанско и теоретично значение. То ще позволи да се хвърли светлина върху генетичната диференциация на подвида у нас, да се открият множество специфични популационно-генетични и таксономични маркери, с цел използването им в консервационната биология и селекционната практика в България. Важно е да се подчертае, че за реализирането на тази своя цел д-р Иванова прилага редица съвременни генетични подходи и голям арсенал от статистически анализи.

Познаване на проблема

Литературният обзор е ясен и изчерпателен, засяга въпроси, разработени в дисертационния труд и дава яснота върху проблема, който разработва проф. Иванова. Развит на 22 стр., разделен на 4-ри подраздела /1. Социално поведение; 2. Класификация на медоносните пчели; 3. Проучвания на генетичната изменчивост на *Apis mellifera* чрез прилагане на методите на протеинов и изоензимен анализ; 4. Проучвания върху генетичната изменчивост чрез методите на молекулярно-генетичен анализ/, той създава впечатлението,

че д-р Иванова е много добре запозната с постиженията в световен аспект на разработвания от нея проблем. Тя прави анализ не само на постиженията в областта на изследване на генетичната хетерогенност на популациите на медоносната пчела и нейните подвидове, но и разглежда поведението на медоносната пчела, както и някои особености от социалния живот на пчелното семейство, като го представя като обособена биологична единица. В подглавата „Класификацията на медоносната пчела“ проф. Иванова прави детайлна таксономична характеристика на род *Apis*, като споделя и собствено виждане за еволюционните тенденции в рода. Д-р Иванова подробно, с вещина и собствено мнение разглежда постиженията в проучване на изоензимния полиморфизъм, RAPD анализа, митохондриална ДНК, и микросателитна ДНК при различни видове медоносни пчели. Подчертава се значението на тези подходи за популационно-генетични, филогенетични и таксономични цели. След като очертава значението на тези изследвания за охарактеризиране генофонда на популации медоносни пчели, представяне на генетичната изменчивост в различни популации от Европа, Америка, Австралия и Южна Африка и установяване на определени видово специфични генетични маркери, проф. Иванова подчертава необходимостта от такъв всестранен подход на изследване на медоносни пчели от България. Този комплексен подход ще хвърли светлина върху таксономичния статус на медоносната пчела в страната, определяне на специфични генетични маркери и разкриване на филогенетични връзки с Европейски популации на вида. Целта е ясно дефинирана, посветена на охарактеризиране на популационно - генетичната структура на подвида *Apis mellifera macedonica* от България. Посочени са 7 конкретни задачи със съответните методични подходи, необходими за реализиране на целта.

Методика на изследването

Тази глава е представена на 25 страници, които съдържат не само изчерпателна информация за използваните методи, но и подробен анализ на изследваните райони от България: североизточен, северозападен, северен централен, югозападен, южен централен, югоизточен. Много важно е да се отбележи, че докторантката прилага комплексен методичен подход: алоензимен анализ, анализ на митохондриален геном, сателитна ДНК. На алоензимен анализ са подложени 6 ензимни системи: малатдехидрогеназа (MDH – 1), малатензим (ME), естерази (EST -3), алкални фосфатази (ALP), фосфоглюкомутази (PGM) и хексокинази (HK). За митохондриалния анализ са използвани 16s rDNA, COI, ND5 гени

сегменти. За микросателитен анализ са включени 24 микросателитни локуса с подробности относно използваните праймери. Всички тези методи д-р Иванова владее и успешно използва при разработката на дисертационния си труд. За всеки анализ е представен обилен материал не само от страната, но и от редица Европейски страни /Полша, Франция, Дания, Италия, Гърция, Македония и др./. Анализирани са над 8000 пчели – работнички. Освен подвида *Apis mellifera macedonica* от България, в сравнителен генетичен аспект са изследвани още 6 подвида от редица Европейски страни. В проучването на докторантката е включен и селекционен материал, който тя означава, като *Apis mellifera macedonica* тип *rodopica*. Подробно са представени отделните методични подходи, които би могло да се дадат в по стегнат вид. Тук силно впечатление правят прекрасните снимки, които са използвани като ключ за отчитане на алоензимния полиморфизъм. Много добро впечатление прави и владееенето на богат арсенал от статистически методи и подходи, които осигуряват компетентен анализ на постигнатите резултати и предлагането на важни генетични и таксономични изводи.

Характеристика и оценка на дисертационния труд.

Главата „**Резултати и дискусия**“ е разделена на три подглави: 1. Алоензимен анализ; 2. Митохондриален ДНК анализ- mtDNA и 3. Микросателитен ДНК анализ.

1.Алоензимен анализ. В първата подглава д-р Иванова прави подробен анализ на 6 ензимни системи от 6 района на България. Тези системи са анализирани в сравнителен аспект при още три подвида на *Apis mellifera*, както и със селекционен материал, обозначен от д-р Иванова като тип „*rodopica*“. Впоследствие с голяма вещина проф. Иванова провежда и сравнителен междупопулационен анализ на *A. m. macedonica*, както и сравнителен междуподвидов анализ на територията на Балканския п-ов и на 5 подвида от различни Европейски страни. Подчертава се наличие на значим полиморфизъм на тези ензимни системи във всички изследвани популации и подвидове, като се очертават някои ензимни честоти, характерни за отделните Балкански страни и специфични за отделни подвидове. Резултатите от алоензимния анализ не само показват една висока междупопулационна изменчивост, но и генетично охарактеризиране на популациите и микроеволюционна диференциация на подвидовете. В резултат на прилагането на разнообразни статистически подходи /среден брой алели на локус, ниво на полиморфизъм, очаквана и получена хетерозиготност, генетична дистанция/, проф. Иванова посочва, че

българската популация на *A. m. macedonica*, ясно се разграничава от други популации на подвида: от Македония, Гърция, Сърбия и Албания. Заедно с това се сочи близкото родство на подвида със селекционния тип “*rodopica*“, с който образува един общ кластер, но с два клона, докато с другите изследвани подвидове *A. m. macedonica* образува самостоятелни кластери.

Тук бих искала да подчертая, че проф. Иванова не само прилага голям арсенал от статистически подходи, но използва и различни софтуерни продукти, които ѝ позволяват да разграничи *A. m. macedonica* от България от другите подвидове на вида *Apis mellifera*, както и да подчертае специфичната генетична характеристика на *A. m. macedonica* от България и нейната близост до тази от Македония и Гърция, много добре илюстрирано с графиките от фиг. 32 до 35 вкл. Изследванията на докторантката имат важен принос за установяване на генетичната характеристика на българската популация, която не се различава по външна морфология от останалите популации на подвида, макар че докторантката няма собствени данни за проведен морфологичен анализ на изследвания от нея материал. Би било добре да се посочат отчетливо специфичните популационно биохимични маркери на подвида от България, които успешно могат да се използват в селекционната практика.

2. Митохондриален ДНК анализ - mtDNA. Авторката много сполучливо характеризира генетичното разнообразие на *A. m. macedonica* чрез подробен митохондриален анализ, като са изследвани три генни сегмента 16S r DNA, COI , ND5. Въз основа на този анализ вътре- и междупопулационна изменчивост не е установена за страната. Но отново е подчертана генетичната диференциация на *A. m. macedonica*, изследвана от България и Гърция, както и между този подвид и други два подвида от Турция.

3. Микросателитен –ДНК анализ. Този тип анализ успешно се използва за разкриване генетичните особености на популацията, нейната изменчивост, за установяване на генетични маркери и филогенетични връзки. Анализирани са 24 генетични локуса, като са установени общо 260 алелни честоти. В таблици и с графики са посочени различните честоти на отделните локуси, като се подчертават тяхната популационна изменчивост при подвида *A. m. macedonica*, от България, Македония и Гърция, както и при селекционен материал от тези три страни. Подробна генетична характеристика, с честотата на тези алелни, е представена за още 4 подвида: *A. m. macedonica*, *A. m. ligustica*, *A. m. mellifera*, *A.*

m. anatolica. Всички данни са статистически обработени с посочване на средни стойности, средна грешка, брой отчетени алели, наблюдавани и очаквани хетерозиготи, фиксационен индекс. Резултатите на генетичната дистанция и близост, получени по Nei (1972) показват близко генетично сходство между изследваните популации на подвида *A. m. macedonica* от България, Македония и Гърция, но ясно диференциране на популацията от България. Близко генетично сходство се открива между *A. m. macedonica* и *A. m. carnica*, поотдалечени са *A. m. macedonica*, *A. m. ligustica* и *A. m. anatolica*. Генетично най-значима диференциация е открита между *A. m. macedonica* и *A. m. mellifera*.

Представената обобщена информация за стопанските качества на българската медоносна пчела и нейните биологични особености, макар да е малко встрани от общата цел на дисертационния труд, я оценявам високо, тъй като тя може успешно да се използва в селекционната практика у нас.

Таблица 106 също съдържа важна обобщена информация относно микросателитната ДНК на 24 от изследваните локуси за *A. m. macedonica* от неконтролирани популации и селектиран материал. Много от посочените данни могат да се използват за целите на селекционната дейност.

Представените изводи са обобщени в три основни аспекта:

Таксономичен: На територията на България се среща подвида *A. m. macedonica*, генетично диференциран от същия подвид в Македония и Гърция. Той показва генетично сходство с *A. m. carnica*, генетично диференциран е от подвидовете *A. m. ligustica* и *A. m. anatolica*, но най-отдалечен в генетично отношение е от подвида *A. m. mellifera*.

Популационно-генетичен аспект: Подчертава се установяването на популационно генетични маркери за *A. m. macedonica*. Установени са важни популационни различия в честотата на анализирани алоензимни и микросателитни локуси при други подвидове на *A. mellifera*: *A. m. carnica*, *A. m. ligustica*, *A. m. mellifera* и др., които за съжаление не са включени в изводите на докторантката.

Специфична генетична характеристика на българската медоносна пчела *A. m. macedonica*. Подчертава се генетичното сходство на изследваните от България неконтролирани популации на *A. m. macedonica* с тези от контролираните селектирани линии, доказано чрез алоензимния и микросателитен ДНК анализ, както и от резултатите на стойностите на фиксационния индекс, генния поток и генетичната дистанция.

Подчертава се генетичното разнообразие на пчелни популации от различни райони в България.

Приноси и значимост на разработката за науката и практиката

Приносите на докторантката могат да бъдат обобщени като оригинални в научно и научно-приложно значение.

Оригинални научни приноси:

1. Чрез прилагането на комплексен методичен подход: алоензимен, митохондриален и микросателитен анализ е характеризирана генетичната изменчивост на *Apis mellifera macedonica*. На територията на България се среща подвидът *A. m. macedonica*, генетически диференциран от същия подвид в Македония и Гърция.
2. При този подвид са установени общо 23 алелни варианта за 6 ензимни локуса и 260 варианта за 24 микросателитни локуса. Не е установена вътрепопулационна и междупопулационна изменчивост на базата на митохондриалния ДНК анализ.
3. В резултат на проведения биохимичен и генетичен анализ са установени популационно-генетични маркери за *A. m. macedonica*, като се посочва ниската степен на генетична диференциация на българската популация и алелното разнообразие в честотите на изследваните алоензимни и микросателитни локуси в сравнение с тази от Македония и Гърция.
4. Подчертава се генетичното сходство на изследваните в България неконтролирани популации на *A. m. macedonica* с тези от контролираните селектирани линии, доказано чрез алоензимния и микросателитен ДНК анализ, както и от резултатите на стойностите на фиксационния индекс, гения поток и генетичната дистанция. Подчертават се генетичните различия на северните от южните пчелни популации, резултати, които могат да бъдат специално анализирани в бъдеща теоретична разработка.
5. Въз основа на комплексния методичен подход, обединяващ алоензимен, митохондриален и микросателитен анализ, са установени популационни различия в честотата на анализирани алоензимни и микросателитни локуси при други подвидове на *A. mellifera*: *A. m. carnica*, *A. m. ligustica*, *A. m. mellifera* и др. Въз основа на стойностите на фиксационния индекс, гения поток и генетичната дистанция са характеризирани филогенетичните връзки между *A. m. macedonica* и други подвидове на *A. mellifera*.

Оригинални научно-приложни приноси:

1. Описани са алоензимни, митохондриални и микросателитни маркери при *A. m. macedonoca*, които могат да се използват като изходен материал за научно обоснована селекционна дейност.

2. Получените резултати относно биохимичната и генетична изменчивост на селектирани линии на *A. m. macedoncia* от България и редица европейски страни са предоставени на европейски експерти за проучване на връзката между “генотип и околна среда“ както и генотип и биологично-стопанско значими качества на медоносната пчела.

Преценка на публикациите по дисертационния труд

Общо по дисертационния труд са публикувани 56 научни труда. След придобиване на академичните длъжности „доцент“ и „професор“, д-р Иванова разработва 20 научните статии, представени в реферирани научни списания. Общо 24 от научните разработки са в сп. с импакт фактор. За разработката на дисертационния труд 15 от научните статии са в сп. с импакт фактор /J. of Apicultural Research, Archives of Biol. Sci., Acta Zool. Bulg. и др./, а 1 е в списание с SJR, като 1 от разработките е на български език, а всички останали са на английски. Една от разработките има обзореен характер. Общо в 42 разработки е водещ автор, а от тези, свързани в дисертационния труд в 10 тя е водещ автор. Нейните изследвания намират отзвук всред научната общественост: представени са по дисертационния труд 87 цитирания, като 62 от тях са в списания с импакт фактор. На 46 международни форума докторантката е представила своите научни резултати.

Личното участие на автора. Дисертационният труд е лично дело на докторантката. Тя прилага комплексен методичен подход, включващ различни генетични подходи, които не само владее и успешно прилага, но и аналитично интерпретира и дискутира. В представените разработки участват както известни български специалисти, така и международни, което се определя от комплексния характер на разработките.

Автореферат. Той отразява методичните и научно-приложни постижения на разработения дисертационен труд. Изготвен е съобразно изискванията на Биологическия факултет, приети във връзка с Правилника на Пловдивския Университет.

Критични забележки и препоръки.

1. Заглавието непълно отразява съдържанието на дисертационния труд. То посочва популационно-генетичната изменчивост на *Apis mellifera* L. от България. В действителност

тази изменчивост се изследва и върху подвидове от Балканския п-ов и някои европейски страни.

2. Като пропуск в дисертационния труд считам липсата на информация за детерминирането на изследвания материал. По какви морфологични признаци са идентифицирани изследваните подвидове, подложени на генетичен анализ.

3. Може ли алелните честоти да се използват за генетичен маркер с диагностична стойност, след като те показват изменчивост: например Вашите данни и тези на Николова /2011/.

4. На стр. 194-195 е написано ”местната медоносна пчела на територията на България принадлежи към екотип на подвида *A. m. macedonica*, екотип (*rodopica*), адаптиран към конкретните условия на страната ни“. За да се потвърди тази идея е необходим детайлен сравнителен морфо–генетичен анализ на *A. m. macedonica* от райони на България с материал от типовото находище на „*rodopica*“, от където Петров (1990) именува подвида *A. m. rodopica*.

5. Кои са изоензимните маркери на *A. m. macedonica* от България, които могат успешно да се използват в селекционната практика?

6. На стр. 192 се говори за различна степен на интрогресия между *A. m. macedonosa* и *A. m. carnica*. Как се демонстрира тази интрогресия от Вашите резултати?

7. На редица места в дисертационния труд има повторения между текст, таблици и графики: таблици 72, 73 и графики 36 и 37 и др; стр. 145, 146, 147, 148, 149-153 и др.

8. Табл. 64: кои от данните са за *A. m. macedonica* и кои за *A. m. carnica*?

9. В заглавието на таблица 91 е представен локус Ap 273, а в таблицата се дават данни за локус Ap 249.

10. Стр. 141, първи параграф, се говори за екоципове: кои екоципове на *A. mellifera* д-р Иванова има предвид?

11. На стр. 145 се говори за българска популация на *A. m. macedonica* с 32 местонахождения, а на стр. 153 се споменават български популации. Какво има предвид проф. Иванова?

12. На стр. 149 се говори за маркери на честоти на два алела на локуса A 29, срещащи се и при други подвидове *A. m. carnica*, *A. m. ligustica* с други честоти. В какъв смисъл те са маркери?

13. Използваният термин „локации“ считам, че би било по-добре да се замени с находища.

14. Считам, че изводите 2 и 3 биха могли да се обединят, тъй като те съдържат информация относно генетичното родство на изследваните подвидове. Изводите 4, 7 и 13 също биха могли да се обединят и прехвърлят към „таксономичната“ част на изводите.

Лични впечатления. Проф. Иванова е известен специалист в областта на генетиката, с познания в съвременните проблеми на популационната генетика и специално популационната генетика на медоносната пчела. При нейното изследване тя проявява изключителна прецизност, работоспособност и творческа активност.

Препоръки за бъдещото използване на дисертационните приноси и резултати.

Бих си позволила да предложа на проф. Иванова да използва получените от нея уникални резултати върху генетичната изменчивост на медоносната пчела за изготвяне на теоретична разработка в областта на еволюцията. Установената генетична изменчивост се явява в потвърждение на хипотезата за скоростната еволюция, предложена от проф. Rensch. При тази еволюция се разглежда влиянието на абиотичните фактори върху еволюционния процес и специално температурните промени и техния ефект върху честотата на мутациите и генетичната изменчивост.

Заклучение

Разработеният дисертационен труд е изпълнен на високо методично ниво, като е приложен комплексен методичен подход за характеризирание на генетичната изменчивост на редица подвидове на медоносната пчела *Apis mellifera* L. Получени са оригинални научни и научно-приложни приноси. Освен, че дисертационният труд има значими теоретични постижения в областта на таксономията, популационната генетика на важен от теоретична и практическа гледна точка обект – медоносната пчела, в него се предлагат и определени маркери, като изходен материал за научно обоснована селекционна дейност. Проф. д-р Евгения Иванова притежава задълбочени теоретични знания и професионални умения по научната специалност „Генетика“, като тя демонстрира качества и умения за провеждане на изследвания на високо научно ниво.

Дисертационният труд съдържа научно-приложни резултати, които представляват оригинален принос в науката и отговарят на всички изисквания на Закона за развитие на академичния състав в Република България. Представените материали и

дисертационни резултати напълно съответстват на изискванията на Биологическия факултет, приети във връзка с Правилника на ПУ.

Всичко гореизложено ми позволява с пълна увереност да дам своята положителна и висока оценка на проведеното изследване, представено от рецензираните по-горе дисертационен труд, автореферат, постигнати резултати и приноси. Предлагам на почитаемото научно жури да присъди на проф. д-р Евгения Иванова научната степен „доктор на науките“ в област на висше образование: Природни науки, математика и информатика; професионално направление: Биологични науки; научна специалност „Генетика“.

09.01.2017 г.

**Проф. д-р Параскева Михайлова, дбн
ИБЕИ, БАН**