

## РЕЦЕНЗИЯ

от проф. дбн Иван Илиев Атанасов, Агробиоинститут, София, ССА

на дисертационен труд за присъждане на образователната и научна степен 'доктор'

в област на висше образование: **4. Природни науки, математика и информатика**

професионално направление: **4.3 Биологически науки**

докторска програма: **Молекулярна биология**

**Автор: Фериха Мюмюнова Церкова**, асистент в Институт по Рибни Ресурси – Варна и **задочен докторант** към катедра Физиология на растенията и молекулярна биология, Биологически факултет, Пловдивски университет „Паисий Хилендарски“.

**Тема: Проучване на биоразнообразието и популационната динамика на семейство *Gobiidae* (попчета) в Черно море посредством молекулярни маркери.**

**Научни ръководители: проф. д-р Илия Денев**, Пловдивски университет „Паисий Хилендарски“ и **проф. д-р Даниела Клисарова**, Институт по Рибни Ресурси – Варна.

### 1. Общо описание на представените материали

Със заповед № Р33-177 от 11.01.2018.г. на Ректора на Пловдивския университет „Паисий Хилендарски“ (ПУ) съм определен за член на научното жури за осигуряване на процедура за защита на дисертационен труд на тема „Проучване на биоразнообразието и популационната динамика на семейство *Gobiidae* (попчета) в Черно море посредством молекулярни маркери.“ за придобиване на образователната и научна степен ‘доктор’ в област на висше образование: 4. Природни науки, математика и информатика, професионално направление: 4.3 Биологически науки, докторска програма: Молекулярна биология. Автор на дисертационния труд е Фериха Мюмюнова Церкова – докторантка в задочна форма на обучение към катедра Физиология на растенията и молекулярна биология, Биологически факултет, ПУ „Паисий Хилендарски“ с научни ръководители проф. д-р Илия Денев от ПУ „Паисий Хилендарски“ и проф. д-р Даниела Клисарова, ИРР – Варна.

Представеният от Фериха Мюмюнова Церкова комплект материали на хартиен носител **е в съответствие** с Чл.36 (1) 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 висше образование, ОКС ‘магистър’, спец. Екология и опазване на околната среда
- заповеди за записване в задочна докторантура;
- заповеди за провеждане на изпити от индивидуалния план и съответни протокол за издържани 3 изпита по специалност, и трите издържани с успех 6.00;
- становища на научните ръководители и протоколи от катедрени съвети, свързани с докладване на готовност за откриване на процедурата и с предварително обсъждане на дисертационния труд;
- дисертационен труд;
- автореферат;
- списък на научните публикации по темата на дисертацията;
- копия на научните публикации;
- списък на забелязани цитирания;
- декларация за оригиналност и достоверност на приложените документи;
- справка за спазване на специфичните изисквания на съответния факултет;

Докторантката е приложила 3 бр. публикации, 2 удостоверения за участие в национални конференции, както и CD с файлове съдържащи посочените по-горе документи.

## **2. Кратки биографични данни за докторанта**

**Фериха Церкова** е родена на 20.03.1980 г. През 2003 г. получава бакалавърска степен от Биологически факултет на СУ "Св. Кл. Охридски", а през 2004 г. получава магистърска степен по Екология и опазване на околната среда, Технически университет - Варна. От 2010 г. е асистент към ИРР – Варна, а от 2013 г. е зачислена като задочен докторант към Физиология на растенията и молекулярна биология, Биологически ф-т, ПУ „П. Хилендарски“. В рамките на висшето образование, работата като асистент към ИРР и докторантската подготовката в ПУ и „П. Хилендарски“ Фериха Церкова придобива теоретични знания и практическа подготовка необходими за успешно изпълнение на работната програма по докторантурата.

## **3. Актуалност на тематиката и целесъобразност на поставените цели и задачи**

Обект на изследванията включени в дисертационната работа са видове от сем. *Gobiidae* (попчета), обитаващи и съставляващи важна част от ихтиофауната на Черно море и отличаващи се с високо видово разнообразие и комплексна и динамична популационна структура. Попчетата като цяло са традиционен и предпочитан риболовен обект в българското черноморие с доказано икономическо значение. Досега изследванията в страната върху биоразнообразието

и популациите на видове от сем. *Gobiidae* включват само използването на морфологични характеристики (вкл. определители въз основа на морфологични показатели) и протеинови електрофоретични анализи (изоензими и изоелектрично фокусиране), които трудно могат да бъдат използвани за сравнителни анализи на индивиди от отделни райони, изследвания провеждани в различни години, от различни изследователи или в различни лаборатории. Посочените методи на изследвания не позволяват по-детайлното характеризирание на вътревидовото и популационно разнообразие в рамките на изследваните географски райони и между тях. Досега в достъпната научна литература са публикувани ограничен брой изследвания включващи прилагане на съвременни молекулярно-генетични методи за характеризирание на видове от сем. *Gobiidae*, а такива не са провеждани в страната. Всичко това прави изследванията в представения дисертационен труд актуални, нови за страната, с очаквано висок положителен ефект и предоставящи основа за следващо системно характеризирание на черноморските видове от сем. *Gobiidae*.

#### **4. Познаване на проблема**

Дисертационния труд включва богат и изчерпателен литературен обзор по основните теми и проблеми на дисертацията, вкл.: геоложко развитие и съвременно състояние на ихтиофауната на Черно море; стопанско значение на попчетата за страната; обща характеристика на сем. *Gobiidae* и по-детайлно представяне на инвазивни видове от това семейство; приложение на молекулярните маркери при анализиране на видовата принадлежност, биоразнообразие, популационна структура и динамика при рибите като цяло, както и изследвания при сем. *Gobiidae*.

#### **5. Методика на изследването**

Използваните в дисертационния труд методи включват паралелно характеризирание на видовата принадлежност на голям брой индивиди от сем. *Gobiidae*, въз основа на морфологичните им характеристики и чрез определяне и сравнителен анализ на нуклеотидната последователност на *Cyt-b* за всеки изследван индивид. В изследването са включени голям брой (общо 302 индивида) събрани от българския и румънския брегове, турското крайбрежие, както и проби от Азовско море и от реките Рейн и Мозел. В изследванията са използвани PCR праймери определени от докторантката след сравнителен анализ на наличните в NCBI *Cyt-b* секвенции на представители на сем. *Gobiidae*.

#### **6. Характеристика и оценка на дисертационния труд**

Дисертационният труд е представен в общоприетия стил върху 159 страници разпределени като Увод (3 стр.), Литературен обзор (39 стр.), Цели и задачи (1 стр.), Материали и

методи (10 стр.), Резултати и обсъждане (56 стр., включващи и Обобщения), Изводи (2 стр.), Приноси (1стр., представени само в автореферата), Литература (8 стр.) и Приложения (40 стр.). Списък на публикации във връзка с дисертационния труд и техни цитирания е представен в автореферата. Дисертационния труд включва общо 28 фигури и 20 таблици, като част от фигурите са отпечатани цветно. Литературния обзор е богат и с включени значителен обем литературни данни и обсъждания по основната тема на дисертационната работа, вкл. стопанско значение на попчетата за страната, геолошко развитие и съвременно състояние на ихтиофауната на Черно море, обща характеристика на сем. *Gobiidae* и по-детайлно представяне на отделни видове от това семейство и публикувани досега резултати от характеризирането им, както и приложение на молекулярни маркери при характеризиране на ихтиофауната. Целта и задачите на дисертационния труд са кратко и ясно формулирани. Методология. В изследванията по дисертацията докторантката използва широк набор от методи, включващи установени методи за морфологично характеризиране чрез определител на индивиди от сем. *Gobiidae*, както съвременни молекулярно генетични методи включващи характеризиране на нуклеотидни последователности на *Cyt-b* гена от изследваните индивиди, както и използване на специализиран софтуер за обработка на получените данни. Използваните материали и методи са съответно изчерпателно представени в дисертационния труд. Резултати и Обсъждане. Поради големия брой анализирани *Cyt-b* секвенции от различни видове на сем. *Gobiidae*, получените резултати и тяхното обсъждане в дисертационния труд са представените в отделни части за основните изследвани видове почета, като всяка отделна част включва: представяне на резултатите за съответния вид, обсъждане на резултатите и заключение. След частта с резултати и обсъждания, докторантката е включила отделна част, Обобщения, в която сумира представените резултати и обсъждания, както и възможностите за тяхното приложение и бъдещи изследвания. Изводи и приноси. Изводите са добре формулирани, а приносите са представени само в автореферата като с разпределени в три групи: оригинални, научно-приложни и такива с потвърдителен характер. Цитираната литература включва общо 221 литературни източника на български и английски език. Като цяло дисертационния труд е написан интелигентно с ясно и коректно представени резултати и обсъждания по темата на дисертацията. Отделни забележки по дисертационния труд са посочени в т.11 по-долу.

## **7. Приноси и значимост на разработката за науката и практиката**

Подкрепям формулираните от докторантката три основни групи приноси които определят като цяло значимостта на резултатите от дисертационната работа за науката и практиката. Оригиналните научни приноси включват провеждането на първото за страната широ-

комащабно характеризирани на видове от сем. *Gobiidae* обитаващи Черно море, чрез съвременни молекулярно генетични методи включващи характеризирани на нуклеотидната последователност на *Cyt-b* гена за всеки от изследваните индивиди. В рамките на изследванията са анализирани общо 302 *Cyt-b* секвенции, като за всеки от видовете са определени набор от хаплотипове, конструирани са филогенетични дървета и получените резултати и информация е използвана за характеризирани на филогенетичните отношения на понто-каспийските попчета и средиземноморските мигранти. Научно-приложни резултати. Като цяло, конструирани PCR праймери за амплификация на *Cyt-b* участъка от митохондриалния геном на отделните видове попчета заедно с получената информация и използвани експериментални методи предоставят основа за следващо системно прилагане на молекулярно генетични методи за характеризирани на популационната им структура и динамика, и съответно практическо приложение на получените резултати. Рутинното използване на такива молекулярно генетични методи ще даде възможност за по-коректни и детайли екологични оценки на ефектите от промени в екологичните параметри както и прилаганите риболовни практики в Черноморието.

#### **8. Преценка на публикациите по дисертационния труд**

Резултатите от дисертационния труд са публикувани в рамките на три научни публикации. Една от публикациите е в списание с импакт фактор (*Acta Zool. Bulg.*), а друга в списание с импакт ранг (*Bulgarian Journal of Agricultural Sciences*) и третата в издание на ПУ „П. Хилендарски“ (*J. BioSci. Biotechnology*). Статията в BJAS е цитирана в списание с импакт фактор (*Aquatic Invasions*) сочещо, че резултатите от дисертационната работа представляват интерес за научната общност. Освен в публикации в научни списания, докторантката е представила резултати от дисертацията и на две национални конференции (приложени удостоверения)

#### **9. Лично участие на докторантката**

Докторантката е първи автор и в трите научни публикации по дисертационния труд.

#### **10. Автореферат**

Авторефератът е направен според изискванията и представя напълно съдържанието на дисертационния труд, включвайки: цели и задачи; резултати и дискусия; изводи; приноси, посочени публикации свързани с дисертацията и цитиране на публикация

#### **11. Критични забележки и препоръки**

*Критични забележки относно дисертационния труд:*

- в редица места на дисертационния труд липсва разстояние между съседни думи от текста и те са изписани слято.

- на представените в дисертационния труд фигури с авторски снимки на риби (попчета) не е показан маркер за дължина (напр. линия с означени сантиметри). Въпреки че това не намалява значимостта и качеството на дисертационния труд, включването на визуален маркер ще е от полза за читателите които нямат опит и познания в областта на ихтиофауната.

- секцията Материали и Методи на дисертационния труд е представена изцяло в минало време. Считаю че представянето на конкретните методики и протоколи включени в тази секция е по-добре да бъдат представени в сегашно време което подкрепя и ще помогне дисертационния труд да се ползва и като практическо ръководство за приложение на молекулярно-генетични методи за характеризирание на ихтиофауната (напр. „*За изолиране на ДНК бяха използвани фрагменти от опащната перка на образците и Blood and Tissue kit на Qiagen. 1) Общо 20 mg от материала се нарязва на дребно с чист скалпел и се прехвърля в...*“ вместо „*За изолиране на ДНК бяха използвани фрагменти от опащната перка на образците и Blood and Tissue kit на Qiagen. 1) Общо 20 mg от материала беше нарязан на дребно с чист скалпел и прехвърлен в...*“)

- на няколко места в текста са използвани изрази като „*Секвенциите от Cyt b бяха успешно изолирани от ... проби; Изолираните секвенции бяха подложени на Tajima D-тест; 1.4. Изолиране на Cyt b региона посредством PCR и секвениране и др*“ (напр. стр. 62, 64, 88, 92, 95, 99 и др.) като под „*изолирани секвенции*“ в тези текстове трябва да се разбира *Cyt-b* секвенции (или нуклеотидни последователности) определени след последователност от стъпки вкл.: ... изолиране на ДНК от анализиранияте проби; PCR амплификация на участък от *Cyt-b* гена; изолиране (от гел) и секвениране на амплифицираните ДНК фрагменти, анализ на получените секвенции. Ето защо е по-удачно в тези текстове за секвенциите да се ползва „определяне/определени“ или „характеризирани“ вместо „изолиране/изолирани“. Аналогично в отделни места в текста е необходимо да се прецизира и ползването на термините „изолирани“, „амплифицирани“ и „секвенирани“.

- считам че твърдението „*праймерите са ген-специфични за всеки отделен вид от трите рода и могат да се използват като PCR базирани молекулярни маркери разграничаващи видове попчета сходни по морфологични белези дори без секвениране*“ (в научно-приложни приноси от автореферата) се нуждае от допълнително изясняване относно начина на ползване на PCR амплификацията / праймерите както и от експериментално потвърждение чрез PCR амплификация от по-голям набор ДНКи изолирани от различни видове.

*Препоръки относно представянето и следващо ползване и интерпретиране на резултати от дисертационния труд:*

- в рамките на дисертационния труд са характеризирани голям брой проби принадлежащи към различни видове попчета, като са определени *Cyt-b* хаплотипове за отделните видове. Получените резултати са представени в отделни таблици за всеки вид (напр. Табл. 5; 8; 11 и др.) като отделните хаплотипове (за всеки вид) са обозначени с последователни номера H\_1; H\_2... или Har\_1; Har\_2... Въпреки че в рамките на дисертационния труд е достатъчно ясно кой хаплотип за кой вид се отнася, следващото ползване на резултати от дисертационния труд може да бъде затруднено и объркващо тъй като секвенции на хаплотипове от различни видове са обозначени по един и същи начин (напр. хаплотип „Har\_1“ има при *N. melanostomus*; *N. cephalargoides*; *M. betrachoccephalus*; и *G. niger*). Една възможност да се избегне такова объркване е ако в обозначенията на секвенциите на хаплотиповете се включи и обозначение на вида за който се отнася хаплотипа (напр. „Nmel\_Har\_1“...вместо „Har\_1“ при *N. melanostomus*)

- въпреки че в отделни места на текста към съответните части на „Резултати и Обсъждане“ са посочени честотите (в %) на срещане на отделни хаплотипове в анализирани проби от един или няколко географски райони, то тези данни не са представени цялостно и систематизирано в табличен вид. По мое мнение честотата на поява на установените хаплотипове в анализирани групи проби е важен параметър който може да бъде използван за конструиране на хаплотипни диаграми/мрежи, както и при следващи сравнителни изследвания. Поради това според мен е препоръчително представените в дисертационния труд таблици с обозначения и секвенции на хаплотипове за отделните видове (напр. Табл. 5; 8; 11 и др.) да бъдат разширени като в тях се включат допълнителни колони с посочени броя проби/екземпляри имащи съответния хаплотип за съответния географски район / местообитание. (алтернатива на това предложение е в „Приложение 1“ да бъде посочен *Cyt-b* хаплотипа на всеки изследван индивид). Такова представяне ще бъде много полезно при следващи анализи на популациите попчета в същите райони и оценка на промените в популационната структура.

- в дисертационния труд докторантката успешно използва получените *Cyt-b* секвенции за конструиране на филогенетични дървета и прилагане на *Tajima's Neutrality Test*. По мое мнение освен за посочените два типа анализи, получените резултати могат да бъдат използвани за конструиране на мрежи от хаплотипове (*haplotype network*; *haplotype parsimony network*) включващи информация за връзката (броя необходими замествания) между секвенциите на отделните хаплотипове и тяхната честота при изследваните район(и). Използ-

ването на подобни мрежи от хаплотипове ще даде възможност за допълнителна информация и интерпретация на получените експериментални резултати и е логично следващо приложение на получените резултати

*Въпроси към докторантката.*

Дисертационният труд включва паралелно характеризиране на голям брой попчета от различни видове, чрез морфологични характеристики / определители и секвениране и характеризиране на *Cyt-b* секвенциите на анализирани индивиди. Сравняването на резултатите от двата типа анализи и паралелното определяне на видовата принадлежност за всеки индивид дава възможност за първи път да се оцени ефективността на ползваните понастоящем определители. Във връзка с посоченото бих искал да задам следните въпроси към докторантката:

- в каква степен (като брой потвърждения спрямо общия брой характеризирани индивиди) резултатите от използвания *Cyt-b* анализ на видовата принадлежност на анализирани индивиди съвпада с видовата им принадлежност определена по морфологични признаци? Има ли разлики в степента на потвърждение на оценките на видовата принадлежност при характеризиране на индивиди от отделни видове?

- могат ли получените резултати от *Cyt-b* характеризирането на видовата принадлежност да се използват за подобряване на отделни елементи от настоящите определители, както и успеха и ефективността от прилагането им?

## **12. Лични впечатления**

Нямам лични впечатления от докторантката.

## **13. Препоръки за бъдещо използване на дисертационните приноси и резултати**

Освен представените в т.11 по-горе, критични забележки и препоръки относно представяне и интерпретиране на резултати от дисертационния труд, бих искал да предложа и следните две препоръки за бъдещото ползване на научните и научно-приложни приноси на дисертационното изследване:

- дисертационния труд включва първото за страната мащабно изследване на видовата принадлежност и популационна структура на различните видове попчета обитаващи Черно море, които се характеризират с висока популационна динамика и икономическа важност. В дисертационната работа успешно е използвано характеризиране на високо информативни *Cyt-b* секвенции на изследваните индивиди. Всичко това дава основание да се предложи използване на получените резултати и използвани методи като основа за дългосрочно изследване и мониторинг на промените в популациите, популационната структура и динамика на



основните видове попчета в Черно море. За целта е необходимо: цялостно структуриране на получените резултати и създаване на база с данни (секвенции, честота на хаплотипове, характеризирани места и др.) насочена към дългосрочно характеризиране на популационната динамика. Заедно с това за увеличаване на информативността на характеризираните нуклеотидни последователности, в част от следващите изследвания е необходимо да се включи и характеризирането на хипервариабилния участък (D-loop) на митохондриалния геном.

- проведеното паралелно характеризиране на изследваните индивиди въз основа на морфологични характеристики и анализ на *Cyt-b* последователности дава възможност за директното им използване за допълнително прецизиране и подобряване на съществуващите определители за попчета и регулярното им ефективно прилагане за характеризиране на популациите.

В края бих искал да отбележа че посочените критични бележки и направените препоръки в т.11 и т.13 по-никакъв начин не омаловажават представените в дисертационния труд резултати, научни и научно-приложни приноси на това ново и значимо научно изследване. **Приложените експериментални методи, получени резултати и обсъждания сочат, че докторантката Фериха Церкова е изграден учен и специалист, притежаващ високи професионални умения, теоретични познания и експериментален опит и умения за извършване на комплексни изследвания в областта на биоразнообразието и филогенетиката на представители на Черноморската ихтиофлората, включващи и прилагане на молекулярно генетични методи.**

## **ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

Дисертационният труд **съдържа значими научни, научно-приложни и приложни резултати, които представляват оригинален принос в науката и напълно отговарят на всички изисквания** на Закона за развитие на академичния състав в Република България (ЗРАСРБ), Правилника за прилагане на ЗРАСРБ и съответния Правилник на ПУ „Паисий Хилендарски“. Представените материали и дисертационни резултати **напълно съответстват на специфичните изисквания на Биологически ф-т, ПУ „П. Хилендарски“**, приети във връзка с Правилника на ПУ за приложение на ЗРАСРБ.

Дисертационният труд показва, че докторантката **Фериха Мюмюнова Церкова притежава задълбочени теоретични знания и професионални умения по научна специалност молекулярна биология** като демонстрира качества и умения за самостоятелно провеждане на научни изследвания.

Поради гореизложеното, **убедено давам своята положителна оценка** за проведеното от Фериха Церкова изследване, представено от рецензираните по-горе дисертационен труд, автореферат, постигнати резултати и приноси, и **предлагам на почитаемото научно жури да присъди образователната и научна степен ‘доктор’ на Фериха Мюмюнова Церкова в област на висше образование: 4. Природни науки, математика и информатика, професионално направление 4.3 Биологически науки, докторска програма Молекулярна биология.**

02.02. 2018 г.

Рецензент: .....

проф дбн Иван Атанасов