

СТ А Н О В И Щ Е

от Проф., д-р Анелия Илиева Кътова, Институт по фуражните култури – Плевен

Относно: дисертационен труд за придобиване на образователна и научна степен “доктор” по докторска програма “Селекция и семепроизводство на културните растения”, професионално направление ш. 6.1 „Растениевъдство”

Тема на дисертационния труд: „ Идентифициране и оценка на екотипове от род *Festuca*”

Автор: Мария Едуардова Петрова, задочен докторант към Института по растителни генетични ресурси, Садово, **научен ръководител:** доц., д-р Янка Крумова Гутева

Становището е изготвено съгласно Заповед РД 05-188/25.09.2019 г. на Председателя на ССА-София и Заповед № РД 05-85/30.09.2019г. на Директора на ИРГР – Садово.

Представените материали по защитата на дисертацията съдържат пълен набор от необходимите документи за законосъобразно протичане на процедурата, съгласно ЗРАСРБ и Правилника за неговото приложение в ССА.

Актуалност и оценка на получените резултати

Растителните генетични ресурси (РГР) са безценни за всяко селекционно усилие. Изборът на изходен материал чрез комплексно проучване е решаващ за успеха на селекционната програма, тъй като селекцията е продължителен процес и много години се води отбор и рекомбинации, за да се стигне до създаване на нов сорт. РГР са необходими за разширяване на вариабилността. Четири основни категории РГР имат потенциално значение за фуражните и декоративни тревни видове: диви родственици; екотипове, местни популации, отглеждани от фермерите; сортове. Докато всички РГР се поддържат като семенни проби в ген банка *ex situ*, дивите родственици, екотиповете и местните популации могат да се поддържат *in situ* (при фермата, ливадите и пасищата). Многогодишните житни треви са основни компоненти на естествените и сятите тревостои. Използването им, като източник на фураж или за затревяване на спортно-технически терени и озеленяване, определя многофункционалната им роля и значение. Глобалното затопляне на климата е сериозен аргумент за издирване на видове с повишена адаптивност и висок продуктивен потенциал, каквито са видовете от род *Festuca*. По адаптивност, толерантност към кисели почви и възможност за дългогодишно използване ливадната (*Festuca pratensis*) и тръстиковидната (*Festuca arundinacea*) власатки са от особен интерес за съвременното земеделие с оглед: опазване природния статус на ливадите и пасищата и стопанското им значение като култури за сенокосно и пасищно отглеждане. *Festuca pratensis* е разпространена в изобилие в планинските ливадни хабитати със средни нива на надморските височини, а *F. arundinacea* се наблюдава в равнинните хълмисти райони. Вариациите в надморска височина, изложение, почвен тип, климат и използвани земеделски практики са предпоставките за формиране на съществуващо разнообразие. Изпитаните до сега у нас многобройни чуждестранни сортове многогодишни житни треви са в повечето случаи високо продуктивни, но със слаба приспособимост към нашите условия, не дълготрайни и са неподходящи за пряко внедряване в производството. Отборът на екотипове е най-ранният метод за създаване на сортове власатка и все още се счита за важен селекционен метод. В България през последния половин век са провеждани изследвания с тръстиковидна власатка и е създаден през 1993 г. и регистриран в ОСЛ на страната и за 2019 г. 1 сорт на ИФК – Плевен – Албена. В тази връзка темата на дисертацията е актуална и с непреходно значение.

В дисертацията са представени изследвания за периода 2009-2015г. В композиционно отношение работата като обем и баланс между отделните 9 части отговаря напълно на изискванията за такова проучване. Дисертацията е написана на 176 стр., в т. ч. 58 таблици

плюс 1 (приложение), 15 фигури, 12 снимки, 209 литературни източника – 33 на кирилица и 176 на латиница, от общия брой 137 са източници от 2000 г. насам, в т.ч. 45 след 2010 г., т.е. 66 % (22%) съвременни източници.

Литературният обзор е богат, изчерпателен, целенасочен, добре структуриран и включва разделите: Произход, разпространение и стопанско значение на власатките; Таксономично описание, Морфологична и биологични особености на *Festuca pratensis* и *Festuca arundinacea*, *Ex situ* колекции – значение и дейности по опазване на РГР, Агробиологична и качествена характеристика, Критерии за идентифициране на подходящи ливадни хабитати – източници на зародишна плазма за съхранение *ex situ* и подобрителна работа, Методи на селекция, Нападение от болести, Молекулярни маркери. Завършва със заключителен анализ и води аргументирано към целта.

Целта е формулирана конкретно и ясно: Да се оцени и сравни вариабилността между екотипове с разнообразен произход и сортове от *Festuca pratensis* и *Festuca arundinacea* по морфологична и агрономическа характеристика, молекулярни маркери и установяване на критерии за идентифициране на подходящи ливадни хабитати – източници на зародишна плазма за съхранение *ex situ* и подобрителна работа, а *4-те задачи* произтичат логично.

Раздел *Материал и методи* е онагледен с 6 таблици и 1 снимка. Проучването е проведено в ИРГР, Садово, изведени са 2 сравнителни полски опити за определяне на продуктивния потенциал, включен е растителен материал: от ливадна власатка (*Festuca pratensis*) - 6 екотипове с български произход; 4 екотипове от Швейцария; 2 сорта от Европейската сортова листа – Preval и Cosmolit като контроли; от тръстиковидна власатка (*Festuca arundinacea*) - 6 екотипове с български произход; 1 сорт на ИФК - Плевен - Албена и 2 сорта от Европейската сортова листа – Barolex и Belfine като контроли. За проучване на полиморфизъм на ДНК чрез SSR маркери участват 11 образци от вида *F. pratensis*, от естествени хабитати в България, изследвани в лабораторията по молекулярна екология в Научноизследователски институт по агроекология и земеделие, град Цюрих, Швейцария. За оценка по 10 морфологичните показатели на образците, е изведен 3-ти полски опит, измерванията са по дескриптори на UPOV, 2002 за: хабитус във фаза вретенене и изметляване, височина във фаза вретенене и изметляване, дата на изметляване, дължина и ширина на флаговия лист, дължина на водещо стъбло и на метлицата, брой стъбла. Фитопатологичната оценка отразява реакцията спрямо коронеста ръжда (*Puccinia coronifera* Kleb.) През периода 2014-2015 година в ИРГР – Садово, е заложен четвърти полски опит, с 12 образци ливадна и 9 образци тръстиковидна власатка. Оценката по тип на инфекция е по скала от Johnston & Browder (1966), Степента на нападение е по скала от Димов (1988). Установяването на резистентност към *Xanthomonas campestris* pv. *Graminis* на екотипове с български произход в лабораторни условия при изкуствен инфекциозен фон е по 9 бална скала, след заразяване в лабораторията по фитопатология в научноизследователски институт по агроекология и земеделие, град Цюрих, Швейцария. Методиката е по селекционните програми на FAL Reckenholz (Boller et al., 2001). Анализирани са биохимичния състав на образците власатка от сравнителния сортов опит, във фаза изметляване в лабораторията по биохимия към ИРГР – гр. Садово по общо приети методики (Сандев, 1979; Станчев и Бобошенска, 1974). Определени са: суров протеин; сурови влакнини; хигроскопична влага; абсолютно сухо вещество; сурова пепел; сурови мазнини; безазотни екстрактни вещества. Всички проучвани биохимични показатели са преизчислени за единица площ – kg/da.

Анализ на полиморфизъм: геномната ДНК екстракция е извършена по протокола на Qiagen DNeasy96 Plant Kit (Qiagen, Hilden, Germany). За оценка на генетичното разнообразие в екотиповете са използвани 18 праймерни двойки, амплифициращи микросателитни локуси.

Статистически анализи: Анализът на средните от морфологичните показатели е извършена с програмата SPSS 13.0. Достоверността на разликите между образците по агробиологичните и морфологични показатели е установена чрез еднофакторния

дисперсионен анализ (Генчев и др., 1975). Корелационният и вариационният коефициенти са определени по Генчев и др. (1975). и Димова & Маринков (1999). Степента на изменчивост на проучените показатели, представени чрез вариационния коефициент (CV%) е посочена съгласно схемата на Мамаев (Шамов, 1998; Петрова, 2015). Зависимостите между признаците се измерват с коефициента на корелация. Приложен е Path-коефициентният анализ с отделянето на директния и индиректния ефект върху добива. Построена е дендрограма на основата на UPGMA метода (Unweighted Pair-Group Method Using Arithmetic Average), по модула SAHN на софтуерен продукт NTSYS-pc v.2.2 (Rohlf, 2000) на базата на стойности на Fst коефициенти (Kölliker et al., 1998), със софтуерен продукт ARLEQUIN v.3.1 (Schneider et al., 2000), чрез който е оценена молекулярната дисперсия вътре и между екотиповете по метода AMOVA (Analysis of molecular variance) (Excoffier et al., 1992).

Почвено-климатична и метеорологична характеристика е задълбочена, като основен провокационен фон на изследване на реакцията на екотиповете към абиотичен стрес в динамика, години, периоди и показатели.

Резултати и обсъждане обхващат от 53 до 133 стр., общо 80 стр. или 50% от дисертацията. Определени са средните стойности и вариации по морфологични признаци при образците от двата вида власатки. Установени са тези с най-висока степен на изменчивост като брой стъбла на растение. Оценена е продуктивността на фураж свежа и суха маса на образците, по откоси и години и средно годишно и е установено, че образците от тръстиковидна власатка превъзхождат по добив тези от ливадна власатка, като българската селекция сорт Албена е най-високо добивен. Установени са корелации между добива и морфологичните показатели. Те показват, че височината във фаза вретене е в доказана силна положителна корелационна връзка с височината във фаза изметляване ($r=0,877^{**}$) и дължината на водещото стъбло ($r=0,794^{**}$), и в средна положителна зависимост от дължината на флаговия лист ($r=0,610^*$). Височината във фаза изметляване е в доказана силна положителна корелация с дължината на водещото стъбло ($r=0,823^{**}$) и на флаговия лист ($r=0,776^{**}$). Дължината на водещото стъбло е в доказана силна положителна връзка с дължината на метлицата ($r=0,719^{**}$) и на флаговия лист ($r=0,814^{**}$). Дължината на метлицата е в средна положителна връзка с дължината на флаговия лист ($r=0,608^*$). Двата растежни хабитуси са в силна положителна корелация ($r=0,953^{**}$).

Установена е реакцията на образците към коронеста ръжда, като при тръстиковидна власатка всички образци са чувствителни към патогена.

Установено е качеството на фуража чрез биохимичния състав образците, като тези от тръстиковидна власатка са с по-високи стойности в сравнение с ливадна власатка.

Високо оценявам проведените молекулярни анализи с най – съвременна методология за полиморфизъм - брой алели, среден брой алели в локус, голяма част от тях са редки, отразяващи генетичното разнообразие при български екотипове ливадна власатка.

Анализ на молекулярното вариране (молекулярна дисперсия) AMOVA (средно за 18 локуса) показва, че значителен дял от дисперсията се основава на варирането вътре в екотиповете – 85,95%. Варирането между тях е едва 14,05% от общата дисперсия

От проведения анализ на главните компоненти е видно, че като източници на вариране от естествени хабитати, мога да се посочат екотиповете ливадна власатка с български произход Пампорово (98E0008), Кюстендил (98E0020), Оризаре (A7E0005) и Детелина (A5E0001) и с швейцарски произход Grandval (A6000215), Fahy (B7000036) и Marbach (B7000038), а от тръстиковидна власатка като източници на вариране могат да се посочат българските екотипове Гумощник (A6E0035), Араповски манастир (A6E0036) и Чокманово (A6E0042). Тези резултати кореспондират с проведения кластерен анализ, представен с дендрограмите, с групиране на образците според генетичско родство и отдалеченост. Резултатите са в логична последователност на поставените задачи и добре илюстрирани, представени на висок научен стил. В края на основните раздели е направено заключение.

Въз основа на извършената цялостна експериментална дейност, прецизна статистическа обработка на резултатите и компетентно обсъждане са направени 19 достоверни изводи, които приемам напълно и успешно са изпълнени поставените цел и задачи на дисертацията.

Оценка на приносите:

Всички приноси се отличават с оригиналност и значимост за генофонда от многогодишни житни фуражни треви и имат теоретичен и приложен характер.

Приноси с оригинален характер

1. Проведено е комплексно проучване на разнообразна зародишна плазма от видовете *Festuca pratensis* и *Festuca arundinacea* с произход от различни хабитати в България и Швейцария.

2. Чрез SSR молекулярни маркери са идентифицирани подходящи хабитати, с генетическо разнообразие за вида *Festuca pratensis* като източници на полезни качества в селекционно подобрителната работа.

3. Оценени са важни стопански качества на екотипове и сортове *Festuca pratensis* и *Festuca arundinacea*, за условията на Централна Южна България на канелено-горски смолницоподобни почви.

4. Установени са преките и косвени връзки между морфологичните белези и добива на сено при *Festuca pratensis* и *Festuca arundinacea*.

5. Установени са носителите на вариране и източниците на полезни признаци от събраните екотипове от България и Швейцария.

Приноси с потвърдителен характер

1. За сухите райони, от двата вида власатка не се получават повече от три откоса годишно, като първият откос е с решеващо значение за добива. По-подходящ и с голямо стопанско значение по продуктивност е видът тръстиковидна власатка.

2. Методите на молекулярните маркери са подходящ инструмент за разкриване на източници на изменчивост при растителната зародишна плазма в т.ч. и при ливадната власатка (*Festuca pratensis*).

3. Установено е, че в България има запазено голямо разнообразие от екотипове ливадна и тръстиковидна власатка в естествените им местообитания.

4. Връзката между анализа на главните компоненти и клъстерния анализ потвърждава възможностите за избор на генотипове зв селекцията.

Приноси с приложен характер

1. Обогатена е базата данни за ливадна и тръстиковидна власатка в националната колекция с нова оценъчна информация.

2. Използвани са и приложени съвременни методи на оценки, които да послужат на изследователите, по консервация и селекция на двата вида власатка.

3. Резултатите от настоящата разработка обогатяват информацията в колекцията *ex situ* за екотипове от *Festuca pratensis* и *Festuca arundinacea*, от естествени хабитати и за отбор на ценни генотипове по адаптивност в селекцията.

Бележки, въпроси и препоръки:

Без да подценявам нивото на изведената изследователска работа и да намалявам значението на представения за разглеждане дисертационен труд представям някои бележки:

- ✓ На стр. 9 и 15 вместо власатка, неправилно е изписано власадка.
- ✓ Терминът “изкуствени” за пасища, да се избягва, а да се използва в бъдеще “сяти”.

Въпроси:

1. Получената богата оценъчна информация, влиза ли в електронни бази данни за съответните образци?

2. Налични ли са за обмен със селекционери образците, с гарантирана висока кълняемост на семената?

Оценка на автореферата

Авторефератът отговаря на структурата на дисертацията, правилно представя основните положения и научни приноси за извършеното проучване като лично дело на докторанта. Написан е на 38 страници. Съдържа 36 таблици и 11 фигури и резюме на английски език.

Оценка на публикациите по дисертационния труд

Представена е 1 самостоятелна публикация във връзка с дисертацията, в българско научно издание *Journal of Bioscience and Biotechnology-Online*, на английски език, тя отразява основните изследвания и популяризира резултатите сред научната общност.

Лични впечатления за докторанта

Познавам ас. Мария Петрова като куратор на РГР от фуражни култури и като участник в 2 научни проекти на ИФК – Плевен, на които съм ръководител. Ас. Петрова е отговорен, отдаден на работата, млад учен, с отлична теоретична и практическа подготовка. Прецизно и в срок предоставя отчетите си и е предпочетена за екипна работа. Тя е достоен ученик на Доц., д-р Гутева и на почетния президент на EUCARPIA група фуражни и декоративни култури Beat Voller. Участието и в международни проекти и обучения е допринесло много за усвояването на съвременни методи на изследване на РГР и обогатяване на Българската национална колекция от фуражни треви.

Кратки биографични данни за докторанта

Мария Едуардова Петрова е родена на 27.03.1978 г. в гр. Смолян. Висшето си образование завършва в Пловдивски Университет през 2002 г. - степен бакалавър, специалност Биология, а през 2003 г. - степен магистър, Аграрен Университет – Пловдив, специалност Растителни биотехнологии с отлична диплома. От 2006 г. и понастоящем е асистент в ИРГР – Садово. От 01.02.2010 до 01.02.2014 г. е задочен докторант в ИРГР – Садово, по докторска програма „Селекция и семепроизводство на културните растения”, отчислен с право на защита, считано от 02.02.2016 г.. На изпитите за докторантските минимума е получила отлични оценки. Участвала е в специализации и учебни курсове в чужбина – Швеция, Швейцария, Франция и Германия. Участник е в 6 научни проекти към ССА, 1 към МОН и 4 международни проекти с външно финансиране. Автор е на 12 научни публикации, в т. ч. 1 по дисертацията. Ползва немски, английски и руски език - много добро ниво и има отлична компютърна грамотност. Член е на СУБ и на Работна група по фуражите към ЕСРГР.

Заклучение:

Отличната информираност и правилното методично залагане и провеждане на експерименталната работа, както и задълбоченото интерпретиране и анализиране на получените резултати е позволило на докторанта да регистрира важни приноси – оригинални, с методичен характер и научно приложни. Дисертацията е методически добре поставен и завършен научен труд с принос за обогатяване на генофонда от многогодишни житни фуражни треви у нас, за неговата комплексна оценка и перспектива за създаване на нови сортове с висока продуктивност и екологична стабилност, толерантност на болести и абиотични фактори – лимитиращи условия на средата (суша, студ), и напълно покрива изискванията на ЗРАСРБ и Правилниците за неговото прилагане.

Изявявам **положително становище за дисертационния труд** и ще гласувам за присъждането на образователна и научна степен „**доктор**” по докторска програма «Селекция и семепроизводство на културните растения», професионално направление ш. 6.1. Растениевъдство на Мария Едуардова Петрова.

17.10.2019 г.

Изготвил становището:

(Проф., д-р Анелия Кътова)