

9. СПРАВКА ЗА НАУЧНИТЕ ПРИНОСИ

на доц. д-р Петя Павлова Иванова

представени в конкурс за заемане на академичната длъжност „професор“ в направление 4.3. Биологически науки, Научна специалност: „Хидробиология“, Научно направление: „Генетика на хидробионти“, обявен в ДВ бр. 12 от 03.02.2023г.

Основните ми научни приноси са в областта на популационната генетика и молекулярна таксономия и включват: прилагане на генетични маркери за установяване и прецизиране на таксономичния статус на морски и сладководни видове риби и други хидробионти с цел оценка и опазване на биоразнообразието им; мултидисциплинарен подход при изучаване на популационно-генетичната структура на стопански ценни видове риби във връзка с точното определяне на техните запаси и рационалната им експлоатация, с принос към разработване и въвеждане на програми за генетичен мониторинг и контрол на експлоатираните рибни ресурси; оценка на въздействието на факторите на средата и различни стресори (свърхексплоатацията) върху популационната динамика и биоразнообразието; разширяване на спектъра от изследователски методи чрез прилагане на иновативен подход (анализи на ДНК от околната среда, eDNA), за оценка на биоразнообразието и на запасите на стопански ценните видове в Черно море; в областта на аквакултурите - генетична идентификация на потомствата от застрашени местни видове риби, с доказан произход, обект на програми за зарибяване на р. Дунав; оценка на популациите на чуждите/инвазивни видове хидробионти пред българския бряг на Черно море и актуализиране на списъците, важна стъпка за разработване на система за ранно предупреждение и механизми за бърза реакция и управление в съответствие с европейските регламенти. Наред с това имам принос и в оценката на замърсяването с макро- и микропластмаси в Черно море и р. Дунав, което би могло да послужи като основа за създаване на стратегия за намаляване на отпадъците и смекчаване на потенциалното им въздействие върху морските екосистеми и човешкото здраве.

Авторската справка очертава основните научни, научно-приложни и методични приноси.

I. Приноси с научен характер

I.1. Оригинални приноси

I.1.1. Приноси, свързани с изучаване на биогеографското разпространение на ендемитни видове риби в техния съвременен ареал и филогенетичните връзки между тях.

I.1.1.1. Изследвано е въздействието на предизвиканите от климата промени в околната среда в басейните на Черно и Каспийско морета, върху еволюцията на ендемитния вид *Rutilus frisii* (Nordmann, 1840). За първи път са анализирани проби от осем находища на вида, обхващащи централната и югоизточната част на Европа, източното Закавказие, северен Иран и западната и източна част на Анадола и е определена степента на генетична диференциация между екземплярите от различни местообитания. За първи път са установени филогеографски доказателства (базирани на вариациите на последователностите при два ядрени и един митохондриален ген), за това че Черно и Каспийско море са поддържали отделни популации на вида *R. frisii* по време на последното заледряване, но са обменяли гени в двете посоки в резултат на значителен генен поток. Предполага се, че по-голямата част от миграциите са настъпили през плейстоцена, което показва, че вариацията, споделена между двата басейна, е резултат от разпространението им при наличие на временни естествени връзки между тях. Генният поток между тези изолирани популации на някога по-широко разпространен вид е важен източник на генетични вариации и вероятно е улеснил техния еволюционен отговор на променящия се климат (публикация **B.1**).

I.1.1.2. Установени са филогенетичните връзки в рамките на род *Atherina* в Севернаизточния Атлантик и Средиземно море, и неговото подразделение на пет ясно разграничими групи: два признати вида (*A. hepsetus* и *A. presbyter*) и три допълнителни линии (клади) при вида *A. boyeri*. Последните са идентифицирани в предишни проучвания, но в твърде ограничени райони на пробонабиране. Направена е оценка на филогенетичната свързаност, на база анализ на два митохондриални ДНК маркера (12S rDNA и CR), при широкомащабен (от 57 местонаходища) анализ на екземпляри от род *Atherina*, обхващащи районите от Ваденско море до Канарските и Азорските острови и на изток до Черно море и сладководните басейни в Турция.

Установено е, че полифилетичният вид *A. boyeri sensu* Kiener и Spillman (1969) обхваща три далечно свързани клади. Първата, включва типично морски екземпляри без точки, разпространени повсеместно в Средиземно море, а втората - екземпляри с точки, които се срещат само по западното Средиземноморие. Третата клуда е разпространена в бракичните и сладки води от Западна Европа и Мароко към Турция (в устия, реки, лагуни и езера), и при нея има ясно географско подразделение. Разликите в окраската на тялото и екологията им в съчетание с големите генетични разстояния подкрепят тезата, че тези клади са три валидни вида.

От биогеографска гледна точка са получени нови данни за относително високия дял на средиземноморски ендемитни видове атерини. От идентифицираните пет основни клади, три са ендемитни за Средиземно море. Бракичните и сладководни *A.*

boyeri екземпляри са широко разпространени в това море с малко разширение на ареала към североизточните атлантически реки и лагуни.

Разгледани са различни сценарии по отношение на молекулярната дивергенция на видовете от род *Atherina*, свързани с настъпилите промени по време на плейстоценските залежавания и „Месинската криза“ на солеността, довели до оцеляването на видовете в ограничени рефугиуми (публикация В.3).

I.1.2. Приноси, свързани с установяване на молекулярно-генетични маркери за идентификация на родителски видове и хибридни биотипове.

I.1.2.1. Видове от род *Cobitis*

След паралелно прилагане на няколко генетични метода (алозимен анализ, кариотипизиране, флуоцитометрия и секвениране на ДНК), е установена таксономичната позиция на два неописани, предполагаеми вида (*C. pontica* и *Cobitis taurica*). Допълнително са разработени и приложени нови маркери за оценка на полиморфизма на дължината на рестрикционния фрагмент, позволяващи прецизна идентификация на родителските видове и техните геноми в известните хибридни биотипове от комплекса (публикация В.2). Установено е, че в по-голямата част от „несредиземноморска“ Европа се срещат два вида щипоци, *C. elongatoides* и *C. taenia*, с парapatрично разпространение. *C. taenia* се среща в западна, северна и по-голямата част от източна Европа, и е потвърден в райони, източно от басейна на река Волга. *Cobitis elongatoides* населява басейна на река Дунав и горните части на реките Одра и Елба, но е установено разширяване на южната му граница на разпространение до река Камчия, вливаща се в Черно море. Видът не е намерен в десните Дунавски притоци, но е установено, че в реките Вит и Янтра, се среща вида *C. albicoloris/strumicae* (публикация В.2).

Щипоците представляват рядък пример сред европейските риби, как западна и северна Европа се колонизира от изолирани или реликтни популации (рефугиуми), разположени в басейна на река Днепър или дори по-източни райони (*C. taenia*), докато дунавските линии (*C. elongatoides*) допринасят за колонизацията на горните части на реките Одра и Елба (публикация В.2).

Установено е голямо разнообразие от хибридни биотипове. Сравнението между родителски и хибридни биотипове позволи идентифицирането на неизвестни родителски видове. Установени са три вида първични хибридизации, водещи до диплоидни хибриди (*C. elongatoides-taenia*, *C. elongatoides-tanaitica* и *C. elongatoides-aurica*), възникващи в зоните на репродуктивен контакт между родителските таксони. Представена е карта с географското разпространение както на родителските видове, включени в *Cobitis taenia* хибридният комплекс, така и на хибридните биотипове. (публикация В.2).

I.1.3. Прилагане на генетични маркери за прецизиране на таксономичната принадлежност на морските хидробионти и оценка на биоразнообразието.

I.1.3.1. Представени са нови данни, за морфологичното и генетико-биохимично описание на вида *Pomatoschistus marmoratus*, което има принос към решаване на

проблема относно таксономичния статус на вида, погрешно идентифициран като *P. microps* (публикация В.6).

I.1.3.2. Получени са първи данни, базирани на морфометрични и генетични анализи за присъствието на застрашения сладководен вид блатарка (*Umbra crameri*) в Черно море. Установените генетични маркери за видова идентификация биха могли да се използват за мониторинг на разпространението на вида и неговото опазване в река Дунав (публикация Г.7.1.)

I.1.3.3. Всички черноморски карагъзови са включени в Червения списък на IUCN като уязвими видове. Липсата на съответствие между морфологичните и генетични различия показва сложността на таксономията на род *Alosa* в Черно море. За да се получат точни данни за актуалното състояние на вида и съответно опазването на карагъзовите е необходимо прилагането на генетични методи. На базата на генетично-биохимични анализи на 12 ензима (кодирани от 27 локуса) и общи мускулни протеини и хемоглобин (кодирани от 43 локуса) е извършено сравнение между двата карагъзови вида (*A. immaculata* и *A. caspia*) от българското Черноморие и река Дунав. Генетичното разстояние ($D_{Nei} = 0,038$) между тях показва, че те са дивергирали сравнително скоро. Установени са за първи път видово специфични маркери за разграничаване на двата вида, както и такива, за идентифициране на по-рядко срещания в Черно море вид *A. fallax* (публикация В.8).

I.1.3.4. За първи път е извършено сравнение между дванадесет вида попчета от българското черноморско крайбрежие, крайбрежните езера и реки на базата на генетично-биохимични анализи (скорбелна гел-електрофореза и изоелектрично фокусиране върху тънки и ултратънки гелове). Изследвани са единадесет ензима и една неензимна система (кодирани от 29 локуса) и общи мускулни протеини (кодирани от 22 локуса). Установена е за първи път междувидова хибридизация между *Neogobius (Apollonia) fluviatilis* и *Neogobius syrman* в езерото Мандра. Получени са първи данни за генетико-биохимичната характеристика на *Knipowitschia longecaudata*. Установените генетични маркери за идентификация на застрашените от изчезване видове *Knipowitschia longecaudata* и *Knipowitschia caucasica*, могат да се използват за оценка на състоянието на популациите им. Подвижността на електрофоретичните фракции на *LDH*B* локуса се използва като маркер при определяне на родовия статус на вида *Gobius ophiocephalus*. Прилагайки *LDH-B** локуса като генетичен маркер е потвърдена хипотезата, че *N. fluviatilis* и *N. melanostomus* принадлежат към подрод *Apollonia*. Четирите нови ензимни системи (*ADH*, *GPI*, *GLUDH* и *G3PDH*), приложени в таксономията на попчетата, показват специфични за вида спектри и могат да се използват успешно като протеинови биомаркери (публикация Г.7.2).

I.1.3.5. Установени са алозимни маркери за бърза и точна идентификация на петте вида зеленушки по българското черноморско крайбрежие, включени в Червения списък на IUCN за застрашените видове. Установен е генетичен маркер (*LDH*B* локуса) за разграничаване на двата рода *Symphodus (Crenilabrus)* и *Stenolabrus*. Таксономичните изследвания, базирани на генетични анализи имат принос както за определяне на биоразнообразието, така и за възстановяването и опазването на популациите на зеленушките. Предварителните данни, базирани на броя на анализиранияте проби,

показват, че *S. tinca* и *C. rupestris* са рядко разпространени по българското черноморско крайбрежие и могат да бъдат предложени като уязвими видове (публикация Г.7.8).

I.1.3.6. В българската акватория на Черно море и река Дунав за първи път са идентифицирани на морфологично и генетично ниво три естествени хибрида при есетровите от различни потомства: *Acipenser gueldenstaedti* x *Acipenser ruthenus*; *Acipenser ruthenus* x *Acipenser stellatus* и *Huso huso* x *Acipenser ruthenus*. Нарастващото присъствие на естествени есетрови хибриди в река Дунав и Черно море е още едно доказателство за намаляване на запасите им и представлява потенциална опасност за генетично замърсяване на тези видове, което би застрашило и биоразнообразието им (публикация Г.23).

I.1.3.7. На базата на изоелектричното фокусиране на хемоглобина върху полиакриламиден амфолинов гел са установени два видово-специфични спектъра при калкана пред българския бряг, кореспондиращи с морфологичните им различия. Получените данни могат да служат за видова идентификация на вида пред българския бряг на Черно море (публикация Г.24).

I.1.3.8. Посредством алозимни анализи е установена генетичната дивергенция и филогенетичната връзка на двата вида: *Mullus barbatus* от западната част на Черно море (Варна) и *M. surmuletus* от Средиземно море (Солун). Общите мускулни протеини и ензими могат да се използват като специфични маркери за разграничаване на двата вида. Генетичното разстояние между *M. barbatus* и *M. surmuletus* ($D_{Nei}=0.526$) и времето на дивергенция ($t_{Nei} = 3\ 215\ 000$ години) са доказателства за съществуването на два добре дивергирали вида в един род. За първи път са регистрирани хибриди между *M. barbatus* и *M. surmuletus* в Средиземно и Черно море (Большой Утриш, Русия) (публикация Г.31).

I.1.3.9. На база на анализи на генната последователност на митохондриалния ДНК маркер - цитохром с оксидаза III (СОIII) и на морфологични данни е установена валидността, разпространението и филогенетичните връзки на три вида калкан, *Scophthalmus maeoticus*, *S. maximus* и *S. rhombus* от Черно море (турското, българското и руското крайбрежие) и турското кайбрежие на Мраморно море. Филогенетичният анализ показва най-голяма отдалеченост между *S. maximus* и *S. rhombus* и по-голяма близост на видовете *S. maximus* и *S. maeoticus*. Установено е, че СОIII е генетичен маркер, приложим за видова идентификация в род *Scophthalmus* поради неговата вътрешноспецифична хетерогенност, създаваща специфични за вида характеристики с приложение в управлението и опазването на запасите. Генетичните данни са подкрепени и от установените морфометрични вариации при видовете калкан (публикация Г.36).

I.1.3.10. За първи път е приложено секвениране от ново поколение за оценка на планктонното разнообразие пред българския бряг (Варненски залив). Голяма част от оперативните таксономични единици (175 OTUs = 72.3%) са идентифицирани на видово ниво, включвайки видове, типични за българското черноморско планктонно съобщество, както и много видове, които не са били съобщавани по-рано за нашия бряг (124 OTUs = 51.2 %). Установено е, че с най-голям брой видове (77 OTUs, включващи 31.8% от видовете протисти) са представени динофлагелатите, предимно от родовете *Gyrodinium* и *Heterocapsa*. Установени са 12 вида, посочени като вредни, някои от които (напр. *Cochlodinium polykrikoides*, *Karenia bicuneiformis* и *Karlodinium veneficum*) не са били

съобщавани по-рано в българската акватория на Черно море. Проведеното изследване е с принос към оценката на възможността за включването на метагенетичните анализи в програмите за мониторинг на планктонното съобщество в Черно море (публикация Г.7.10, Г.38).

I.1.3.11. Получени са нови данни за фитопланктонното разнообразие в седименти от различни райони на Черно море, оценени с помощта на метабаркодирането на ДНК (V7-9 хипервариабилна област на 18S рДНК), чрез прилагане на секвениране от ново поколение. Идентифицирани са 180 вида микроводорасли с високо ниво на сходство към референтни секвенции в базите данни. От динофлагелатите най-разпространени са родовете *Biecheleria*, *Gymnodinium* и *Karlodinium*, а от диатомите - *Skeletonema*, *Chaetoceros* и *Thalassiosira*. Установени са и 16 потенциално токсични вида, някои от които представени във всички станции, което подчертава екологичното значение на бентосните етапи на покой за „вредните цъфтежи“ на фитопланктона. По-голямата част от тези видове са съобщени за първи път за Черно море (публикация Г.7.12).

I.1.3.12. Анализирано е генетичното разнообразие в рамките на род *Pseudonitzschia* пред българския бряг на Черно море. На база на молекулярен анализ, използвайки специфични за рода маркери (LSU rDNA) са установени три вида от този род във Варненския залив, единият от които е потенциално токсичен. С помощта на молекулярната идентификация за първи път е установен видът *P. linea* Lundholm, Hasle и G.A.Fryxell, 2002 г. в Черно море и за първи път е потвърдено присъствието на видовете *P. calliantha* Lundholm, Moestrup & Hasle, 2003 и *P. pungens* var. *aveirensis* Lundholm, Churro, Carreira & Calado, 2009 в български води. Молекулярните данни дават възможност и за определяне на подвидовия статус на един от посочените видове (*P. pungens* var. *aveirensis* Lundholm, Churro, Carreira & Calado, 2009) (публикация Г.7.20).

I.1.4. Прилагане на генетични и морфометрични маркери за оценка популационно-генетичната структура с принос към точната оценка на запасите, прилагане на ефективно управление на риболова и мерки за опазване на видовете.

I.1.4.1. Установени са вътревидови различия между популациите на вида *Barbus cyclolepis* от изследваните находища в България, Македония и Гърция на базата на алозимни анализи на общите мускулни протеини и шест ензимни системи (AAT, EST, MDH, LDH, ME, SOD), прилагайки протеинова гел-електрофореза и изоелектрично фокусиране (IEF) върху тънък полиакриламиден амфолинов гел. Установено, че видовете *Barbus sperchiensis* и *Barbus strumicae* са генетично по-близки помежду си, отколкото всеки един от тях по отделно с вида *Barbus cyclolepis* (публикация В.4).

I.1.4.2. Получените нови данни за полиморфните вариации в някои локуси като *HB-1**, *HB-2**, *PROT-1**, *PROT-2**, *PROT-3**, *ADH**, *EST-3**, *MDH-1**, *MEP-1**, *MEP-2**, *PGM-2** и *SDH** могат да се използват за анализи на популациите на *Alosa immaculata* (публикации В.8 и В.9).

I.1.4.3. Опазването и устойчивостта на популациите на калкана, подложени на „прекомерна експлоатация“ GFCM (2018), изисква познания за генетична структура и постоянен мониторинг на биоразнообразието му. ДНК баркодингът е важен инструмент

за проследяване и наблюдение на застрашени популации с фокус върху опазването на отделни генетични запаси и смекчаване на антропогенните въздействия по целия им ареал. Анализът на генетичната структура в популациите на калкана в Черно море допринася за установяване на генетичното му разнообразие. В тази връзка са получени нови данни за популационно-генетичната структура на калкана (*S. maximus*) от Черно (пред българския, румънския, турския и руски бряг) и Мраморно (пред турския бряг) морета на база на алозимни анализи (26 локуса от четири вида тъкан: мускулна, ретина, плазма и хемоглобин), както и на пет до седем микросателитни и един/два mtDNA (COII и CR) маркери. За първи път е приложен мултидисциплинарен подход (молекулярно-генетичен и морфологичен) за оценка на популационно-генетичната структура на калкана пред българския бряг на Черно море (Г.7.15). Анализът на данните не дава ясни индикации за наличието на филогеографска диференциация сред изследваните популации на калкана, обитаващ Черно море (публикации В.7, Г.7.13, Г.7.15, Г.32, Г.40). Установената липса на корелация между генетичните и географски разстояния по българското и румънско черноморско крайбрежие (публикации Г.7.15 и Г.32) чрез прилагане на различни генетични маркери, вероятно е доказателство, че хидродинамичните фактори имат ефект върху потенциала за разпространение по време на личиновите стадии и впоследствие водят до липса на генетичната диференциация. Установена бе и втора генетично различна единица, включваща популациите на калкана от Мраморно море (публикация Г.7.13). Всичко това дава допълнителни възможности за оценка и сравнение на популациите на калкана и може да бъде основа за изграждане на дългосрочен мониторинг на промените в структурата на популациите (публикация В.7), което е важна предпоставка за успешното устойчиво развитие и стратегии за опазване (публикация Г.7.15). Получените резултати за наличието на единен запас и регионалното му споделено управление, е с принос към устойчивото дългосрочно използване на калкана по черноморското крайбрежие (публикация Г.32).

I.1.4.4. Извършен е сравнителен анализ на морфометрични и меристични характеристики на екземпляри от калкан (*Scophthalmus maximus* L.) от районите на Шабла, Шкорпиловци, Несебър и Царево по Българското Черноморие. Изследвани са модели на растеж като връзка дължина-тегло (LWR) и връзки и съотношения като стандартна дължина (SL) – обща дължина (TL), дължина на главата (HL) – дълбочина/височина на тялото (BD/ВН), BD/ВН – SL, с цел идентифициране на специфични разлики в пробите. Установени са нови данни за наличие на вътревидови морфометрични вариации и тенденция за повишаване на стойностите на алометричния коефициент на калкана, от северния към южния район, които допълнително трябва да бъдат подкрепени чрез анализ на генетичното разнообразие (публикация Г.21). Получените резултати са с принос към необходимостта от добавяне на повече знания за идентифициране на популациите, прилагане на успешни стратегии за опазване и оптимизиран дизайн на проучвания за оценка на запасите и устойчива експлоатация на изследваните видове (публикация Г.21)

I.1.4.5. Получени са първи данни за оценка на генетичното разнообразие и популационно-генетичната структура на барбунята (*Mullus barbatus*) по българското черноморско крайбрежие (Българево и Царево) чрез анализ на два митохондриални и

девет микросателитни праймера. Установена е липса на генетично структуриране сред анализираниите популации, показващо вероятно наличието на един запас от вида. Наблюдаваното ниско хаплотипно и нуклеотидно разнообразие по COI маркера в популацията от Българево корелира с по-високите стойности на реализираните улови за периода 2018-2020 година в северната акватория на Черно море, по данни за уловите на ИАРА. Това показва, че ниската степен на генетично разнообразие може да е резултат от прекомерната експлоатация на вида. Установените стойности на ефективния размер на популацията (N_e) от порядъка на няколкостотин и M -коефициента под критичните прагови стойности за вида ($G.W$ индекс 0.73) вероятно отразяват последните промени в популациите, дължащи се на комбинация от висок риболовен натиск, фрагментация на местообитанията и естествено възникващи колебания в размера на популацията. Предвид увеличаващите се улови от този вид, получените данни са с принос към бъдещото рационално използване и опазване на този стопански ценен вид (резултати по проект ФНИ, №КП-06-Н41/7/30.11.2020г.).

I.1.4.6. Установени са за първи път полиморфни локуси *EST-3**, *EST-4**, *LDH-B**, *sMEP-1**, *sMEP-2** и *MDH-1**, които могат да се използват за оценка на популационната инфраструктура на *Neogobius* (*Apollonia*) *melanostomus*, *Gobius niger*, *Pomatoschistus marmoratus* и *K. caucasica* (публикация Г.7.2)

I.1.4.7. Изследвана е генетичната структура на единадесет популации на стопански ценния вид паламуд (*Sarda sarda*) от Черно, Мраморно, Егейско, Средиземно и Адриатическо морета, на база секвениране на D-loop гена на митохондриална ДНК. Установени са три генетично различни популации: в Черно и Мраморно море, в Егейско море и по средиземноморското крайбрежие на Турция и популацията от Адриатическо море (по хърватския бряг). Получените резултати за разграничаване на популациите, представляващи отделни запаси, имат принос към въвеждане на адекватната и щадяща вида експлоатация (публикация Г.7.5).

I.1.4.8. Анализирани са три популации на *A. melanostomus* от различни български местообитания (р. Дунав, Белене, ез. Дуранкулак и Синеморец) с оглед на тяхната морфологична, биохимико-генетична изменчивост и устойчивост на промени на солеността. Установено е, че *A. melanostomus* има забележителна способност за колонизиране на нови местообитания с различни стойности на солеността от 0 до 17 ‰ и се оценява като толерантен по този показател. Единадесет неензимни и 16 ензимни локуса са тествани като генетични маркери. Установени са две полиморфни ензимни системи (естеразите и малат дехидрогеназата) приложими за идентифициране на популациите на *A. melanostomus*. Изследвано е и генетичното разнообразие при трите популации (публикация Г.7.7).

I.1.4.9. Анализирана е популационно-генетичната структура на хамсията от Черно (българския, турския, украинския и грузинския брегове) и Азовско морета чрез прилагане на генетико-биохимични маркери. Въз основа на дългосрочно проследяване на алелните честоти на полиморфните естеразни локуси (*EST-1** и *EST-2**), е установено за първи път, че миграцията за зимуване на азовската хамсия се осъществява и по западното черноморско крайбрежие. Установени са за първи път смесени популации на азовската и черноморската хамсия по украинското, грузинското и турското черноморско

крайбрежие. Азовска хамсия е регистрирана и по българското крайбрежие през втората половина на май и юли. Резултатите позволяват да се приеме, че северозападната част на Черно море е допълнителна акватория за размножаване на азовската хамсия (публикация Г.30).

I.1.4.10. Анализирани са за първи път генетичното разнообразие на десет популации на сребрилата каракуда (*Carassius gibelio*) в България и е установено, че генните честоти на полиморфните локуси на общите мускулни протеини и пет ензимни системи могат да се използват като генетични маркери за разграничаване на популациите на вида в България. Анализът на генетичните разстояния между популациите показва разпространение на сребрилата каракуда от басейна на р. Дунав към водоемите във вътрешността на страната (публикации Г.7.3, Г.25 и Г.27).

I.1.4.11. Анализирани са естеразите като специфични маркери за оценка на генетичното разнообразие на популациите на черната мида (*Mytilus galloprovincialis*) от два района по северното българско черноморско крайбрежие (Галата и Албена). Установено е високо ниво на генетично разнообразие в изследваните популации и ниско ниво на генетична диференциация, показващо неограничен генен поток между тях, вероятно резултат от пелагичните ларвни фази в жизнените им цикли. Проучването на изменчивостта на черната мида е важна за генетичния мониторинг и опазването на нейното генетично разнообразие (Г.37).

I.1.5. Принос към оценка на състоянието на рибните популации в зоните НАТУРА 2000

Направена е оценка на екологичното състояние на рибните популации на пет ихтиовида (*Psetta maxima*, *Sprattus sprattus*, *Alosa immaculata*, *Engraulis encrasicolus* и *Trachurus mediterraneus ponticus*) в Натура 2000 зоните на Българското Черноморие по три групи параметри, свързани с данни за популацията, разпространението и заплахите. Анализът на получените данни се основава на проследяване на тенденциите на промяна на стойностите на различни биологични параметри през различните години. Предложени са допълнителни райони за мониторинг, за да се получат достатъчни данни за оценка на географско (само за видове, които са докладвани по чл. 17 от Директивата за местообитанията) и национално ниво. Такъв вид в Черно море е карагозът (*Alosa immaculata* E. T. Bennett, 1835). От голямо значение са допълнителните изследвания на моделите на растеж, миграционните пътища, зоните за хвърляне на хайвера и храненето на този анадромен вид (публикация Г.7.6). Установен е сезонен характер по отношение на размерната структура на видовете с търговски интерес в българската морска зона и особено тези, включени в Натура 2000. Сезонният характер на различните видове и използваните риболовни уреди са много важни при анализиране на състоянието им и това на техните популации (публикация Г.7.6).

I.1.6. Принос към систематизиране и актуализиране на наличната информация по отношение на видовия състав на черноморската ихтиофауна. Таксономични, консервационни и екологични аспекти за оценка на ихтиологичното биоразнообразие.

I.1.6.1. Представен е ревизиран и актуален списък на ихтиофауната в Черно море според наличните данни в черноморските страни, и според природозащитния им статус. За по-голямата част от видовете (около 50% от всички морски видове риби) природозащитният статус е оценен като недостатъчен на данни и неоценен. Във всички черноморски страни трябва да се прилага добро управление на рибарството и общи мерки за опазване (публикация Г.7.4). Изготвен е списък на неместните видове риби (двадесет и един вида, принадлежащи към осем рода) в Черно море на базата на публикувани данни, включително и за годината и мястото на първото им появяване в национални води (публикация Г.29).

I.1.6.2. Установено е съвременното състояние на гобиидната ихтиофауна (Gobiidae) в България, включваща 24 вида попчета, обитаващи Черно море, неговите реки и крайбрежни езера, река Дунав и нейните притоци, реките Марица и Тунджа. В българския дунавски участък и неговите притоци се срещат шест вида попчета, а два вида са установени в българския сектор на река Марица и Тунджа. Уточнен е и природозащитният статус на видовете. Седемнадесет от тях са с консервационна значимост, вписани в национални и международни документи (публикация Г.28). Опазването на местообитанията на попчетата, заедно с устойчивото използване на техните запаси са важни въпроси, свързани с опазването и управление на този ценен ресурс за българското черноморско крайбрежие (публикация Г.28).

I.1.7. Принос към оценката на инвазивни и чужди видове

I.1.7.1. Проучена е морфологичната вариабилност на инвазивния вид стронгил (*Neogobius melanostomus*) от местни черноморски и инвазивни популации от морски и сладководни екосистеми, принадлежащи към водосборите на Черно море, Балтийско море и Големите езера. Стронгилите от българските притоци на р. Дунав и тези от водосбора на Големите езера (Северна Америка) показват сходни морфологични изменения. Тези прилики между различни, географски отдалечени неместни популации, подкрепят идеята, че обща морфологична адаптация може да допринесе за инвазивния успех на вида (публикация Г.7.16).

I.1.7.2. Оценено е състоянието на популациите на шест чужди вида от различни таксономични групи (зоопланктон - *Mnemiopsis leidyi*, *B. ovata*, *A. tonsa* и *O. davisae*, бентос - *R. venosa* и един вид риба - *Liza haematocheila*) във Варненски залив, през периода 2015-2016 г., направена е оценка на обилието и биомасата при зоопланктона и бентосния вид, както и на връзката дължина-тегло при рапана (*R.venosa*). При последния вид е определена честотата на разпределението на дължината на черупката, според морското дъно и метода на пробовземане (публикация Г.7.9).

I.1.7.3. Представен е актуализиран и валидиран списък на чуждите видове за българското и румънско черноморско крайбрежие. Установено е, че броят им се увеличава постоянно през последните 50 години и за двете държави. Списъкът на чуждите видове включва 37 вида за Румъния и 26 за България, с най-голям брой чужди видове, принадлежащи към тип *Arthropoda* за двете страни. Тринадесет чужди вида са класифицирани като инвазивни за Румъния, докато за България те са осем. Повечето чужди видове са класифицирани като успешно установени в морските води на двете страни. Получените резултати имат принос към прилагането на мерки за справяне с въвеждането на чужди видове в западния регион на Черно море, насочени към ранно предупреждение, превенция и контрол на инвазивните видове в съответствие с ефективното прилагане на европейските политики относно инвазивните чужди видове (Регламент за ИЧВ) (публикация Г.7.19)

I.1.7.4. Получени са нови данни (морфометрични, меристични и генетично-биохимични) за идентифициране на инвазивния вид кефал *Liza haematocheila* (Temminck & Schlegel, 1845) по българското черноморско крайбрежие. Те могат да се използват както като маркери за разграничаване на инвазивния вид пиленгас от другите кефалови видове пред нашия бряг, така и за мониторинг на запасите и оценка на възможното му въздействие върху местните кефалови видове (публикация Г.33).

I.1.8. Принос към развитието на марикултурите в България като екосистемна услуга с цел намаляване на антропогенния натиск върху естествените рибни популации.

Изведени са за първи път основните критерии, приложени в ГИС - среда, които играят важна роля в анализа на геопространствената пригодност. Въз основа на анализа на ограничаващите фактори, природните условия и възможностите за развитие на марикултурата са идентифицирани пет района по българското черноморско крайбрежие, потенциално подходящи за отглеждане на есетрови риби. Установените разпределени зони за аквакултури (AZA) са от съществено значение за рационалното използване на морския бряг и морското пространство за развитие и разширяване на аквакултурата в Черно море. Анализът на комплекса от фактори показва, че стопанствата за аквакултури от риби могат да бъдат разположени и да функционират близо до брега, като крайбрежни садкови марикултури (публикация Г.7.17). Получените резултати са с принос към намаляване на антропогенния натиск върху естествените рибни популации, особено за застрашени видовете като есетровите, които са с намален запас.

I.1.9. Принос към оценка на състоянието и динамиката на живите и неживи ресурси и тяхната експлоатация в черноморския регион.

Представена е оценка на състоянието и настъпилите промени на морските живи ресурси (анадромни, пелагичните и ключови дънни видове риби, мекотели и водорасли с търговска стойност, състояние на чуждите видове в Черно море и вектори за тяхното

разпространение и въздействие върху биразнообразието), като и оценка на нивата на експлоатация на тези ресурси за периода 2009-2014 г.

Липсата на достатъчно информация относно риболовната дейност, количествата на улова, състава и неговото въздействие върху текущото състояние на рибните запаси са едни от критичните проблеми в черноморския регион. Анализът на събраните данни показва, че има само един запас от трикона, който се счита за устойчиво експлоатиран, но повечето от рибните запаси в Черно море са свръхексплоатирани до степен, в която някои от тях са близо до нивата на изчерпване. Всичко това налага да се положат повече усилия за възстановяване и устойчиво развитие на риболова, до определени целеви нива на обилие в съответствие с общата политика в областта на рибарството на ЕС (ОПОР), насочена към мерки за защита и предотвратяване на прекомерната експлоатация на рибните запаси. Разработените и приложени мерки биха могли да смекчат въздействието на риболовните дейности, застрашаващи репродуктивния капацитет и рибните запаси. За оценка на състоянието на основните биоресурси са използвани следните показатели: дългосрочна динамика на попълване, биомаса и улов, структура на популацията, размерна и възрастова структура, съотношение на половете, нива на плодовитост, преживяемост/смъртност, генетична структура, пространствено разпределение на биомасата (обилие). Направен е също така и анализ на неживите морски ресурси (добив на пясък, проучване за нефт/газ) и тяхната експлоатация за посочения период в Черно море (публикация Г.8).

II. Научно-приложни приноси

II.1.1 Разработена е биотехнология за получаване на биологичноактивни компоненти от хемоцианина на рапана (*Rapana thomasiana*) и тяхното приложение като безопасни имуномодулатори. Получени са нови експериментални данни за структурата и свойствата им, както и първите резултати, че хемоцианина и/или неговите субединици могат да се използват в различни имунизационни протоколи като вещество, повишаващо имунния отговор на организма към антигена или като протеинов носител (Г.26).

II.1.2. Депозирани са установените генетични секвенции при калкана и фитопланктонните видове - попълване на световната генетична база данни GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/) (публикации В.7, Г.7.10, Г.7.13, Г.7.14, Г.7.15, Г.40)

II.1.3. Получените данни за популационно-генетичната структура при калкана биха могли да се използват като нов индикатор за биологичен мониторинг, за да се поддържа високо ниво на генетично разнообразие в естествените популации (публикация Г.7.13). Получената генетична информация е с принос към прилагането на мултидисциплинарни оценки на запасите на стопански ценните видове риби като ключов елемент за управлението, рационалната експлоатация и опазване на рибни популации (публикации В.7, В.8., В.9, Г.7.5, Г.7.13, Г.7.15, Г.30, Г.31, Г.32, Г.35, Г.36, Г.40, Г.41).

II.1.4. Естествените популации на всички есетрови видове през 20-ти век са сериозно засегнати от свръхексплоатация в комбинация със значителна загуба и деградация на местообитанията. За рибите, за които е необходимо възстановяване на запасите им чрез „рестокинг“, се изисква информация за генетична идентичност със

съществуващите диви популации. Извършена е генетична идентификация на базата на седем микросателитни и алозимни маркери на родителските екземпляри от чига (*Acipenser ruthenus*) и тяхното потомство за установяване на генетичните вариации при екземплярите, използвани за „рестокинг“ в българската част на р. Дунав. Получените данни показваха, че избраните маркери позволяват идентифициране на чигата от български развъдни стопанства и могат да се прилагат при изпитване и контрол на маточните стада, използвани при програми за възстановяване на популациите им. Получените резултати са важни, за да се предотврати въвеждането на неместни за реката есетрови видове и междувидовата хибридизация, което има принос към опазване на биоразнообразието на есетрите в долната част на р. Дунав (публикация Г.34).

П.1.5. За първи път е приложено секвениране от ново поколение за анализ на „видимото“ и „скритото“ разнообразие от микроводорасли пред българския бряг с принос към оценката на възможността за включването на метагенетичните анализи като инструмент за прилагане на ефективни програми за мониторинг на планктонното съобщество в Черно море и оценка на екологичния риск (публикации Г.7.10, Г.7.12, Г.38 и Г.39).

П.1.6. За първи път е създаден каталог (списък) на инвазивни/потенциално инвазивни чужди видове в държавите, част от Източната и Южноевропейска мрежа за инвазивни чужди видове (ESENIA). Направеното проучване има принос към идентифициране на инвазивните видове в зоната на ESENIA. Такива списъци са важна начална стъпка за разработване на система за ранно предупреждение и механизми за бърза реакция, както и предприемане на ефективни мерки за управление на инвазивните видове, в съответствие с регламентите на ЕС № 1143/2014 (ЕС, 2014). Разработени са подробни информационни листи „fact sheets“ за десетте най-важни, на база на техния инвазивен потенциал, видове (публикация Г.7.11).

П.1.7. Установени са нови данни за количествата на най-често срещаните групи морски отпадъци и горещите точки на депонирането им по дъното в българския сектор на Черно море, които да служат като основа както за анализ на текущото състояние и мониторинг, така и за подкрепа на бъдещи дейности и проекти, свързани с отстраняването на морски отпадъци от дъното. Получените резултати имат принос като основа за създаване на стратегия за намаляване на морските отпадъци, разпръснати по дъното и смекчаване на тяхното въздействие върху морските екосистеми, и човешкото здраве (публикация Г.7.18). Представени са актуални данни за националната законодателна система за качество на повърхностните води, свързано със замърсяването на река Дунав и нейните притоци с отпадъци. Направен е преглед на съществуващото международно законодателство по отношение на водите и морската среда, включително регионални конвенции и европейски директиви. Въз основа на извършената оценка са идентифицирани Топ 10 препоръки за подобряване на правната среда и добри практики за справяне със замърсяването с пластмаси в Дунавския регион (**Научно-технически доклад, Raykov et al., 2021**).

III. Методични приноси

III. 1. Приложени са няколко допълващи се метода, като алозимен анализ, кариотипиране, флоуцитометрия и секвениране на ДНК, което позволи прецизиране на видовото разнообразие на всички съобщени по-рано видове европейски щипоци от род *Cobitis* и техните хибриди, както и разкриване на няколко нови хибридни биотипа (публикация **B.2.**).

III. 2. Допълнително са разработени и приложени нови маркери за полиморфизъм на дължината на рестрикционния фрагмент за видово определяне при европейските щипоци от род *Cobitis* (*C. albicoloris*, *C. elongatoides*, *C. taenia*, *C. tanaitica*, *C. taurica*) което би позволило недвусмислената идентификация на родителските видове и техните геноми в известните хибридни биотипове в комплекса (публикация **B.2.**).

III. 3. За първи път е изследвано планктонното разнообразие в тринадесет проби от Варненския залив с помощта на масивното паралелно секвениране (MPS) на 18S rRNA гена, използвайки платформата Illumina MiSeq 250PE (публикации **G.7.10**, **G.38**) Получени са нови данни за фитопланктонното разнообразие в седименти от различни райони на Черно море, оценени с помощта на метабаркодирането на ДНК (V7-9 хипервариабилна област на 18S рДНК), чрез прилагане на секвениране от ново поколение (публикация **G.7.12**). Секвенирането от ново поколение е надежден подход с принос към изследване и оценка на биоразнообразието, съхранявано както във водната среда, така и в морските седименти.

III. 4. Разработен е ефикасен и полезен метод чрез утаяване с амониев сулфат за изолиране на препаративни количества чист хемоцианин от хемолимфата на рапана (*Rapana thomasi*). Чрез гел хроматография, SDS-PAGE, трансмисионна електронна микроскопия и абсорбционна спектроскопия е оценено, че хемоцианина от *Rapana thomasi* се изолира с добър добив и висока чистота и е подходящ за широкомащабно приготвяне (публикация **B.5**).

IV. Принос към академичното образование и обучението на студенти

Публикувано е университетско учебно пособие „**Практическо ръководство за упражнения по ихтиология: микроинвазивни методи за теренни и лабораторни изследвания на риби**“ (с автори Елиза Узунова, Петя Иванова и Димитрий Дашинов) с принос към академичното образование в областта на биологическите науки (специалности, изучаващи зоология, ихтиология, аквакултури) и други дисциплини. Разработените лабораторни и теренни упражнения, позволяват овладяването на практически умения за прилагане на неинвазивни и микроинвазивни подходи за изучаване на рибите. Всеки от модулите е подкрепен и с базова теоретична информация, подпомагаща практическата работа, а посочените литературни източници дават възможност за собствени проучвания по всяка тема. Представените в това ръководство методики са съобразени с масово достъпната апаратура и нивото на познания на студентите в образователно ниво „бакалавър“ и „магистър“ от СУ „Св. Климент Охридски“, и другите университети в страната. Ръководството може да представлява

интерес и за неспециалисти, интересуващи се от ихтиология, опазване на околната среда и аквакултури.

27.03.2023г.

гр.Варна

Подпис:

/доц. д-р П. Иванова/