



ПЛОВДИВСКИ УНИВЕРСИТЕТ

"ПАИСИЙ ХИЛЕНДАРСКИ"

ФАКУЛТЕТ "БИОЛОГИЯ"

*Катедра "Физиология на растенията и Молекулярна
биология"*

**„ПРОУЧВАНЕ НА БИОРАЗНООБРАЗИЕТО И ПОПУЛАЦИОННАТА
ДИНАМИКА НА СЕМЕЙСТВО GOBIIDAE (ПОПЧЕТА) В ЧЕРНО
МОРЕ ПОСРЕДСТВОМ МОЛЕКУЛЯРНИ МАРКЕРИ”**

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т

на

ДИСЕРТАЦИЯ

за присъждане на образователната и научна степен
"Доктор"

НАУЧНА СПЕЦИАЛНОСТ:

„Молекулярна биология”

Научни ръководители:

Проф. д-р Илия Денев

Проф. д-р Даниела Клисарова

Докторант:

Фериха Мюмюнова Церкова

ПЛОВДИВ

2018 г.

Дисертационният труд съдържа 136 страници текст в това число се включват и 22 таблици и 28 фигури. Допълнително в работата са включени и 4 приложения.

Списъкът на цитираната литература включва 221 заглавия, от които – 28 на кирилица и 193 на латиница.

Дисертационният труд е подготвен по докторантска програма „Молекулярна биология” - задочна подготовка (2013 г.) при катедра "Физиология на растенията и Молекулярна биология" към Пловдивски университет "Паисий Хилендарски"

Публичната защита на дисертационния труд ще се проведе на 20.02.2018 г. от 13:00 ч. в зала „Европа“ на Биологически факултет на ПУ „П. Хилендарски

Материалите по защитата са на разположение за интересуващите се в центъра по кариерно развитие към ПУ „П. Хилендарски” – ректорат, ул. „Цар Асен” №24 ет. 1, стая 120

Докторантката има публикувани общо 17 статии, от които 3 са в списания с импакт фактор.

Дисертацията е базирана на три от тези статии, една от които е в списание с импакт фактор.

ПЛОВДИВСКИ УНИВЕРСИТЕТ "ПАИСИЙ ХИЛЕНДАРСКИ"
ФАКУЛТЕТ "БИОЛОГИЯ"
Катедра "Физиология на растенията и Молекулярна биология"

Фериха Мюмюнова Церкова

**„ПРОУЧВАНЕ НА БИОРАЗНООБРАЗИЕТО И ПОПУЛАЦИОННАТА ДИНАМИКА
НА СЕМЕЙСТВО GOBIDAE (ПОПЧЕТА) В ЧЕРНО МОРЕ ПОСРЕДСТВОМ
МОЛЕКУЛЯРНИ МАРКЕРИ”**

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т
на
ДИ С Е Р Т А Ц И Я

за присъждане на образователната и научна степен "Доктор"

НАУЧНА СПЕЦИАЛНОСТ: „Молекулярна биология”

Научни ръководители:
Проф. д-р Илия Денев
Проф. д-р Даниела Клисарова

Научно жури:
Проф. д-р Галина Яхубян – председател
Проф. д-р Иван Атанасов – рецензент
Проф. д-р Илия Димитров Денев
Доц. д-р Елица Петрова – Павлова – рецензент
Доц. д-р Веселина Михнева

ПЛОВДИВ
2018 г.

ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ И ТЕРМИНИ

Cyt b – ген кодиращ цитохром б

DnaSP Ver. 5.10.01. – Софтуер, изчислява вариациите на ДНК секвенциите в и между популациите; Генния поток, генното превръщане, параметри на рекомбинация и небалансиращо свързване

MEGA 7 - Софтуер, статистически методи за молекулярен, еволюционен и генетичен анализ

mitDNA- митохондриална ДНК-а

PRIMER 3 Plus – Софтуер, проектиране на PCR праймери с помощта на ДНК последователности

rRNA-рибозомна РНК-а

SNPs -единични нуклеотидни замествания (полиморфизми)

TBE- трисборатен буферен разтвор

VectorNTI 10.1- Програма, която предлага мулти-модулен, интегриран анализ на секвенции

TAE– трисацетатен буферен разтвор съдържащ ЕДТА

Монотипична група - Висок ранг таксон, който съдържа само един вид

Монофилетична група- Еволюционно групиране, което включва общ предшественик и всички негови потомци

Парафилия – Групи, които имат общ произход, но които не включват всички потомци

Праймер- е къса верига на РНК или ДНК (обикновено около 18-22 бази), която служи като изходна точка за ДНК синтез

Хаплотип - При митохондриите се използва като набор от свързани единични нуклеотидни полиморфизъм (SNP), които се наследяват от един родител по майчина линия.

1. Въведение в проблематиката

Представителите на семейство **Gobiidae** (Попчета) наброяват между 1500 – 1900 вида, които са обединени в 6 подсемейства (*Amblyopinae*, *Benthophilinae*, *Gobiinae*, *Gobionellinae*, *Oxudercinae*, *Sicydiinae*) и около 230 рода (Nelson, 1994; Hoese, Larson, 2006). Това са предимно дребни риби, обитаващи солени, бракични и сладки води в умерените, субтропическите и тропическите ширини. Най-характерният морфологичен белег за семейството е срастването на коремните перки във вендуз. Имат две гръбни перки, нямат странична линия, но на главата имат система от чувствителни отвори – генипори. Техният брой и конфигурация са важен таксономичен белег. Тялото обикновено е покрито с ктеноидни и/или циклоидни люспи (Vassilev et al., 2012).

Семейство **Gobiidae** играе важна роля в ихтиофауната на Черно море. Представено е от 11 рода и 24 вида (Vassilev et al., 2012). Това са основно морски дънни риби, а само 3 вида – *Aphyu minuta*, *Knipowitschia caucasica* и *Knipowitschia longicaudata* водят пелагичен начин на живот. Повечето са обитатели на крайбрежната зона. Придържат се на каменисто, чакълесто и пясъчно дъно или сред водната растителност (Карпеткова и Манолов, 2010).

През 60-те години се съобщава за 23 вида попчета в българската ихтиофауна (Стоянов и др., 1963). Сред имената на българските ихтиолози, които са допринесли за идентифициране на видовия състав на попчетата и някои аспекти на тяхната биология в Черно море, реки и езера, река Дунав и нейните притоци са: Ж. Георгиев (1966), Пешев (1970), Маринов (1978), Карпеткова (1976), Василев & Пехливанов (2005) и др. През 90-те Dobrovolev & Pinchuk, (1993), Доброволов и др. (1995г.) развиват генетични и биохимични методи за установяване на специфични разлики в тази комплексна таксономична група.

Според последните и актуализирани данни (Vassilev and Pehlivanov, 2005; Vassilev et al., 2011, Vassilev et al., 2012) в България има 24 вида попчета.

Рибите в Черно море принадлежат към няколко фаунистични комплекса с добре подчертана специфика, която отразява етапите в развитието на самия ченоморски басейн. Различават се три групи: първата група са сладководни и бракични форми – автохтони, втора група първично морски форми и третата група се състои от типично морски форми – те са около 80 % от фауната на Черно море е със средиземноморски произход ("средиземноморски имигранти"). Понтийските реликти обитават бракичните заливи и лимани с ниска соленост.

Черно море през различните геологични епохи е претърпяло големи промени: преди 60 милиона години е било част от океана „Тетиди“, след което постепенно е откъснато от Световния океан и се превръща в сладководно езеро. Преди около 7000 години чрез Босфора и Дарданелите се възстановява връзката му със Средиземно море, а от там и със Световния океан. Постепенно (в рамките на 1000-1500 години), солеността на Черно море се покачва и става достатъчна, за да поддържа голям брой средиземноморски мигрантски видове включително от сем. **Gobiidae** (Рождественски, 1986; Zaitsev & Mamaev, 1997).

От научна гледна точка особен интерес представляват първично морските видове, които издържат на ниска соленост на водната среда и обитават бракични води и/или сладка вода. Тези Понто-Каспийски автохтони, принадлежащи към две семейства – **Clupeidae** и **Gobiidae** (Vassilev et al., 2012).

Интересите към сем. **Gobiidae** се определят и от икономическото му значение. За българския морски промишлен риболов, те са вторият най-голям обект след триционата (*Spretus spretus* Linnaeus, 1758), но през последните години уловът им намалява за сметка на сафрид (*Trachurus mediterraneus* Steindachner, 1868) и барбуня (*Mullus barbatus* Linnaeus, 1758) (Zarev, 2013).

Различните видове на семейство Gobiidae са изследвани освен чрез морфологични показатели и протеинови електрофоретични спектри – изоензими, изоелектрично фокусиране (Wallis, Beardmore 1984a,b, Dobrovolev et al., 1995, Dobrovolev 1996, Sorice and Caputo, 1999, Gysels et al., 2004a,b, Pampoulie et al. 2004). Този тип изследвания обаче не осигуряват висока възпроизводимост, което затруднява сравняването на получените от различни лаборатории резултати.

Систематичните взаимоотношения на Понто-Каспийските попчета с тези от Средиземноморието, Атлантическия океан и Северно море са слабо проучени, и няма единна хипотеза за техните връзки (Miller and Vasileva, 2003). Ситуацията се усложнява и от факта, че няколко вида Понто - Каспийски попчета са силно инвазивни и чрез миграционни пътища са се разсели в Балтийско и Северно море, реките в Европа и Големите езера в САЩ.

Това обуславя необходимостта от подробни изследвания на черноморските попчета с помощта на съвременни методи, базирани на секвенциите на маркерни гени. За разлика от електрофоретичните методи, ДНК секвенциите са високо репродуцируеми и позволяват сравняване на данни, получени в различни периоди от време и от различни части на света. До започване на настоящето изследване от Черно море са изолирани и секвенирани маркерни гени от силно ограничен брой проби за сравнителни нужди. Според достъпните ни данни това е първото широкомащабно изследване на черноморските попчета чрез ДНК секвенции.

Това ни позволи подробно кладистично преразглеждане и реконструкцията на филогенетичните отношения на понто - каспийските попчета и средиземноморските мигранти, основани на ДНК последователности. Подобен подход ще подпомогне за решаването на филогенетични и таксономични проблеми. Проучванията, ще допринесат и за създаване на нова и стабилна класификация на сем. Gobiidae.

2. Литературен преглед

Литературния преглед е базиран на 221 литературни източника, като последователно разглежда: Историческо развитие и съвременното състояние на Черно море, като воден басейн; Ихтиофауна на Черно море; Обща характеристика и систематика на сем. Gobiidae; Стопанско значение са попчетата за промишления с спортния риболов; Инвазивни видове - Стронгил (*Neogobius melanostomus* Pallas); Съвременно развитие на изследванията като специален акцент в този раздел имат молекулярните маркери и тяхното използване в съвременните изследвания на сем. Gobiidae и на рибите въобще.

3. Цел и задачи

Цел:

Да се изследва биоразнообразието на представителите на сем. *Gobiidae* в Черно море, посредством вариабилността на гена кодиращ цитохром *b*, като се акцентира на промишлено значимите видове по българското черноморско крайбрежие.

Задачи:

1. Да се уловят представители на промишлено значимите видове от сем. *Gobiidae* от различни участъци на българското черноморското.
2. Да се определи видовата им принадлежност на базата на съществуващите определителни таблици, базирани на описание на различни морфологични и мофрометрични белези
3. Да се изолира обща ДНК от уловените видове на сем. *Gobiidae*.
4. Да се изготвят праймери, които позволяват изолиране на генът кодиращ цитохром *b* от митохондриалния геном на представителите на сем. *Gobiidae*.
5. Да се изолират и секвенират цитохром *b* последователности от всички уловени образци на сем. *Gobiidae*.
6. Да се проведат сравнителни анализи на получените секвенции, за получаване на таксономично значими резултати.
7. Да се анализират нуклеотидните полиморфизми в секвенциите на *Cyt b* изолирани от нас и в тези анотирани в NCBI за да се изследва вътревидовото разнообразие и тенденциите в динамиката на популациите при уловените образци от различни географски райони.
8. Да се анализират междувидовите филогенетични връзки при близкородствени видове.

4. Материали и Методи

1. Материали

Изследвани бяха общо 302 представители на сем *Gobiidae*. От тях 146 бяха събрани от различни локации по Българското черноморско крайбрежие, 3 от Азовско море, 49 -от Турското черноморско крайбрежие, 55 бяха уловени по Румънското черноморско крайбрежие, а 74 уловени от реките Рейн и Мозел. Рибите бяха събирани в периода от март 2013 г. до декември 2015 г. Най-разнообразни бяха екземплярите уловени в Българското крайбрежие на Черно море. Местата на улов включват: Дуранкулак, Крапец, Шабла, Далян Зеленка, Златни пясъци, Варна, Варненско езеро, Камчия, Шкорпиловци, Поморие, Бургас, о-в Анастасия, Крайморие, Китен, Лозенец, Варвара и Ахтопол. Пълният списък на пробите е представен в прил. 1 към дисертацията.

Екземплярите бяха уловени с помощта на въдици, парагади, мрежи, риболовни кошове, трал и електрофишер. След улавяне бяха определяни морфологичните белези на рибите, измерени бяха основните биометрични показатели, а проби от опашните перки бяха консервирани в 70% етанол за последваща ДНК екстракция.

2. Използвани методи

2.1. Определяне на видовата принадлежност чрез морфологични белези

Видовете от сем. *Gobiidae* бяха идентифицирани определителите на Георгиев (1966), Vasil'eva (2007), Карапеткова (2010) и Vassilev et al. (2012).

2.2.Изолиране на ДНК

За изолиране на ДНК бяха използвани фрагменти от опашната перка на образците и Blood and Tissue кит на Qiagen. Количеството на изолираната ДНК беше определяна

спектрофотометрично чрез измерване на абсорбцията на проба при 260 nm при подходящо разреждане.

2.3. Биоинформатичен анализ с цел дизайн на праймери

За изготвяне на праймери използвахме нуклеотидните секвенции, анотирани в NCBI описани в приложение 2. Първоначално беше направено подравняване (алаймънт), на секвенциите посредством алгоритъма Clustal W заложен в програмата Vector NTI 10.1, за да анализираме вариабилността в анотираните секвенции. Получената консенсусна секвенция е използвана за изготвяне на дегенеративни праймери, посредством on-line програмата PRIMER 3 Plus (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>). Стойностите на някои от параметрите бяха модифицирани, за да може те да отговарят на очаквания размер на търсената секвенция (конкретен участък) и да се подберат две двойки непрепокриващи се праймери.

Праймерите бяха поръчани и доставени от германската фирма Metabion. Веднага след доставката, праймерите бяха разтворени в свободна от ДНК-ази вода то 100 mmol концентрация и замръзвани на -20°C . За нуждите на изследванията бяха изготвени работни разреждания до 10 mmol, което позволяваше в реакционната смес да ползваме 10 pmol/ μl .

2.4. PCR реакциите са провеждани с 2 μl ДНК с концентрация $\approx 120\text{ ng}$; по 1 μl прав и обратен праймер 10 pmol/ μl ; 21 μl стерилна дестилирана вода; 25 μl PCR Master Mix (Fermentas). Програмата за PCR реакциите включваше начална денатурация при 94°C за 5 min 35 цикъла от 94°C - 45s.; 57°C - 45s.; 72°C – 2.5 min и финално удължаване при 72°C за 6 min.

2.5. Гел-електрофореза на ДНК и PCR продуктите беше провеждана на 1% агарозен гел съдържащ 0,5 $\mu\text{g/ml}$ етидиев бромид. Получените продукти бяха визуализирани посредством UV светлина и бяха изрязани с чист скалпел от гела за използване на екстракция на PCR продукта.

2.6. За екстракция на ДНК фрагменти от гела беше използван кит от фирмата на Qiagene, като е следван протоколът, препоръчан от фирмата.

2.7. Пречистените PCR продукти бяха подложени на директно секвениране с прави и обратни праймери. Пробите бяха секвенирани в GETC Ltd. – Германия.

2.8. Биоинформатичен анализ на данни - Получените в резултат на секвенирането данни бяха подложени на биоинформатичен анализ по методите Maximum likelihood и Neighbor joining, с прилагане на молекулен часовник посредством софтуер MEGA 7 (Kumar et al., 2016), а честотата на хаплотиповете се определя чрез програмата DnaSP Ver. 5.10.01 (Librado and Rozas, 2009).

V. Резултати и Обсъждане

1. Изследване на видовете от понто-каспийската група.

1.1. Изследвани образци - В настоящата работа бяха използвани 207 екземпляра от *Neogobius melanostomus* (стронгил), уловени от различни местообитания – Дуранкулак, Шабла, Крапец, Калиакра, Златни пясъци, Варна, Варненско езеро, Камчия, Поморие, Бургас, Крайморие, Приморско, Лозенец, Ахтопол, Германия (реките – Мерзиг, Саарлуис, Гюндел, Перл, Рейн и Мосел), Турция (Фатса и Трабзон), Румъния (Румънско черноморско крайбрежие) и Азовско море. Допълнително, в сравнителните анализи бяха включени 98 секвенции, анотирани в NCBI от други автори. Изследвахме 23 екземпляра от вида *Neogobius cephalargoides* (широкоглавопопче), събрани в районите на Дуранкулак, Варна, Поморие, Бургас и Приморско, които бяха сравнени с 3 анотирани секвенции от същия вид в NCBI. Изследвани са и 24 екземпляра *Mesogobius betrachocephalus* (лихнус), както и четири секвенции, депозирани в NCBI от други автори. Изследвахме също така единични екземпляри на един *Neogobius eurycephalus* (2 екз.), *Neogobius fluviatilis* (1 екз.), *Neogobius gymnotrachelus* (1 екз.), *Neogobius ratan* (1 екз.), *Neogobius syrman* (1 екз.), както и 4 екземпляра, чиито морфологични белези не се припокриват с никой от видовете в достъпните ни определителни таблици. За тях сравнението с анотираните в NCBI секвенции, показва принадлежност към род *Neogobius*.

Видовата принадлежност на събраните от нас проби беше определяна посредством определителните таблици на Георгиев (1966), Vasileva (2007), Карапеткова (2010) и Василев (2012). Пробите бяха съхранявани в 96 % етанол до обработката им.

1.2. Изготвяне на праймери за изолиране на Cyt b от митохондриалния геном на родове *Neogobius* и *Mesogobius*

За изготвяне на праймерите ползвахме следните секвенции на Cyt b от родовете *Neogobius* и *Mesogobius*. Секвенциите на гените бяха подложени на множествово подравняване (multiple allingmetn) посредством програмата Vector NTI10.1, а на базата на получените консенсусни секвенции посредством програмата PRIMER 3 Plus изготвихме дегенеративни и ген специфични праймери. Списъкът на дегенеративните праймери е представен на таблица 1

Таблица 1

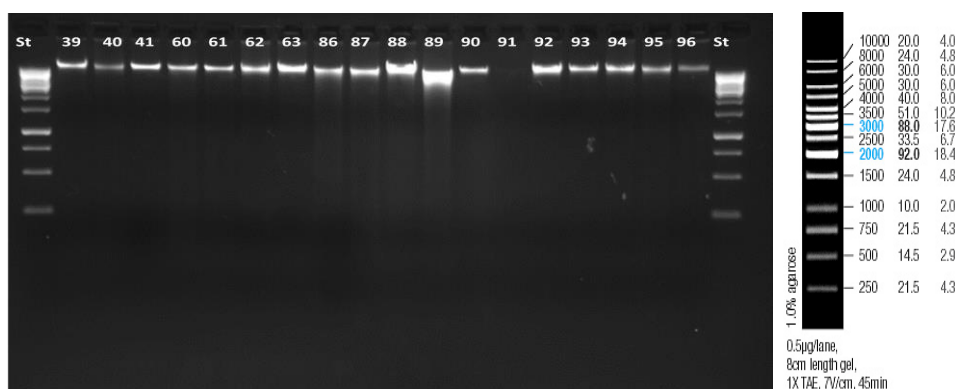
Праймери използвани за изолиране на Cytb секвенциите от родове *Neogobius* и *Mesogobius*.

Име	секвенция 5'-3'
Neogobi Fw1	5' – TACRAAAAACRCACCCACTGC -3'
Neogobi Fw2	5' – GCAAAYCAYGCACTRGTAGACC- 3'
Neogobi Rev1	5' –GKAGRETGGCGTAWGCAAET -3'
Neogobi Rev 2	5' – AGAAGTAYCAYTCRGGYTTRETGTGG -3'

1.3. Изолиране на ДНК-а

Средно по 20 мг материал от всяка проба беше използвана за изолиране на ДНК посредством Blood and Tissues кит на Qiagen (вж. Материали и методи). От всеки изолат бяха взети по 5 мкл и тествани чрез електрофореза на 0,8% агарозен гел за да се провери качеството на изолираната ДНК (Фиг. 6). При липса на ДНК от някоя проба изолирането е повтаряно.

Количеството на изолираната ДНК беше определяно чрез нейната абсорбция при 260 nm.



Фиг.1. 0,8% агарозен гел на изолирана ДНК. Номерата на пробите и видовата им принадлежност са представени в приложение 1.

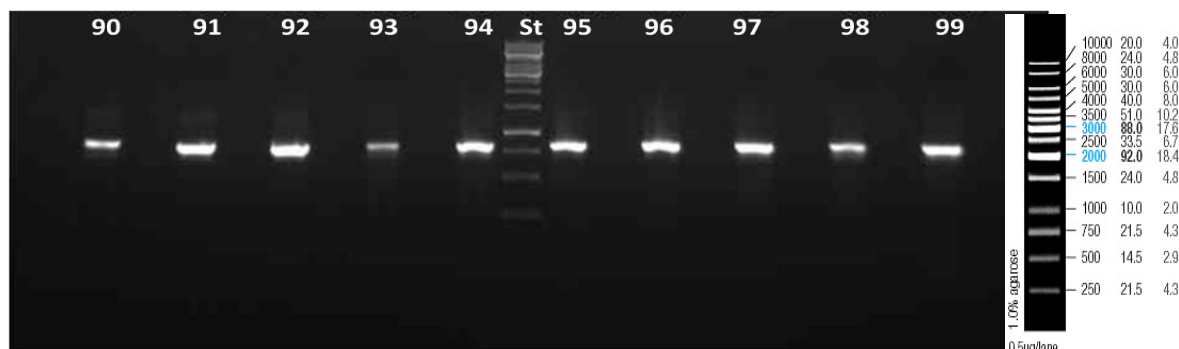
1.4. Изолиране на Cyt b региона посредством PCR и секвениране

За PCR реакциите бяха тествани всички 4 комбинации от прави и обратни праймери: Neogobi Fw1, Neogobi Fw2, Neogobi Rev1 и Neogobi Rev2. Комбинацията от външните праймери Neogobi Fw1 и Neogobi Rev1 дадоха достатъчен по количество продукт с очаквания размер и понеже обхващат по-дълъг район от гена бяха използвани за изолирането му.

PCR реакциите бяха провеждани при условията посочени в раздел „Материали и Методи”, като във всяка проба са смесвани 1 µl геномна ДНК, по 1 µl от праймерите – Fwi Rev; 12,5 µl PCR master mix и 9,5 µl ddH₂O.

PCR продуктите бяха разделени посредством гел електрофореза, на 1 % агарозен гел при волтаж 150 V (фиг. 2). Във всяко гнездо беше прибавено 25 µl от Cytb продуктите и 3 µl Loading dye (6x). Използван беше и ДНК маркер 1kb - 7 µl. Получените продукти са

визуализирани с UV светлина и изрязани за изолиране.



Фиг.2. Гел електрофореза на амплифицирани чрез PCR Cyt b фрагменти, разделени на 1,5% агарозен гел. Номерата на пробите и видовата им принадлежност са представени в приложение 1

Получените в резултат на PCR реакцията продукти бяха изрязани от гела с чист скалпел. Пречистването им беше извършено посредством QIAquick Gel Extraction kit следвайки оригиналния протокол на Qiagen. Изолираните и пречистените по описания в „Материали и Методи” начин PCR продукти бяха секвенирани двустранно в GETC Ltd. Германия. За секвениране бяха използвани ген специфичните праймери.

1.5. Биоинформатичен анализи сглобяване на секвенциите

Всеки изолиран PCR продукт беше секвениран двустранно със специфични за вида прав и обратен праймери. Целта беше да получим максимално дълги и прецизни секвенции, без инструментално интродуцирани базови вариации. Секвенирането по метода на Сенджер, извършвано в GETC, позволява получаването на секвенции отговарящи на критериите за качество на компанията с дължина до 1200 н.д. Реално с отдалечаване от мястото на праймиране, точността постепенно намалява като компанията подчертава частта от секвенциите, която съответства на вероятност за грешка под 0,1%. Размерът на протеин – кодиращата част на гена за Cyt b е 840 нд. Това наложи секвениране и с обратен праймер, за да получим по-висока достоверност на секвенциите. Тъй като получената при използване на обратния праймер секвенция е на „комплиментарната” верига първоначално използвахме функцията на MEGA 7 (Kumar et al., 2016) да генерира обратно копие на тази верига. По този начин и двете секвенции представляват само „правата” верига. След това, чрез функцията за алайнмент последователно насложихме двете секвенции, за да получим единична секвенция на Cyt b от всяка една проба както е показано на Фиг. 3. Освен това този подход допълнително гарантира отстраняването на евентуални инструментални грешки.

```
CCTGATGAAACTTCGGCTCTCTCCTCGGCCTATGTTTAATTGCTCAAATTGTAA
GGCCTATGTTTAATTGCTCAAATTGTAAACAGGGCTTTTTCTAGCCATACACTACACCTCGGAT
```



```
CCTGATGAAACTTCGGCTCTCTCCTC GGCCTATGTTTAATTGCTCAAATTGTAAACAGGGCTTTTTCTAGCCATACACTACACCTCGGAT
```

Фиг 3. Сглобяване на цялостната секвенция на Cyt b за всяка една проба

При разминаване между двете секвенции бяха преглеждани пиковете в хроматограмите и при нужда пробата беше изпращана за ново секвениране. Получените резултантни секвенции бяха експортирани отново в програмата MEGA 7 за филогенетична обработка, а честотата на хаплотиповете беше определена чрез програмата DnaSP Ver. 5.10.01 (Libardo P. & Rozas J., 2009).

1.6. Анализ на резултатите

1.6.1. *Neogobius melanostomus* (Pallas, 1814)

Анализът с програмата DnaSP Ver. 5.10.01 ни позволи да определим честотата и позицията на нуклеотидните замествания както в нашите, така и в анотирани в NCBI последователности. Установихме общо тридесет и един хаплотипа. (Таблица 2). Представеността на хаплотиповете варира между 0.48% до 71.01%. Най-широко представения хаплотип (71.01%) условно означихме като хаплотип 1. Той се среща както в Евразия, така и в Северна Америка включвайки Големите езера в Америка, Балтийско и Северно море, европейските реки Дунав, Рейн, Саар, Перл, както и в Русия (р. Днепър, р. Москва, р. Черна). В Черно море този хаплотип е повсеместно разпространен.

След хаплотип 1 най – многоброен е хаплотип 26 (8.21%). Той обхваща представителите на вида, обитаващи изцяло Каспийско море, както и такива навлезли в р. Волга.

Следва хаплотип 3 (2.9%), които включва представители на *N. melanostomus* от Крапец, Варна, Бургас и Каспийско море. С представеност 1.93%, хаплотип H_16 обхваща представители обитаващи р.Днепър, р. Дунав и Азовско море. Останалите хаплотипове имат ограничено разпространение. Например хаплотипове H_11, H_12, H_13, H_14, H_17, H_18, H_19, H_20, H_21, H_22, H_25 са представени в северната част на Черно море (Украйна и Русия) и прилежащите реки (Днепър, Буг, Кубан) както и Азовско море. Хаплотиповете H_27, H_28, H_29, H_30, H_31 са представени в Каспийско море и р. Волга. В изолирани локации по румънското и българското черноморско крайбрежие установихме представители на хаплотипове H_2, H_4, H_5, H_6, H_7, H_8, H_9, H_10, H_13 и H_15. Два хаплотипа (H_23 и H_24) на *N. melanostomus* се срещат само в Големите езера в Северна Америка.

Честотата и типът на нуклеотидните замени са анализирани допълнително посредством програмата MEGA 7. Установените нуклеотидни субституции включват 35 транзиции и 15 трансверсии. Тенденциите в типовете нуклеотидни субституции (R) е определена.

Вероятността на заместване на една от друга база е представена в таблица 3. За простота, сборът от честотите на всички субституции е приравнена на 100%. Нивата на различните транзиции са показани с удебелен шрифт, а тези на трансверсионните субституции - в италик. Честотите на срещане на отделните нуклеотиди в изследваните 207 нуклеотидни последователности са 26.03% (A), 25.59% (T/U), 16.10% (C), и 32.29% (G). Съотношенията между транзиции/трансверии при пурини (k1) е 8.743, а при пиримидини (k2) е 3.933. Общата тенденция в съотношението между транзиции/трансверии е изчислена по формулата $R = [A * G * k1 + T * C * k2] / [(A + G) * (T + C)]$. В случая с *N. melanostomus*, стойността на $R = 2.835$ (Tamura, 2004).

Стойности на R, по-високи от 4, показват значителен еволюционен натиск. Установената от нас стойност на R е индикация, че представителите на *N. melanostomus* независимо, че разширяват своя ареал и показват високо ниво на мутации, не са подложени на сериозен селекционен натиск.

Освен това, изолираните секвенции бяха подложени на Tajima's Neutrality Test (Tajima D-тест). Стандартният статистически Tajima D тест за намиране на единични нуклеотидни замествания (SNPs) сравнява броя на редките до средночестотните вариации (Tajima 1989b). Tajima D е стандартната разлика между две често използвани мерки за варибилност: Θ_w , която се базира на общия брой сегрегационни места и е повлияна най-много от нискочестотните вариации (Watterson, 1975) и Θ_π , която се основава на средна етерозиготност и е повлияна най-много от вариантите с междинна честота (Tajima 1989b). D теста може да бъде полезен при откриването на процесикато подбор, произход и промяна в размера на популацията (Charlesworth et al., 1993) (Justin C. Fay & Chung-I Wu, 2000).

Резултатите са преставени в таблица 4.

Таблица 2

**Нуклеотидни субституции в цитохром б при различните хаплотипи на *N. melanostomus*.
Номера на позицията показва вариабилен сайт в дадения регион на гена, (.) – индикира
идентична база с отбелязаната при H_1.**

Хапл	Позиции																													
	27	40	60	63	72	75	77	79	93	108	111	118	121	122	123	133	136	138	144	146	166	177	179	187	199	199	208	208	218	
H_1	G	G	C	A	C	T	A	A	A	C	C	T	T	T	C	G	A	A	G	C	G	T	G	G	A	A	C	C	C	
H_2	A
H_3	C
H_4	T
H_5	.	.	A	C
H_6	A
H_7	T	.	C
H_8	C
H_9	C	C
H_10	T	A
H_11	C	T
H_12	.	A	A
H_13	T
H_14	G
H_15	A
H_16	A
H_17	G
H_18	.	.	.	C
H_19	C
H_20	G
H_21	A
H_22	A	.	.	C
H_23	A	.	G
H_24	A	A
H_25	G
H_26	A	T	.
H_27	A	A	T	.
H_28	A	.	G	.	T	.	.
H_29	A	.	.	T	T	.	.
H_30	A	A	.	.	.	T	.	.
H_31	A	G	.	.	T	.	.

Таблица 3

Максимални съставни сходства, установени от модела на нуклеотидните субституции при *N. melanotomus*.

	A	T	C	G
A	-	3.21	4.06	17.68
T	3.27	-	15.95	2.02
C	3.27	12.64	-	2.02
G	28.59	3.21	4.06	-

Таблица 4

Резултатите от Tajima's Neutrality Test (Tajima F., 1989), *N. melanotomus*.

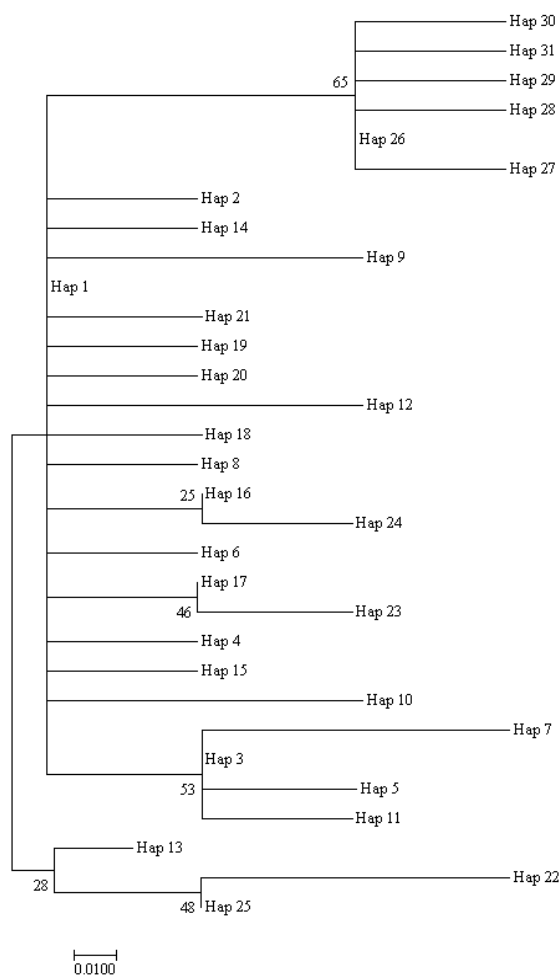
m	S	p_s	Θ	π	D
305	29	0.123404	0.020889	0.003840	-2.292597

ПОЯСНЕНИЕ: Анализът включва 305 нуклеотидни секвенции. Кодонните позиции, които са включени: 1st+2nd+3rd+Noncoding MEGA 7 (Kumar, 2016). Съкращения: m = брой секвенции, S = брой на сегрегационните сайтове, $p_s = S/n$, $\Theta = p_s/a_1$, π = нуклеотидно многообразие, и D е Tajima статистически тест (Nei M., 2000).

Отрицателната стойност на $D = -2.292597$ при вида *N. melanotomus* (Табл. 4), потвърждава, че популациите на *N. melanotomus* разширяват своя ареал и завземат нови територии.

С програмата MEGA 7 беше създадена обща матрица съдържаща всички изолирани от нас секвенции на Cyt b от *N. melanotomus* и 98-те секвенции депозириани в NCBI от други автори. С нейна помощ построихме филогенетичното дърво на всички изследвани секвенции от различните локации, което е представено в приложение 3.

На фигура 4 е представено филогенетично дърво представящо само отделните хаплотипове.



Фиг. 4. Филогенетично дърво представящо взаимоотношенията между хаплотиповена *N. melanotomus*. Използван метод Maximum Likelihood с филогенетиен тест bootstrapping (500 повторения).

1.6.1.1. Обсъждане

Стронгилът е най-широко разпространеният и многочислен вид сред българските попчета. Неговото първоначално разпространение обхваща басейните на Черно, Каспийско, Азовско и Мраморно морета. През деветдесетте години на XX век, стронгилът достига Горен Дунав и неговите притоци в Сърбия, Унгария, Словакия, Чехия, Австрия и Германия. Видът е установен и в Аралско море, но впоследствие изчезва оттам, вероятно поради значителното нарастване на солеността. Приблизително по същото време стронгилът е установен и в Големите Езера в Северна Америка и в Балтийско море. В тези водоеми той достига висока численост. В Черно море се среща навсякъде по крайбрежието: в морето, крайморските езера, речните естуари и долните течения на черноморските реки. Видът обитава цялото българско протежение на река Дунав, устията и долните течения на повечето от нейните притоци. Наскоро стронгилът беше установен в долното течение на река Марица в Гърция (Vassilev, 2012). Както показват нашите изследвания основните представители на *N. melanostomus* принадлежат на хаплотип 1. Вероятно това широко разпространение е в резултат на пренос на ларви чрез баластни води, освободени от търговски кораби, плаващи от Черно море до различни дестинации по света. В литературата са описани са три пътя на транспортиране на ларви на стронгил чрез баластни води: (1) от Черно море, през Средиземно море, (2) от Дунав през Рейн и Майн в Северно море (3) от Днепър през Припят, Буг и Висла във Балтийско море (Ricciardi & MacIsaac 2000; Grigorovich et al. 2003).

N. melanostomus инвазира нови местообитания чрез каналите, построени за нуждите на корабоплаването. По речните системи има множество водни пътища свързващи Дунав с Рейн и Мейн. Благодарение на това свързване и способността за живот в сладка вода, стронгилът се е разпространил в реките на Европа. От изследваните 74 ненативни популации на стронгил в реките Рейн, Мозел, Перл и Саар в Германия, данните за Сут b показват, че всички са от хаплотип H₁. Предполага се, че освен разпространението с баластни води, река Дунав е най-вероятния донор за неместните популации чрез миграция.

Установихме, че в района на Дуранкулак съжителстват три различни хаплотипа: H₁, H₂ и H₄. Тези различия в хаплотиповете може да се дължат на факта, че района е в относителна близост до устието на река Дунав и е зона с нитензивно корабоплаване.

В българските части на Черно море са открити пет други хаплотипа H₃ във Варна, Крапец, Бургас, H₅ - Златни пясъци, H₆ и H₇ Ахтопол и H₈ и H₉ Поморие.

H₃ включва представители освен от българското черноморско крайбрежие и такива от украинското и от Каспийско море. Съществуването на подобни взаимоотношения между Черно и Каспийско море след тяхното разделяне вероятно е станало по два пътя: чрез реките и корабоплаването (Т.Маринов, 1968).

Седемдесет и един процента от популациите на стронгил от Евразийските райони и в Големите Американски Езера принадлежат основно към H₁ (прил. 3 и фиг. 5). Предполагаме, че H₁ следва да се разглежда като изходен хаплотип, от който с времето и заемането на нови местообитания са се отдиференцирали останалите хаплотипове поради перманентното установяване на тези представителни нови местообитания без съществен генетичен обмен с останалите. Това е закрепило определени мутации, които са се утвърдили във времето. В българските части на Черно море, се наблюдават значителни разлики сред популациите на стронгила, които са свързани с географските характеристики на районите на местообитание (Tserkova et al., 2015).

1.6.1.2. ЗАКЛЮЧЕНИЯ

1) На базата на вариабилността на Сут b гена, установихме съществуването на 31 хаплотипа стронгил (*N. melanostomus*).

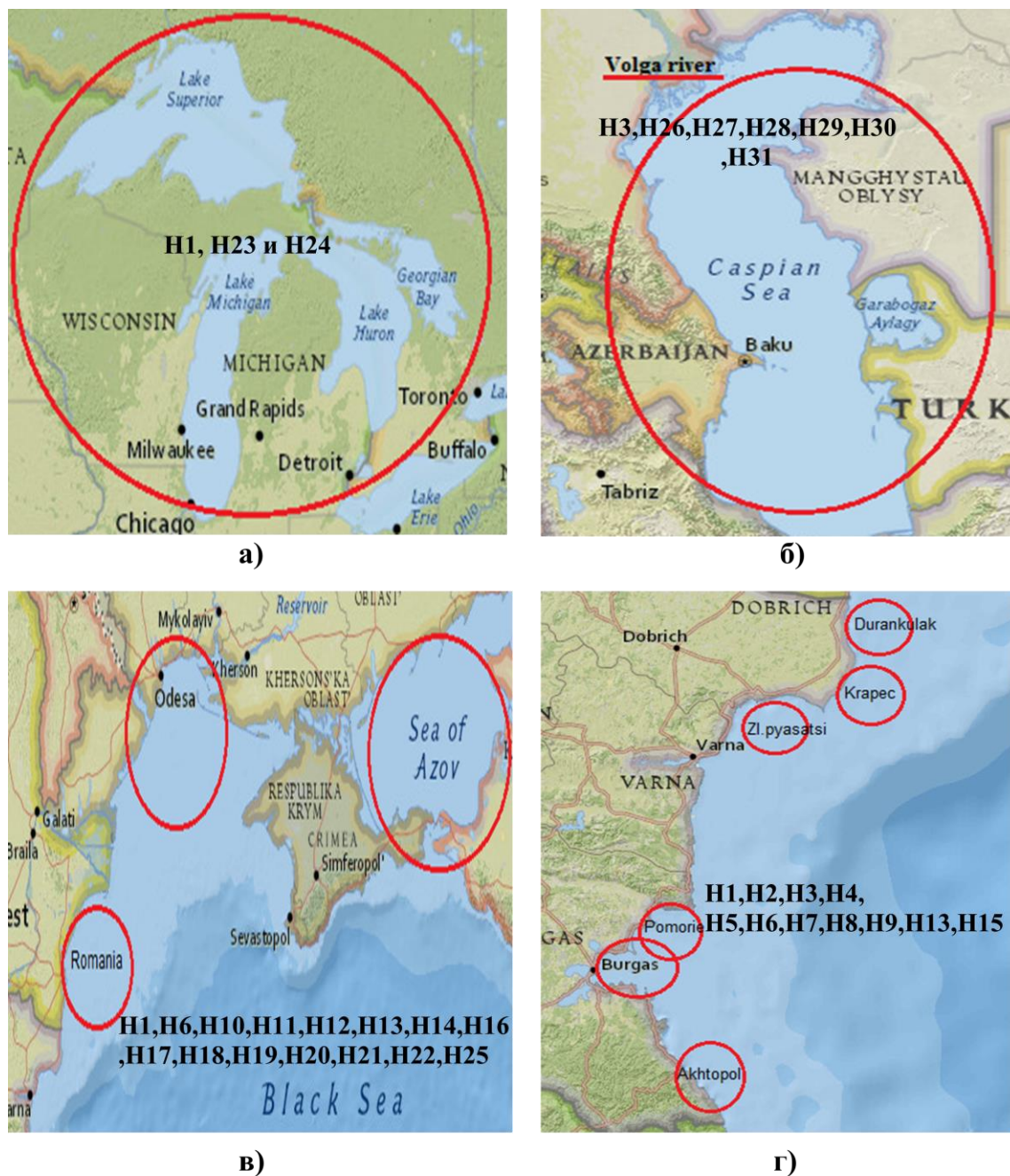
2) Само един хаплотип - **H1** е инвазивен и е разпространен в Евразия и Северна Америка и сред всички изследвани проби от Черно море, докато останалите са с лимитирано разпространение в локални популации.

3) Освен **H1** във водите на Българското черноморско крайбрежие открихме още осем хаплотипа:

3.1. В район Дуранкулак - **H2** и **H4**,

3.2. В района на Златни пясъци - **H5**,

- 3.3. В район Крапец и Бургас- **H3**,
 3.4. Край Ахтопол и Поморие- хаплотипи **H6, H7, H8 и H9**.
 4) В румънското крайбрежие се среща и **H10**.
 5) Екземпляри от северната част на Черно море (Украйна, Русия и Одеса) и прилежащите реки (Днепър, Буг, Кубан) както и Азовско море освен **H1** включват хаплотипи – **H11, H12, H13, H14, H17, H18, H19, H20, H21, H22 и H25**.
 6) Представителите на вида в Каспийско море и р. Волга вероятно са претърпели паралелна еволюция след отделянето на Черно от Каспийско море поради което **H1** не се среща там, а вместо това се откриват хаплотипи **H26, H27, H28, H29, H30 и H31**.
 7) В Големите езера (Северна Америка), освен повсеместния **H1**, са се диференцирали още два хаплотипа – **H23 и H24**



Фиг. 5. Разпространение по хаплотипове на *N. melanostomus*,
 а) Големите езера (Северна Америка), б) Каспийско море и р. Волга,
 в) район Румъния, Украйна и Азовско море и г) Българско черноморско крайбрежие

1.6.2. *Neogobius cephalargoides* (Pinchuk, 1976)

Анализирани бяха всички изолирани от нас 23 секвенции кодиращи Cyt b и бяха сравнени с 3^{-те} депозирани в NCBI от други автори чрез nblast алгоритъма на Altschul и сътр. (1997). Това ни позволи първо да потвърдим независимо от морфологичното определяне, че нашите проби принадлежат на *Neogobius cephalargoides*.

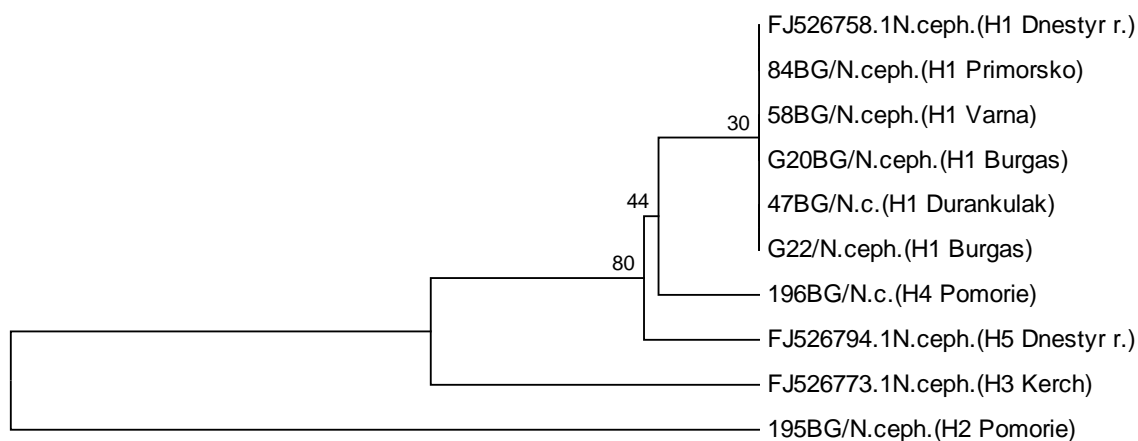
Анализът с програма DnaSP Ver. 5.10.01 (Libardo P. & Rozas J., 2009) ни позволи да определим честотата и позицията на нуклеотидните замествания както в нашите, така и в аотирани в NCBI последователности. Резултатите са показани в Таблица 5.

Таблица 5

Нуклеотидни субституции в цитохром б при различните хаплотипи на *N. cephalargoides*. Номера на позицията показва вариабилен сайт в дадения регион на гена, (.) – индикира идентична база с отбелязаната при H_1.

Хапл.	Позиции									
	1	2	2	3	3	3	3	3	3	5
	0	2	4	0	4	5	7	8	9	7
	2	5	6	1	9	8	8	8	3	0
Нар_1	C	G	G	G	G	G	G	G	T	T
Нар_2	T	.	.	A	A	A	A	T	.	A
Нар_3	.	A	A
Нар_4	A
Нар_5	C	.

Установихме пет хаплотипа. Регистрирахме 9 транзисии и 2 трансверсии (Таб. 5 и Фиг.6). Броят на хаплотипите за местообитание варираше между 100 % и 50 %. Най широко разпространеният хаплотип и тук означихме условно като H_1. Той обхваща 60 % от Cyt b гените сред изследваните секвенции. Разпространен е от устието на река Днестър до Приморско. Хаплотипове 2 и 4 включват по 10 % (всеки) от представителите на голямоглавото попче и са разпространени само в Поморие. Хаплотип 3 (10%) се среща в Керченския пролив, а хаплотип 5 (10%) в устието на р. Днестър (Фиг. 7).



Фиг. 6. Филогенетично дърво е построено чрез метода Maximum likelihood с филогенетичен тест bootstrapping (500 повторения).

Посредством програма MEGA 7 определихме вероятността за заместване на една от друга база. За простота, сборът от честотите на всички субституции е приравнена на 100%. Нивата на различните транзисии са показани с удебелен шрифт, а тези на трансверсионалните субституции - в италик. Честотите на срещане на отделните нуклеотиди в изследваните 10 нуклеотидни последователности са 25.61% (A), 31.75% (T/U), 27.58% (C), and 15.06% (G). Съотношенията между транзисии/трансверсии при пурины (k1) е 165.724, а при пиримидини

(k2) е 12.009. Общата тенденция в съотношението между транзиции/трансверсии е изчислена по формулата $R = [A * G * k1 + T * C * k2] / [(A + G) * (T + C)]$. В случая с *Neogobius cephalargoides* стойността на R=30.844 табл. 6 (Tamura, 2004).



Фиг. 7. Разпространение на различните хаплотипове на *N. cephalargoides*.

Таблица 6
Максимални съставни сходства, установени от модела на нуклеотидните субституции, *Neogobius cephalargoides*

	A	T	C	G
A	-	0.41	0.36	32.61
T	0.33	-	4.33	0.2
C	0.33	4.98	-	0.2
G	55.47	0.41	0.36	-

Изолираните секвенции бяха подложени на Tajima's Neutrality Test (Tajima D-тест). Стойността на D е -1.765154 (Таб.7).

Таблица 7
Резултатите от Tajima's Neutrality Test (Tajima F., 1989), *Neogobius cephalargoides*.

<i>m</i>	<i>S</i>	<i>p_s</i>	Θ	π	<i>D</i>
26	11	0.017544	0.006202	0.003757	-1.765154

1.6.2.1. Обсъждане

Голямоглавото попче се среща по западното и северозападното черноморско крайбрежие и северозападната част на Азовско море. В Черно море е съобщаван за българското, румънското и северното крайбрежие до западен Крим. Среща се също в Керченския пролив. През периода 1955 – 2000 год. е бил повсеместно разпространен пред българския бряг на Черно море и е бил обект на интензивен промишлен риболов. Това е довело

да свиване на ареала. След 2000 г. е наблюдаван единствено в района между Дуранкулак и н. Калиакра според Vassilev и съавтори (2012).

В нашите изследвания са включени и индивиди, уловени между 2013 и 2015 г., в райони от южното черноморие: Поморие, Бургас и Проморско, което показва, че *N. cephalargoides* отново разширява ареала си. Това предположение се потвърждава и от анализа на молекулярните данни като от изчислените стойности на R и D става видно, че популацията на голямоглавото попче разширява своя ареал. Стойностите на R по-високи от 4 показват значителен еволюционен натиск. Установените от нас стойности на R=30,844 е индикация, че представителите са подложени на сериозен селекционен натиск.

D тестът може да бъде полезен при откриването на процесикато подбор, произход и промяна в размера на популацията (Charlesworth et al., 1993). Установената стойност на D = -1.765154 доказва разселването на голямоглавото попче.

Съпоставяйки нашите данни, с тези публикувани от Vassilev и съавтори (2012) може да допуснем, че представителите на хаплотип 1 постепенно са се разселили през последните 15 години от района на Дуранкулак и нос Калиакра на юг към Варна, Бургас и Приморско. Възможно е широкото разпространение на хаплотип 1 да е свързано с корабния трафик.

Интересен е случаят с Поморие – там има два хаплотипа (H_2 и H_4), които не са регистрирани към момента другаде. Може да предположим, че там са оцелели представители, населявали този район от черноморското крайбрежие по времето, когато *N. cephalargoides* е бил повсеместно разпространен.

1.6.2.2. ЗАКЛЮЧЕНИЯ

- 1) На базата на вариабилността на Cyt b в гена, изследвани до момента, установихме представители на 5 хаплотипа голямоглавото попче (*N. cephalargoides*).
- 2) Най-разпространеният хаплотип - **H1** включва 60 % от всички изследвани екземпляри между устието на река Днестър и Приморско.
- 3) Хаплотипове 2 и 4 на голямоглавото попче, са разпространени само в Поморие.
- 4) Видът се наблюдава за пръв път през този век на юг от Дуранкулак и н. Калиакра.

1.6.3. Други представители на род *Neogobius*

Обект на молекулярно таксономични изследвания бяха още шест вида от род *Neogobius*. Поради факата, че от тях разполагахме с единични екземпляри стеснихме изследванията с тях до доказване на видовата им принадлежност.

От вида *Neogobius eurycephalus* първоначално считахме, че сме уловили 17 екземпляра на базата на морфологичните белези. Молекулярно таксономичните анализи обаче показаха, че 15 от тях принадлежат към вида *N. cephalargoides*. Изолираните от останалите два екземпляра секвенции на Cyt b дадоха съвпадение в базата данни на NCBI за *Neogobius eurycephalus*. Това потвърждава видовата принадлежност на уловените индивиди. За съжаление единия е край Сарафово, гр. Бургас, а другия край Persambe, Турция (Прил. 1). При наличие на по един екземпляр от локация не е възможно да се правят изводи за популационната структура и еволюционните тенденции при вида.

Уловен е един екземпляр на *Neogobius fluviatilis* (Речно попче) в района на река Боламан (Турция). Видовата принадлежност на уловения екземпляр е потвърдена както с морфологични белези, така и при съпоставка на изолираната от него секвенция на Cyt b с наличните в NCBI секвенции на Cyt b за вида. По посочената в предишния параграф причина не сме правили по-подробни филогенетични анализи.

В районът на далян Зеленка е уловен 1 екземпляр от вида *Neogobius gymnotrachelus*. Изолираната от него секвенция на Cyt b потвърждава видовата принадлежност.

Чрез електрофишер в районът на река Боламан (Турция) е уловен единичен екземпляр от вида *Neogobius syrman*. Видът потвърден независимо по морфологични белези от специалистите ихтиолози гр. Trabzon, Турция, а след изолиране на Cyt b видовата принадлежност на индивида е потвърдена и по молекулярни данни.

Според морфологичните белези и определителни таблици първоначално считахме, че сме уловили пет екземпляра от вида *Neogobius retan*. Молекулярно таксономичните анализи

базирани на секвенциите на Сут b, обаче показаха, че само един екземпляр от тях наистина е *Neogobius retan*. Внимателният повторен морфологичен анализ показа, че при останалите 4 екземпляра, морфологичните белези не се припокриват с никой от видовете в достъпните ни определителни таблици, а показаха междинни морфологични признаци между *N. retan* (Kessler, 1874) и *N. syrman* (Nordmann, 1840) (фиг. 8 А, В, С). Трябва да отбележим, че четирите екземпляра са хванати от един район, а именно с. Лозенец.



Фиг. 8 А. *Neogobius retan* (Kessler, 1874) (Vassilev et al., 2012)



Фиг. 8 В. *Neogobius syrman* (Nordmann, 1840)

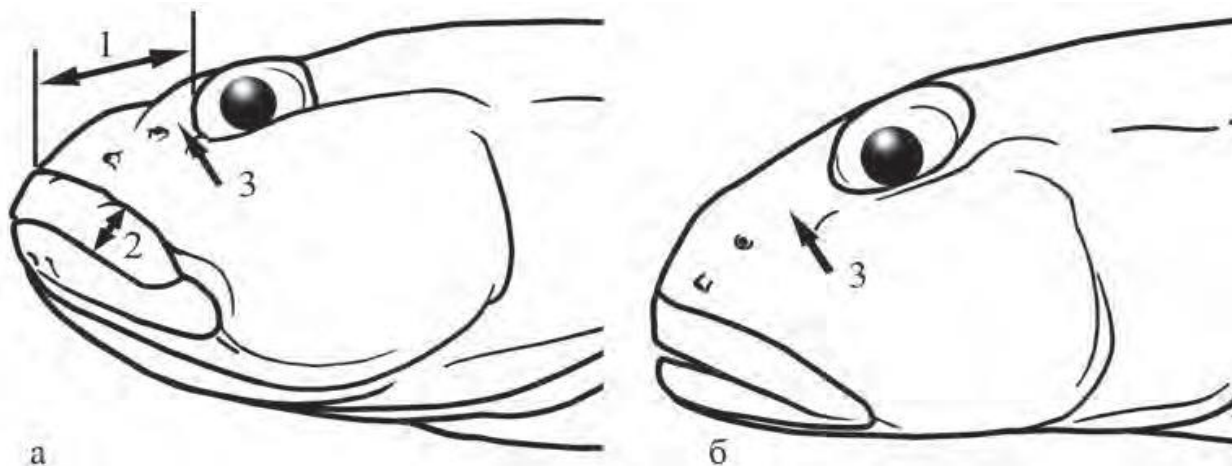
(<http://www.tankonyvtar.hu/hu/tartalom/tkt/magyarorszag-halfaunaja/ch05s89.html>)



Фиг. 8 С. *Neogobius spp* уловен край с. Лозенец (авторска снимка)

Първоначалните анализи на изолираните от нас последователности кодиращи Сут b позволиха да потвърдим доброто им качество. Изолираните секвенции бяха сравнени с аотираните такива в NCBI. Получените резултати от алгоритъма nblas (Altschul et al., 1997) показаха най-близко съответствие (90% при e-value $2e^{-82}$) на изолираните от нас секвенции с тези на *Neogobius caspius* (Eichwald, 1831) (Фиг. 10).

Според определителната таблица за вида *Neogobius caspius* обаче дължината на муцуната трябва да е повече от 5 пъти по-голяма от ширината на устните (признаци 1 и 2 на Фиг. 16 а), а задната ноздрата да е отдалечена от ръба на очните орбитали на повече от половината диаметър на окоето (признак 3 на Фиг. 9 б).



Фиг. 9. *Neogobius caspius* (Eichwald, 1831), (Богущкая и сътрудници, 2013)

Подобни морфологични признаци не са установени в уловените от нас попчета от района на с. Лозенец. Освен това до момента няма съобщения от други автори за екземпляри *Neogobius caspius* уловени в Черно море. За определяне на принадлежността на изследваните екземпляри, сравнихме изолираните от тях секвенции на Сут b с такива от други видове от родове *Neogobius*, *Gobius* и *Mesogobius*. Резултатите са представени на фигура 10.

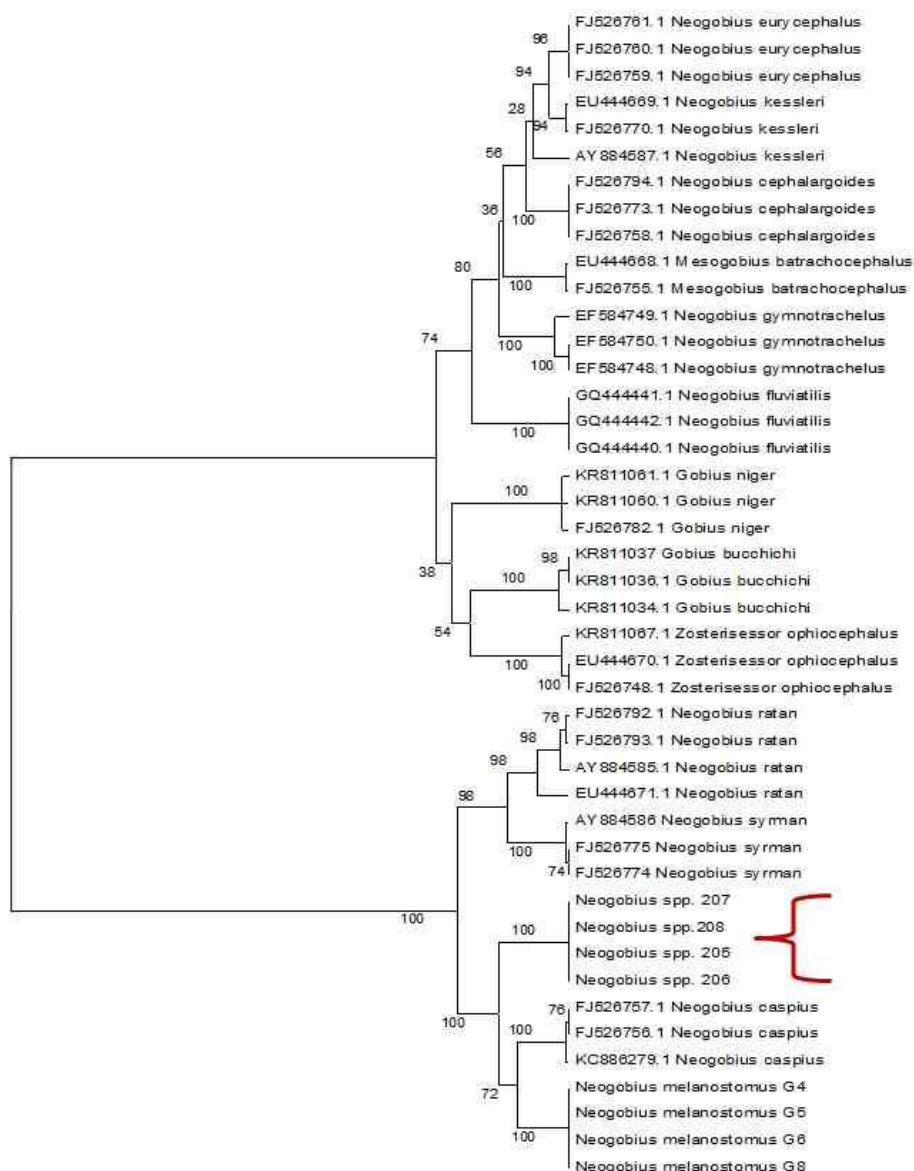
1.6.3.1. Обсъждане

Каспийското попче е ендемичен вид за Каспийско море, където обитава бракични води. До момента няма данни този вид да обитава Черно море (Vassilev et al., 2012).

Както се вижда от фигура 10, изследваните от нас екземпляри, означени като *Neogobius* spp. обозначени чрез поредния им номер на уловена проба 205, 206, 207 и 208 се групират във филограмата заедно с видовете *N. retan*, *N. syrman*, *N. melanostomus* и *N. caspius*. Секвенциите на Сут b от видовете *N. retan* и *N. syrman* обаче се групират в отделна подгрупа. Същото важи и за секвенциите на *N. melanostomus* и *N. caspius*. Изследваните от нас екземпляри остават извън тези два кластера и формират самостоятелен кластер във филограмата. Това от една страна категорично потвърждава, че нашите екземпляри принадлежат към род *Neogobius* и са в близкородствени отношения със споменатите по-горе 4 вида, но от друга показва, че не принадлежат към никой от тях. Предполагаме, че и в този случай става дума за вид от род *Neogobius*, който обитава Черно море, но все още не е изследван.

Редица от по-редките черноморски видове попчета не са изследвани чрез молекулни макери и за тях няма секвенции на Сут b аотирани в NCBI. В голяма степен това важи и за уловените представители на останалите пет вида на род *Neogobius*. Наистина в NCBI присъстват няколко десетки секвенции на Сут b от тези видове вида, но те също са уловени от различни локации като единични екземпляри. Тук също проличава сериозния проблем с означаване на всеки екземпляр като отделен хаплопит. Подробното разглеждане на секвенциите показва, че например хаплотипове А, Н и G на вида *Neogobius gymnotrachelus* посочени от авторите на изследването като различни всъщност се различават само по местообитание, а не по секвенция. Поради факта, че разполагаме само с един екземпляр от локаци/вид не сме се опитвали да ревизираме това разделяне.

В бъдеще, при наличие на достатъчно финансиране е необходимо изследванията описани в тази дисертация да продължат, като бъдат насочени към залавянето чрез не летални методи на редките представители на род *Neogobius*, изолиране и аотирание на секвенциите на Сут b с достатъчна статистическа повтаряемост по местолокации.



Фиг. 10. Филогенетично дърво построено със анотирани в NCBI секвенции на родове *Neogobius*, *Gobius* и *Mesogobius* чрез програмата MEGA 7 по метода Maximum likelihood с филогенетичен тест bootstrapping (500 повторения).

1.6.3.2. ЗАКЛЮЧЕНИЯ

1. Изолирани са успешно висококачествени секвенции на гена кодиращ *Cyt b* от шест вида от род *Neogobius*, принадлежащи към черноморската ихтиофауна.
2. Необходими са нови задълбочени изследвания с помощта на митохондриални и ядрени гени за да се определи с модерни методи видовата принадлежност и вътрепопулационната структура на уловените видове.
3. Необходимо е да се уловят чрез не летални методи на статистически достоверни бройки от редките представители на род *Neogobius* за да ревизира хаотичното поделяне на анотираните секвенции по хаплотипове, което не е базирано на изменчивостта на генните секвенции.

1.6.4. *Mesogobius betrachocephalus* (Pallas 1814)

Изолирахме секвенции от гена кодиращ Cyt b от 24 уловени от нас екземпляри. При анализите допълнителни са използвани и 5 секвенции на същия ген, изолирани от *M. betrachocephalus* от други автори, депозирани в NCBI.

Както при другите изследвани видове първоначално използвахме сравнение с nblast, за да потвърдим по независим от морфологичните определителни признаци начин принадлежността на изследваните от нас проби към вида *M. betrachocephalus*.

Анализът с програма DnaSP Ver. 5.10.01 позволи да определим честотата и позицията на нуклеотидните замествания както в нашите, така и в аотирани в NCBI последователности. Най-широко разпространеният хаплотип в този случай е посочен като хаплотип 1 (H₁). Резултатите са показани в Таблица 8.

Таблица 8

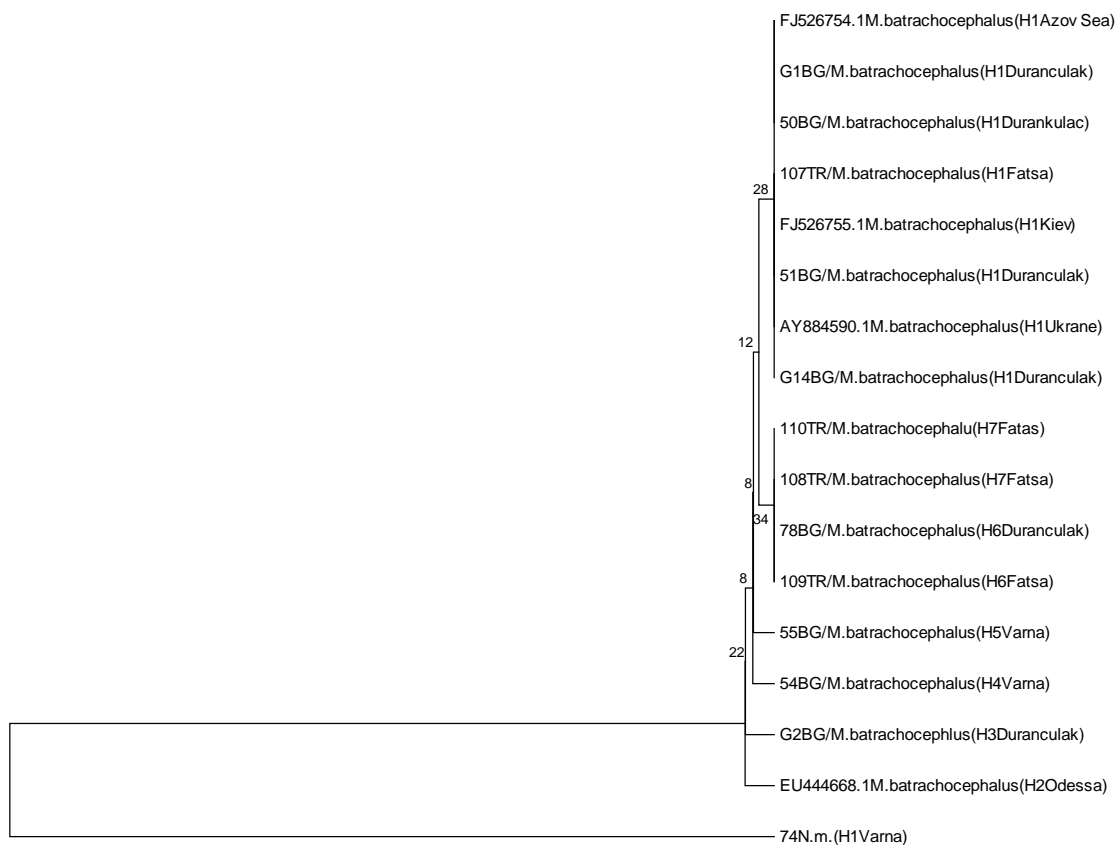
Нуклеотидни субституции в гена кодиращ цитохром б, при хаплотипи на *M. betrachocephalus*. Номера на позицията показва вариабелен сайт в дадения регион на гена, (.) – индикира идентична база с отбелязаната при H₁.

Хапл.	Позиции						
	9	1	1	1	2	2	3
	3	1	6	9	4	7	0
		4	5	8	6	9	6
Нап_1	G	C	T	A	T	T	C
Нап_2	A	.	.	.	C	.	.
Нап_3	.	.	C	.	C	.	.
Нап_4	.	.	.	G	.	.	.
Нап_5	.	T	T
Нап_6	C	.	.
Нап_7	C	C	.

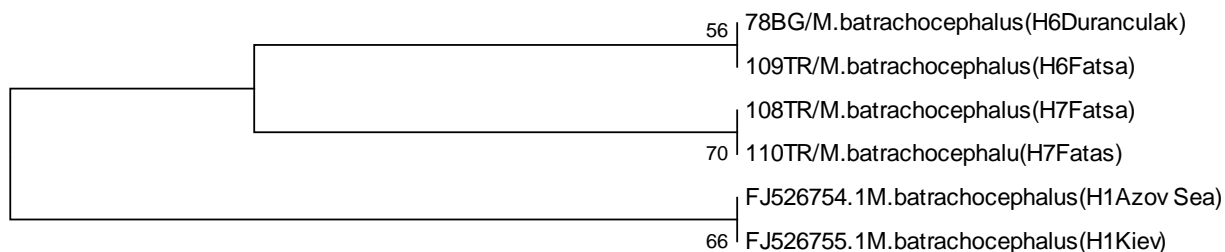
Установихме общо седем хаплотипа. Регистрирахме 10 транзиции и 0 трансверсии (Таблица 8).

Филогенетичните връзки между отделните хаплотипове са представени на фиг. 16. В NCBI няма данни за секвенции на друг вид от род *Mesogobius*, освен за *M. betrachocephalus*. За постигане на по-добро групиране към анализираниите секвенции добавихме една от *N. melanostomus*. Филограмата ясно показва групирането по хаплотипове (Фиг.11), независимо от географската локация. Единствено хаплотипове 6 и 7 в общата филограма се групират заедно, но при изграждане на производно филогенетично дърво съставено от H₆, H₇ и за съпоставка H₁ ясно се вижда (Фиг. 12), че двата хаплотипа се разграничават. Причината за близкото им разположение на общата филограма е, че разликата между тях е само в един нуклеотид на позиция 279: Т при H₆ е заменен от С при H₇.

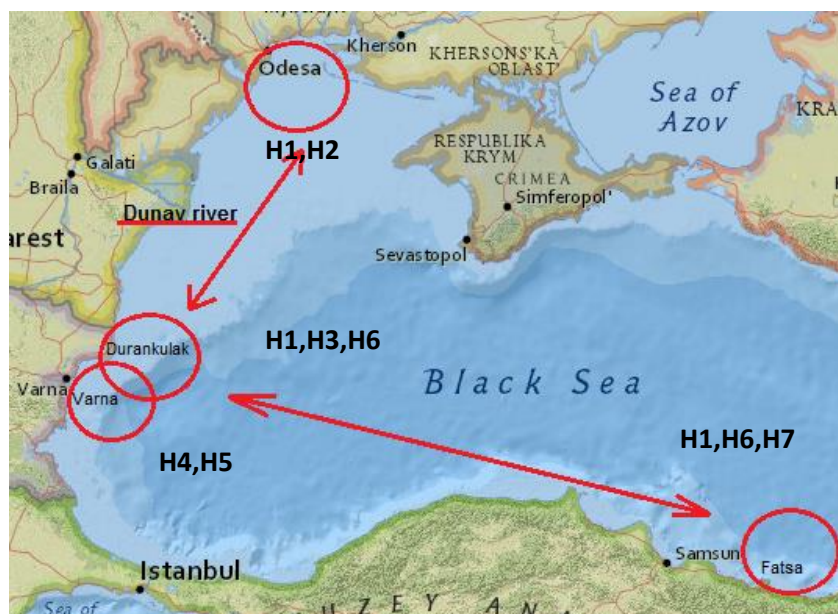
Броят на хаплотиповете за локация варираше между 50 % до 6.25 %. Хаплотип H₁, който включва 50 % от всички екземпляри и е разпространен от устието на р. Днепър, (Украина), по българско черноморско крайбрежие до Фатса (Турция). H₂ обитава единствено района на Одеса, където съжителства с H₁. Подобно е положението в крайбрежните води при Дуранкулак, където преобладава H₁, но се срещат също H₃ и H₆. Хаплотипове H₄ и H₅ са открити във Варненското езеро и вероятно са ендемични за района. Хаплотип 6 се среща освен района на Дуранкулак (българското черноморско крайбрежие) и при Фатса (турско черноморско крайбрежие), а последният хаплотип H₇ обитава само района на Фатса (турско черноморско крайбрежие) (Фиг. 13).



Фиг. 11. Филогенетично дърво построено от анализираниите чрез програмата MEGA 7 по метода Maximum likelihood секвенции на Cyt b. Като филогенетичен тест е ползван bootstrapping (500 повторения).



Фиг.12. Производно филогенетично дърво построено от секвенциите на Cyt b при H_1, H_6 и H_7. Като филогенетичен тест е ползван bootstrapping (500 повторения).



Фиг. 13 Разпространение различните хаплотипове на *Mesogobius betrachocephalus* в Черно море

Честотите на срещане на отделните нуклеотиди във всички изследвани секвенции са: 25.30% (A), 30.62% (T/U), 27.26% (C) и 16.82% (G). Вероятността за заместване на една от друга база (R) беше определена с MEGA7 и е 2.719 (табл. 9).

Таблица 9

Максимални съставни сходства, установени от модела на нуклеотидните субституции при *M. betrachocephalus*.

	A	T	C	G
A	-	4.3	3.83	9.78
T	3.55	-	22.33	2.36
C	3.55	25.08	-	2.36
G	14.72	4.3	3.83	-

Изолираните секвенции бяха подложени на Tajima D-тест. Изчислените стойности (табл.10) на $D = -3.279728$.

Таблица 10

Резултатите от D- теста при *M. betrachocephalus*.

m	S	p_s	θ	π	D
29	50	0.043821	0.013206	0.002980	-3.279728

1.6.4.1. Обсъждане

Лихнусът (*M. betrachocephalus*) е разпространен в Черно, Каспийско и Азовско морета, като се среща и в района на Босфора. По българското крайбрежие е разпространен повсеместно, обикновено на по-големи дълбочини. D тестът на Tajima показва стойности под 0, което сочи, че популациите на вида разширяват ареалите си. Нивата на нуклеотидни субституции (R) обаче са под 4, което означава, че вида не е под голям селективен натиск и вероятно по-голямата част от представителите му живеят в относително стабилна среда.

Според Neilson и Stepien (2009) това е характерно за морските видове попчета от родове *Mesogobius* и *Benthophilus*, които рядко навлизат в сладководните басейни.

Известно е, че попчетата използват три пътя на разселване (Ricciardi & MacIsaac 2000; Grigorovich et al. 2003). Тук вероятно важна роля играе разпространението им като ларви, чрез баластните води на морския транспорт. Както е видно от фиг. 18 и разпространението на хаплотипове като Н_1 и Н_6, вероятно търговските кораби пренасят лихнуса между Турция, България и Украйна. За останалите хаплотипове можем да предположим, че са местни за съответните райони.

Особено внимание тук обръщаме на българските образци от районана Варненското езеро - два локални хаплотипа Н_4 и Н_5, които обитават бракични води. Това потвърждава наблюденията и на други автори (Vassilev et al., 2012), което показва, че лихнуса има потенциал за колонизиране на води с понижена соленост. Това се потвърждава и от факта, че макар и рядко екземпляри лихнус са улавяни и в устията на Черноморски реки, дори на известно разстояние от морето в долните им течения. Според Калинина (1976), лихнусът може да навлиза в устията на реките и да обитава лимани.

Установяването и разработването на диагностични молекулярни маркери за сравняване на секвенции от различни местообитания ни позволяват да идентифицираме видове като *M. betrachcephalus* в случай на бъдещи и / или неоткрити инвазии и да се очертаят техните филогенетични връзки.

1.6.4.2. ЗАКЛЮЧЕНИЯ

1) На базата на вариабилността в секвенциите на Cyt в гена, изследвани до момента, установихме, че *M. betrachcephalus* е представен от 7 хаплотипа.

2) Най-широко разпространен е хаплотип –**Н1**, като **Н6** също показва тенденции на разширяване на ареала. Останалите хаплотипове формират локални популации с ограничено разпространение.

3) Хаплотипове, като **Н4** и **Н5** от района на Варненското езеро показват способност да обитават води с понижена соленост и в бъдеще могат да се превърнат в инвазивни, по подобие на хаплотип 1 на *Neogobius melanostomus*.

2. Изследване на попчета мигрирали от Средиземно море

2.1. Анализирани екземпляри

За изследването са секвенирани 33 секвенции от *Gobius niger* заловени в различни местообитания – Варненски залив, Златни пясъци, далян Зеленка, Турция (Фатса и Трабзон) и Румъния. Допълнително в изследванията са включени пет секвенции аотирани в NCBI от други автори (FJ526782, KR811061, KR811060, KF415583, AY884591). Тъй като е критично застрашен според Червената книга на Черно море от вида *Zosterisessor (/Gobius) ophiocephalus* бяха уловени само 2 индивида, но данните бяха комбинирани при обработката със секвенции аотирани в NCBI от други автори (FJ526748, FJ526747, EU444670, AY884592, KR811067 и KF415684). Изследвани са също така единични уловени екземпляри от видовете *Aphyu (/Gobius) minuta*, *Gobius cobitus* и *Gobius paganellus*.

Събраните от нас проби бяха съхранявани в 96 % етанол до обработката им.

Първоначално видовата принадлежност на пробите *Gobius* беше определяна по определителни таблици на база на морфологични признаци (Vassilev et al., 2012). За да потвърдим видовата принадлежност по независим начин използвахме pblastалгоритъма на Altschul и сътр. (1997) достъпен в NCBI. Чрез него сравнявахме изолираните от нас секвенции на Cyt b гена, с тази аотирани за вида в NCBI. Всички изолирани секвенции съвпадат в тези, аотирани за *Gobius*.

Филогенетичните и молекулярно еволюционни анализи, бяха проведени, като бе използван MEGA 7 софтуер (Kumar et al., 2016). Броят на хаплотипите, хаплоидното многообразие и нуклеотидно такова, бяха изчислени със DNA SP 5.10.01 софтуер. Същата програма бе използвана за конструиране на хаплотипна мрежа.

2.2. Изолиране на ДНК-а

Общата ДНК, подобно на тези от родове *Neogobius* и *Mesogobius* беше изолирана с кит на Qiagen (вж. Материали и методи). Количеството на изолираната ДНК се определя чрез нейната абсорбция при 260 nm и качеството се контролира чрез електрофореза в 0,8% агарозен гел. Резултатите показаха, че изолираната ДНК е с добро качество и чиста от замърсявания.

2.3. Дизайн на праймери за изолиране на Cyt b на род GOBIUS

За по-голяма универсалност при изготвянето на праймерите за изолиране чрез PCR ползвахме комбинации от всички известни секвенции на гена на Cyt b в род *Gobius*. Това беше направено за да ни позволи да ползваме едни и същи праймерни комбинации при изолирането на Cyt b от различни видове.

Получената, в резултат на алайгмента, консенсусна секвенция беше прехвърлена в on-line програмата PRIMER 3 Plus за изготвяне на дегенеративни праймери. Праймерите са представени в Таблица 11.

Таблица 11

Списък на праймерите използвани за изолиране на секвенциите кодиращи Cyt b

Име	секвенция 5'-3'	Tm
Gobi Cyt b Fw 1	5'- CMCTVCTTAAAETYGCAAACCA-3'	57,6
Gobi Cyt b Fw 2	5'-GCCCCCTCTAACETTTCTGC-3'	56
Gobi Cyt b Rev1	5' –AGGGCRAGBACTCCCKCCWAGTTT-3'	59,7
Gobi Cyt b Rev2	5'- GCAAANAGNAAGTAYCACTCTGG – 3'	56,5

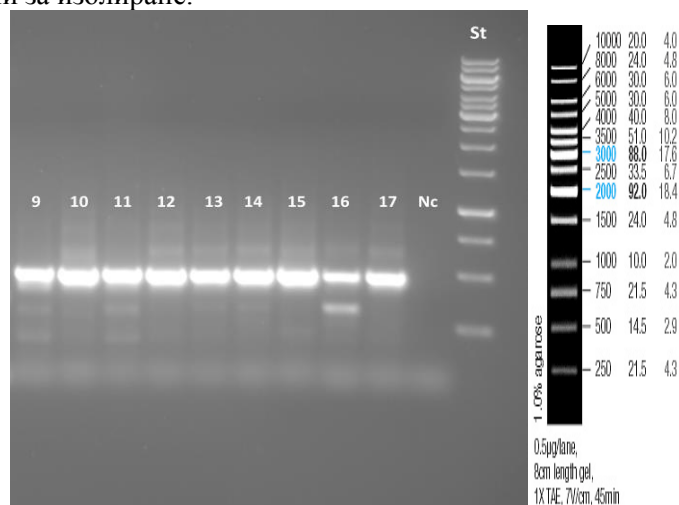
За секвениране на изолираните секвенции използвахме ген-специфични праймери.

2.4. Изолиране на Cyt b региона посредством PCR

За PCR реакциите бяха тествани всички 4 комбинации от прави и обратни праймери: Gobi Fw1, Gobi Fw2, Gobi Rev1 и Gobi Rev2. Комбинацията от външните праймери Gobi Fw1 и Gobi Rev1 дадоха достатъчен по количество продукт с очаквания размер и понеже обхващат по-дълъг район от гена бяха използвани за изолирането му.

PCR реакциите са провеждани при условията посочени в раздел „Материали и Методи”, като във всяка проба са смесвани 1 µl геномна ДНК, по 1 µl от праймерите; 12,5 µl PCR master mix и 9,5 µl ddH₂O.

PCR продуктите бяха разделени посредством гел електрофореза, на 1 % агарозен гел при волтаж 150 V (фиг. 14). Във всяко гнездо беше прибавено 25 µl от Cytb продуктите и 3 µl Loading dye(6x). Използва се и ДНК маркер 1kb - 6 µl. Получените продукти са визуализирани с UV светлина и изрязани за изолиране.



Фиг. 14. PCR амплификация на Cyt b фрагменти, разделени на 1,5% агарозен гел.

Получените в резултат на PCR реакцията продукти са изрязани от гела с чист скалпел. Пречистването им е извършено посредством QIAquick Gel Extraction Kit следвайки оригиналния протокол на Qiagen. Изолираните и пречистените по описания в „Материали и Методи” начин PCR продукти бяха секвенирани двустранно в GETC Ltd. Германия. За секвениране са използвани ген специфичните праймери.

2.5. Анализ на резултатите

2.5.1. *Gobius niger* (Linn.)

Секвенциите от Cyt b бяха успешно изолирани от всички 33 проби *Gobius niger*, уловени от различни местообитания в Румъния, България и Турция (приложение 1).

Първоначално извършихме съпоставка чрез алгоритъма nblast между изолираните от нас секвенции и тези аотираните в NCBI (**FJ526782**, **KR811061**, **KR811060**, **KF415583**, **AU884591**). Това позволи независимо потвърждаване на видовата принадлежност на нашите проби, които преди това бяха определени като *G. niger* по морфологични признаци.

Посредством програмата DNA SP 5.10.01 определихме честотата и позициите на нуклеотидните субституции в изолираните от нас и аотираните в NCBI секвенции. Резултатите са отразени в табл. 12.

Установихме, че като цяло сред наличните секвенции се срещат 8 хаплотипа. Тъй като вида се отнася към средиземноморските мигранти с по-малки номера означихме хаплотипите от Средиземно море. От тях към хаплотип H_6 принадлежат 68 % от индивидите обитаващи Черно море, като можем да видим от фиг. 14. В района на северното крайбрежие на българския бряг на Черно море открихме още един хаплотип - H_7. В района на Трабзон (Турция) са уловени индивиди принадлежащи към локален хаплотип 8. Сред останалите секвенции, които са изследвани, установихме наличие на H_1 в залива на Ялта, докато H_2, H_3, H_4 и H_5 са представени само в Средиземно море.

Таблица 12

Нуклеотидни субституции в Cyt b при хаплотипове на *G. niger*. Номерът на позицията показва вариабилен сайт в дадения регион, а (.) –база идентична с H_1.

Хапл.	Позиции												
	5 9	6 1	6 2	9 1	1 2 4	1 2 7	1 5 1	1 5 4	1 6 3	1 6 5	2 5 9	2 6 8	3 0 1
Нар_1	T	A	G	C	A	C	G	A	T	C	T	G	G
Нар_2	.	G	T	C
Нар_3	.	.	T	.	G	A
Нар_4	.	.	T	.	.	.	A	G	C	.	.	A	.
Нар_5	C	.	T	G	G	T	C	.	.
Нар_6	.	.	T
Нар_7	.	.	T	.	.	.	A
Нар_8	.	.	T	.	.	T

Посредством програма MEGA 7 определихме вероятността за заместване на една от друга база. За улеснения сборът от честотите на всички субституции е приравнена на 100%. Честотите на нуклеотидни субституции бяха изчислени с помощта на модела Tamura - Nei и са отразени в Таблица 13. Всеки елемент показва вероятността на заместване на едни с други бази (Tamura, 2004).

Нивата на различните субституции са показани с удебелен шрифт за транзиции, а тези на трансверсиите в италик. Нуклеотидни честоти са 20.15% (A), 27.99% (T/U), 18.51% (C) и 33.35% (G). Нивата на транзиционните/трансверсионните замени са $k1 = 14.872$ (пурины) и $k2 = 4.945$ (пиримидини). Общата тенденция в съотношението между транзиции/трансверсии е $R = 4.286$.

Таблица 13

Максимални съставни сходства, установени от модела на нуклеотидните субституции (Tamura et al 2004, Kumar et al. 2016) при *G. niger*.

	A	T	C	G
A	-	2.6	3.09	25.53
T	1.87	-	15.29	1.72
C	1.87	12.84	-	1.72
G	27.79	2.6	3.09	-



Фиг. 15 Разпространение по хаплотипове на *G. niger*

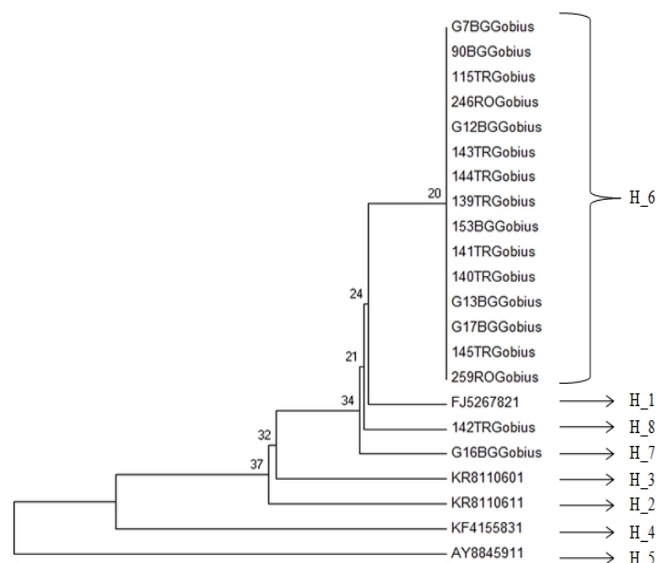
Филограмата построена на базата на анализираниите секвенции ясно показва групирането по хаплотипове, независимо от географската локация (Фиг. 16).

Изолираните секвенции бяха подложени на Tajima D-тест. Изчислените стойности (табл. 14) на $D = -2.123065$.

Таблица 14

Резултати от D-теста при *G. niger*.

m	S	p_s	θ	π	D
38	13	0.042904	0.011770	0.004715	-2.123065



Фиг. 16. Филогенетичното дърво е построено чрез програма MEGA 7 на базата на анализирани секвенции на гена за *Cyt b* от *G. niger*. Използван е алгоритъмът Maximul likelihood. Филогенетичният тест е по метода Bootstrapping (с 500 повторения).

2.5.1.1. Обсъждане

Според различни автори *G. niger* е мигрирал от Средиземно море. Ареалът на черното попче включва източния Атлантик от Скандинавския полуостров до северозападна Африка (Мавритания), Балтийско море, Средиземно, Егейско, Адриатическо, Мраморно Море и Суецкия Канал. След навлизането му в Черно море, видът се е разпространил по цялото крайбрежие. По Българското Черноморие е един от масовите видове попчета и се среща навсякъде, *G. niger* обитава устия на реки, лагуни и крайбрежни участъци от морето на дълбочина до 50-75м. Предпочита пясъчно или тинесто дъно сред черупки на мекотели и подводна растителност (Vassilev et al., 2012).

Направеният анализ на наличните секвенции показва, че процентът на застъпеност на хаплотиповете за локация варира между 4.55% до 68.15%.

D – тест анализът на нуклеотидните секвенции на *Cyt b* ни даде стойности за $D = -2.123065$ (Таблица 14). Това свидетелства, че някогашните средиземноморски мигранти от вида *G. niger* са се адаптирали добре към условията в Черно море и популациите им са в етап на разширяване на местообитанията си (Tajima, 1989). Съпоставянето на секвенциите взети от NCBI за средиземноморските *G. niger* с нашите данните сочат, че популациите са смесени, като черноморската е сравнително млада в еволюционното си развитие.

Стойността на R, надвишаващи 4 са показател, че черноморските популации на *G. niger* са подложени на продължаващ еволюционен натиск с преобладаващи транзиционни мутации според Zvelebil и колеktiv (2008) и Tamura (2013).

2.5.1.2. ЗАКЛЮЧЕНИЯ

- 1) На базата на вариабилността в секвенциите на *Cyt b* гена установихме 8 хаплотипа на черно попче (*G. niger*), от които само четири са се установили в Черно море.
- 2) Голяма част от индивидите, обитаващи Черно море са от хаплотип 6, което ни дава основание да считаме, че това е първичният хаплотип, мигрирал от Средиземно в Черно море.
- 3) Според анализите на секвенциите, *G. niger* са в етап на разширение и заемане на нови ниши, поради което са подложени на еволюционен натиск с преобладаващи транзиционни мутации. В резултат, някои от представителите на *G. niger* вече са

формирали локални популации в Черно море представени от хаплотипове **H7** в района на н. Калиакра, **H8** в района на Трабзон – Турция и **H1** в Ялтенския залив.

2.5.2. *Gobius (Zosterisessor) ophiocephalus*

Тъй като е критично застрашен вид (Червената книга на България) от *Gobius (Zosterisessor) ophiocephalus* бяха уловени само 2 индивида. В NCBI също има анотирани от други автори секвенции от този регион. По тази причина данните бяха комбинирани за обработката със секвенциите анотирани в NCBI (FJ526748, FJ526747, EU444670, AY884592, KR811067 и KF415684).

Посредством програмата DNA SP 5.10.01определихме честотата и позиците на нуклеотидните субституции в нашите и анотираните в NCBI секвенции. Резултатите са отразени в табл. 15.

Таблица 15

Нуклеотидни субституции в различните цитохром б хаплотипи, при *Gobius ophiocephalus*. Номера на позицията показва вариабилен сайт в дадения регион, а (.) идентична база с тази на H_1.

Хапл.	Позиции			
	1	2	3	3
	0	0	5	6
5	4	4	9	
H_1	G	T	A	A
H_2	A	C	C	G
H_3	G	T	C	A

Както се вижда от таблица 15 *G. ophiocephalus* е представен според наличните секвенции от 3 хаплотипа, като H_1 и H_2 са широко разпространени в Средиземно море, но не обитават Черно море, в което всички уловени от нас и анотирани в NCBI от други автори секвенции принадлежат на H_3. Представителите на H_3 са регистрирани в черноморските зони на България, Русия и Украйна (Фиг. 17). Броят на нуклеотидните замествания в анализираниите секвенции на Сут b при *Z. ophiocephalus* е незначителен. Срещат се 3 транзиции и 1 трансверсия (Таблица 15).

Анализите на получените секвенции с програмата MEGA 7 показаха вероятността на заместване на една от друга база са представени в таблица 16 (Tamura, 2004). Нуклеотидните честоти са 19,71% (A), 32,71% (T /U), 28,18% (C) и 19,40% (G). Нивата на транзиционните/трансверсионните отклонения са $k1 = 20.985$ (пурины) и $k2 = 4.317$ (пиримидини). Общото съотношение е $R = 5.041$.

Таблица 16

Максимални съставни сходства, установени от модела на нуклеотидните субституции при *G.ophiocephalus*.

	A	T	C	G
A	-	2.55	2.2	31.71
T	1.54	-	9.48	1.51
C	1.54	11	-	1.51
G	32.22	2.55	2.2	-

D-теста на Тајіта е представен на таблица 17.

Таблица 17

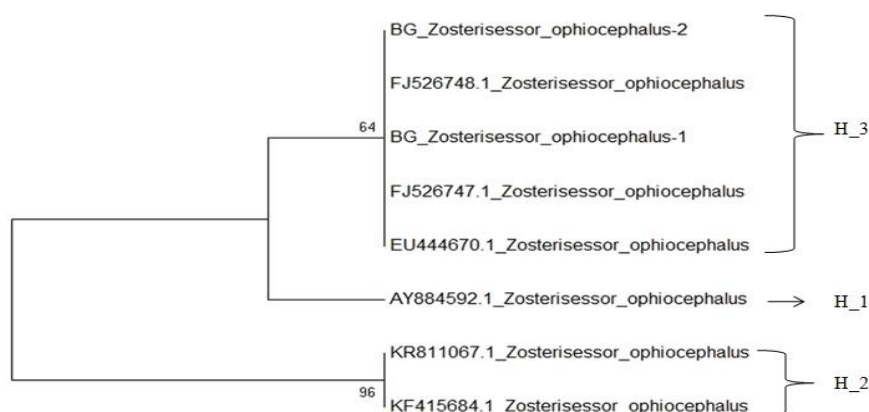
Резултатите от D- теста на *G. ophiocephalus*.

<i>m</i>	<i>S</i>	<i>p_s</i>	Θ	π	<i>D</i>
8	4	0.010929	0.004461	0.004684	0.239023



25

Фиг. 17. Разпространение по хаплотипове на *Z. ophiocephalus*.



Фиг. 18. Филогенетично дърво построено на базата анализираниите секвенции от *Z. ophiocephalus* с помощта на програма MEGA 7. Дървото е построено с помощта на алгоритъм Maximum likelihood при използване на филогенетичен тест bootstrapping (500 повторения).

2.5.2.1. Обсъждане

Тревното попче (*Zosterisessor ophiocephalus* Pallas) е средиземноморски мигрант, чието разпространение включва Средиземно море и прилежащите части на Атлантическия океан до Канарските острови и Мраморно море. След навлизането му през Босфора се е разпространило в Черно и Азовско море. В Черно море се среща около и във водораслови обраствания, особено от *Zostera spp.* предимно в крайбрежната зона, но също навлиза в лагуни и устия на реки. По Българското крайбрежие тревното попче е било един от масовите видове в миналото. Поради интензивния улов и загуба на местообитания по-астоящем се среща значително по-рядко и е обявено за застрашен вид (Vassilev et al., 2012).

Филогенетичните анализи на наличните секвенции на Cyt b при *Z. ophiocephalus*, отразени на фиг. 18, показват че H₃ се среща по българското крайбрежие и в крайбрежните зони на Русия и Украйна. D тестът на Тајима (1989) показва стойностна $D = +0.23902$. Според Тајима (1989) това е доказателство, че популациите на *Z. ophiocephalus* свиват своя ареал на разпространение. Това заключение е в съгласие с Vassilev и съавтори (2012), според които

тревното попче по българското крайбрежие е бил един от масовите видове в миналото. Прекаленият улов на вида през миналия век унищожаването на неговите местообитания – най-вече полета на *Zostera sp.* в Черно море са довели вида до състояние на критично застрашен от изчезване. Анализът на данните дава основание да предположим, че поради липса на подходящи местообитания в момента не се наблюдава нова масова миграция от средиземноморието и реколонизация на Черно море с тревното попче, а местните представители са стари мигранти, които в еволюционно отношение се развиват паралелно с представителите от Средиземно море. Това може да се дължи на промени в подходящите местообитания за тревни попчета или други фактори.

Общото транзиционно/трансверсионно съотношение е $R = 5.041$ показва, че този вид е под еволюционния напистък, като и при него, както при *G. niger* се наблюдава преобладаване на транзиционни мутации.

2.5.2.2. ЗАКЛЮЧЕНИЯ

- 1) Анализиранияте секвенции показваха, че сред регистрираните до момента екземпляри от *Z./G. ophiocephalus* съществуват 3 хаплотипа, от които - **НЗ** обитават Черно море (България, Русия и Украйна), а останалите обитават Средиземно море.
- 2) Проведените анализи са доказателство, че популациите на *Z. ophiocephalus* в Черно море свиват своя ареал на разпространение, но продължават да са под еволюционен напистък.

2.5.3. Други представители на сем. *Gobiidae*

Обект на молекулярно таксономични изследвания бяха още два вида от род *Gobius* и един вид *Aphia*. И тук поради факата, че от тях разполагахме с единични екземпляри стеснихме изследванията с тях до доказване на видовата им принадлежност.

Единичен представител на вида *Gobius cobitus* (Змиевидното попче или Кадънка) беше уловен край гр. Fetsa, Турция. Изолираните от него секвенции на Cyt b не дадоха съвпадение с такива депозирани в NCBI, защото до момента от този вид няма никакви депозирани секвенции. Видовата принадлежност беше потвърдена по морфологични белези от ихтиолози в гр. Трабзон.

В района на гр. Трабзон, Турция е уловен един екземпляр *Aphia minuta* (Стъкленка). Видовата принадлежност беше потвърдена по морфологични белези от ихтиолозите в гр. Трабзон. Изолираната секвенция на гена кодиращ Cyt b беше сравнена с анотираните в NCBI и по този начин вида беше потвърден независимо и по молекулярно таксономични методи.

В района на Дуранкулак бе уловен екземпляр принадлежащ към вида *Gobius paganellus* (Скално попче). В NCBI няма анотирани секвенции на Cyt b гена. За да потвърдим чрез молекулярно таксономични методи видовата принадлежност изолирахме секвенцията на гена кодиращ субединица I на цитохром оксидазата (COI). Така видовата принадлежност беше потвърдена.

И от трите вида имаме по един екземпляр, а от два от тях въобще липсват анотирани секвенции на Cyt b. Поради това в рамките на тази дисертация не беше възможно да се правят изводи за популационната структура и еволюционните тенденции при видовете.

2.6.3.1. ЗАКЛЮЧЕНИЯ

1. Изолирани са успешно висококачествени секвенции на гена кодиращ Cyt b от два вида от род *Gobius*, един вид *Aphia*. както и секвенция на COI от *Gobius paganellus*.
2. Липсата на анотирани в NCBI секвенции от два от тези видове перспектива за задълбочени оригинални изследвания с помощта на модерни молекулярни методи.
3. Поради тяхната рядкост и защитения им статус задължително трябва да се уловят чрез не летални методи в статистически достоверни бройки за изолиране и анотиране на генните секвенции, определена на изменчивостта в тези секвенции, а чрез тях видовата и вътрепопулационната структура.

VI. ОБОБЩЕНИЯ

Прецизността и точността на молекулярно таксономичните изследвания с филогенетични елементи на анализ зависят от избрания тип молекулярни маркери. Както беше посочено в литературния обзор най-широко предпочитаните молекулярни маркери за молекулярно таксономични изследвания при редица таксономични групи животни са секвенциите на митохондриалния геном.

Най-модерните молекулярно таксономични и филогенетични изследвания използват новите техники за секвениране от следващо поколение (NGS) за провеждат тези анализи на ново цели митохондриални геноми.

При изследванията на сем. *Gobiidae* както беше посочено в литературния обзор за сега посредством NGS са секвенирани и анализирани ограничен брой митохондриални геноми на единични представители на видове обитаващи Южнокитайско море. Широко мащабни изследвани на това ниво за сега са трудно изпълними поради високата цена и огромната трудоемкост на този клас методи.

Следващият по предпочитане молекулярно таксономичен маркер са секвенциите на отделни гени и/или техни фрагменти (от митохондриалния геном).

От направеният литературен обзор и анализ на депозираните в NCBI секвенции ясно се вижда, че при сем. *Gobiidae* най-често като молекулярно таксономичен маркер се използват секвенциите на гена, кодиращ *Cyt b*. На лице в NCBI са голям брой секвенции на *Cyt b* включително и от черноморски видове почета.

По тази причина в настоящата дисертация избрахме да ползваме като основен молекулярно таксономичен маркер вариабилността на *Cyt b*.

Правилността на избора се потвърждава от обобщеното филогенетични дърво (приложение 4) в което са включени както изолираните от нас секвенции, така и тези на същите видове, анотирани в NCBI от други автори.

Обобщената филограма (прил. 4) показва, че всички изследвани от нас образци (от които имаме повече от един екземпляр) се групират по видова принадлежност заедно с тези от същия вид, анотирани в NCBI.

Допълнително предимство на избрания молекулярен маркер е, възможността чрез него да определим локациите на разпределението на отделните хаплотипове.

Високата вариабилност в секвенциите на *Cyt b* най-добре се вижда при *N. melanostomus*. При този вид установихме общо тридесет и един хаплотипа. Както показват нашите изследвания основните представители на *N. melanostomus* принадлежат на хаплотип 1, който е разпространен от Черно море на изток до Големите Американски езера на запад. Има основания да предполагаме, че H₁ следва да се разглежда като изходен хаплотип. Със заемането на нови местообитания и с течение на времето от него са се отдиференцирали останалите хаплотипове поради перманентното установяване на тези представители в нови местообитания без съществен генетичен обмен с останалите. Това е закрепило определени мутации, които са се утвърдили във времето. В българските части на Черно море, се наблюдават значителни разлики сред популациите на стронгила, които са свързани с географските характеристики на районите на местообитание (Tserkova et al., 2015).

Високата вариабилност на *Cyt b* при *N. melanostomus* е довела до появата на нови уникални за дадени местообитания хаплотипове. Например Каспийско и Черно море са станали изолирани един от друг басейни относителни скоро от геологична гледна точка, но в двата басейна вече са успели паралелно да се формирали уникални за тях хаплотипове. Понеже Черно море остава свързано със Световния океан негови представители от хаплотип 1 са достигнали дори до Големите американски езера, където започва паралелна еволюция на вида. Доказателства за това според нас е наличието в тази езерна група на два уникални за тях хаплотипа, които не може да са донесени чрез баластни води от кораби, защото се срещат само там, а вида не е автхтонен за Северна Америка.

Извеждането на филогенетичните взаимоотношения между понто-каспийски и средиземноморските групи беше извършено чрез изследване на тези секвенции. В построеното филогенетичното дърво (Приложение 4) ясно се очертават 2^{-те} сестрински групи видове. Първата обединява само понто-каспийските реликти, а втората видове - средиземноморските мигранти навлезли в Черно море.

Получихме и 4 секвенции на Cyt b от представители на род *Neugobius*, които показва междинни морфологични признаци между *N. retan* (Kessler, 1874) и *N. syrman* (Nordmann, 1840). Трябва да отбележим, че четирите екземпляра са хванати от един район, а именно с. Лозенец. Те сегрупират във филограмата заедно с видовете от род *Neogobius*. Това категорично потвърждава, че тези екземпляри принадлежат към род *Neogobius* и са в близкородствени отношения.

За да оценим тенденциите в развитието на популациите на изследваните видове попчета използвахме стандартния статистически Tajima D тест. Този тест служи за намиране на единични нуклеотидни замествания (SNPs) и сравнява броя на редките до средночестотните вариации (Tajima 1989). Tajima D е стандартната разлика между две често използвани мерки за вариабилност: Θ_w , която се базира на общия брой сегрегационни места и е повлияна най-много от нискочестотните вариации (Watterson, 1975) и Θ_π , която се основава на средна хетерозиготност и е повлияна най-много от вариантите с междинна честота (Tajima 1989b). D теста може да бъде полезен при откриването на процеси като подбор, произход и промяна в размера на популацията (Charlesworth et al., 1993).

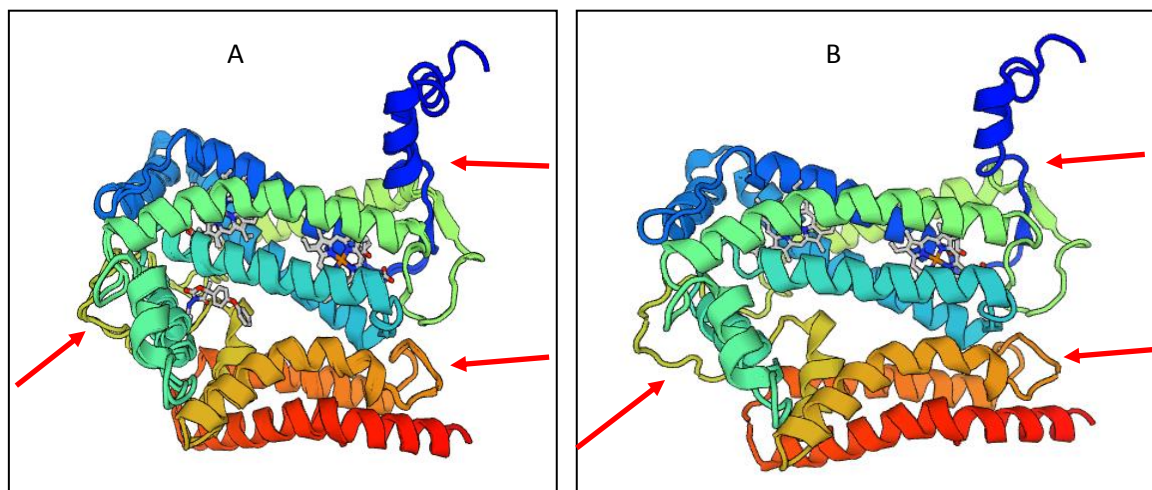
Основание да приложим този тест ни дадоха редица изследвания на други автори. Например Aziz et al., (2015) го прилагат при изследване тенденциите в развитието на китайска херинга (*Tenuulosa toli*) в районите между Dago и Mukah. Suzuki и съавтори (2015) използват подобен подход за отределяне на молекулярната еволюция при японски представители на род *Apodemus*, след ледена епоха. Като са направени определни изводи за тенденциите в разширението на популациите им. Подобни изследвания, но с ендимични видове плъхове правят Ge и съавтори (2017). Elizabethi съавтори (2009) прилагат този подход за изследване на тенденциите в развитието на популациите и еволюцията на три вида китове.

От друга страна Cyt b е функционален белтък с важно значение за електронтранспортните процеси в митохондриите. Появата на мутации в него може в предишни исторически етапи или в бъдеще да се отрази на функциите му и респективно на преживяемостта и размножаването на някои хаплотипове на видовете. Построени бяха in-silico 3-D на структурата на Cyt b за всички хаплотипове при различните изследвани видове. За целта използвахме възможностите на платформите <https://swissmodel.expasy.org/> и Conserved domains prediction <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi?SEQUENCE=168485436&FULL>. Допълнително използвахме достъпния в NCBI софтуер за 3-D моделиране Cn3D macromolecular structure viewer версия 4.3.1, която позволява да се заместват произволни аминокиселини и да се следи за промените в 3-D структурата на белтъчната молекула.

На фигура 19 А и В са представени 3-D модели на Cyt b базирани на двете секвенции с най-големи различия – съответно хаплотип 1 на *N. melanostomus* и хаплотип 6 на *G. niger*.

Както е посочено със стрелки аминокиселинните замени причиняват малки промени в конформацията на белтъците: например загуба на алфа спирален участък в N-терминалния край на Cyt b при *G. niger* и промяна в конформацията на част от 3-D актиния център. Според Conserved domains prediction и Cn3D macromolecular structure viewer версия 4.3.1 това, обаче в нито един от изследваните видове и неговите хаплотипове нуклеотидните замени да не се отразява на цялостната структура на активните центрове и важните структурни домейни.

За успешно прилагане на пълните възможности, които дава математическия апарат свързан с теста на Tajima е необходимо да се приеме, че отделните, участващи в анализа атели успяват да преживеят и да се размножават успешно. Факт е, че съществуващите в настоящето хаплотипове формират стабилни популации и много от тях дори заема нови екологични ниши. При положение обаче, че първите изследвания на черноморските попчета датират от преди малко повече от сто години, няма палеонтологически следи от по-ранни епохи, а това е първото задълбочено молекулярно таксономично изследване на семейството в Черно море решихме да ограничим анализите посредством D-теста само до положението в което се намират популациите в настоящия момент без да представяме не достатъчно аргументирани хипотези за палеоисторическите тенденциите в развитието на популациите и прогнози за бъдещата еволюцията на изследваните видове.



Фиг. 19. Триизмерно моделиране на структурата на Cyt b белтъка в *N. melanostomos*, халлотип 1 (A) и *G. niger* халотип 6 (B).

Комбинирането на обобщените D-стойности и R-стойности за честотата и за типовете нуклеотидни субституции ни позволиха да идентифицираме няколко вида с постепенно разширяващи се популации. Най-ясно това се визира за вида *N. melanostomus*, но важи и за *N. cephalargoides*, *M. betrachocephalus* и *G. niger*. За разлика от тях други видове почета като например *Gobius (Zosterisessor) ophiocephalus* губят местообитания и стесняват ареала си в Черно море.

Еволюционната история на сем. Gobiidae се дължи на динамичната геоложка и хидроложка еволюция на Понто-Каспийския басейн. Направеният филогенетичен анализ е съвместим с еволюционните хипотези, предложени за понто-каспийските представители и средиземноморските мигранти, които е в съгласие с предишни данни публикувани от други автори.

Позитивната тенденция на редица видове да разширяват в момента ареала си заемайки нови местообитания вероятно е свързана с приетите в края на миналия век мерки за възстановяване и опазване чистотата на водата в Черно море, както и на мерките за ограничаване безконтролния промишлен риболов на рибите обитаващи Черно море. Без да твърдим, че това е категорична прогноза, ако подобни мерки продължат да се прилагат повсеместно от всички държави имащи брегова линия с Черно море е възможно възстановяване на унищожените през миналия век местообитания и евентуално нарастване на числеността и разнообразието на рибните ресурси.

За съжаление повече от 12 вида описани като застрашени и редки, за които има съобщения през последните 100 години не бяха открити. За някои от тях няма съобщения да са откривани вече над 50 години. Надяваме се да не са унищожени и в бъдещите ни изследвания да бъдат открити техни локации, като с подходящо научно финансиране и съдействие на отговорните институции тези видове да бъдат съхранени за бъдещето.

VII. ИЗВОДИ

1. Уловени са и са изследвани са посредством морфологични и молекулярно таксономични методи 302 индивида от сем. *Gobiidae* за които е установено, че принадлежат към 12 вида.
2. Извършените филогенетични анализи на базата на изолираните секвенции от гена кодиращ *Cyt b* показват ясно разграничаване в два клона на понто-каспийската и средиземноморската групи видове.
3. В рамките всяка от двете групи секвенциите на *Cyt b* показват ясно групиране по видове и позволяват анализа на вътревидовите взаимоотношения на база хаплотипове.
4. Най-често срещан и най-широко разпространение има вида *Neogobius melanostomus*. На вътревидовото ниво са установени 31 хаплотипа, като преобладаващата част от тях имат локално разпространение. След прекъсване на връзката между Черно и Каспийско морета локалните хаплотипове търпят паралелна еволюция.
5. Изключения са хаплотип 1 на *N. melanostomus* - силно инвазивен с разпространение от Черно море и притоците му на запада до Големите Американски езера. Хаплотип_3, също показва инвазивен потенциал защото е общ за Черно и Каспийско море и свързаните с тях реки и изкуствени канали.
6. Останалите два вида от понто-каспийската група с широко разпространение са *Neogobius cephalargoides* и *Mesogobius betrachocephalus*. На вътревидово ниво са представени от 5 и съответно 7 хаплотипа. Хаплотипите означени условно с 1 и при двата вида са широко разпространени в Черно море и са в състояние на експанзия.
7. От видовете принадлежащи към групата на средиземноморските мигранти само *Gobius niger* е широко разпространен в Черно море. Хаплотип 6 преобладава и е в етап на разширение и заемане на нови ниши. Вече са се формирали локални популации представени от хаплотипове **H7** в района на н. Калиакра, **H8** в района на Трабзон –Турция и **H1** в Ялтенския залив.
8. Останалите осем уловени вида с изключение на речното попче (*N. fluviatilis*) са рядко срещани. Липсата на аотирани в NCBI секвенции от тях, дава перспектива занапред за задълбочени оригинални изследвания с помощта на модерни молекулярни методи.

Приноси

1. Оригинални приноси

- Първото широкомащабно изследване на черноморските попчета чрез ДНК секвенции;
- Първото подробно кладистично преразглеждане и реконструкцията на филогенетичните отношения на понто - каспийските попчета и средиземноморските мигранти, основани на ДНК последователности в България;
- Изолирани са нови 302 секвенции на цитохром б от сем. *Gobiidae* и е заявено тяхното аотиране в NCBI;

2. Научно – приложни приноси

- Разработени са набор от праймери, които позволяват да се изолира почти цялата секвенция на Cyt b между позиции 1 и 856.
- 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;

3. Приноси с потвърдителен характер

- Потвърждава се родовата принадлежност на черноморските попчета *Neogobius melanostomus* с тези, които обитават Евразия и Големите езера в Северна Америка.
- Потвърждава се родовата принадлежност на средиземноморските миграти навлезли в Черно море с видовете, които обитават Средиземно море.
- Потвърждава се че, вида *N. cephalargoides* се наблюдава за първи през този век на юг от Дуранкулак и н. Калиакра.

ПУБЛИКАЦИИ СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИЯТА

1. Tserkova F, Kirilova I, Tcholakova T, Gevezova-Kazakova M, Klisarova D, Johannesen J, Denev I (2015): Comparative study of round goby (*Neogobius melanostomus*) populations inhabiting Black Sea and North-West European water basins as revealed by variability in cytochrome b gene. *Bulgarian Journal of Agricultural Science* 21 (Supplement 1): 100–105.

Цитирана в :

Janáč M, Bryja J, Ondračková M, Mendel J, Jurajda P (2017) Genetic structure of three invasive gobiid species along the Danube-Rhine invasion corridor: similar distributions, different histories. *Aquatic Invasions* 12: 551– 564, <https://doi.org/10.3391/ai.2017.12.4.11>.

2. Tserkova F., Klisarova D., Denev I. (2016): Molecular taxonomy study of representatives of the genus *Gobius* inhabiting coastal waters of Black Sea region. *J. BioSci. Biotechnol.* 2016, 5(3): 241-246. ISSN 1314-6246.

3. Tserkova F., Gevezova-Kazakova M., Gospodinov G., Kirilova I., Klisarova D., Hubenova T. & Denev I.(2017): Genetic diversity and geographic distribution of round goby *Neogobius melanostomus* (Pallas, 1814) (Perciformes: Gobiidae) as revealed by mt DNA Cyt b gene haplotypes. *Acta zool. bulg.*, Suppl. 8, 2017: 41-45.

ЦИТИРАНА ЛИТЕРАТУРА

1. **Георгиев Ж. М.(1966):** Видов състав и характеристика на попчетата (Gobiidae, Pisces) в България. - Изв.Ни океаногр. риб.стоп. Варна,7, 159-228.
2. **Доброволов, И. С., Ж. М. Георгиев и С. Г. Доброволова (1995):** Сравнителни електрофоретични проучвания на видовете на семейство Gobiidae (PISCES) в българския сектор на Черно море. - Известия на Института по рибни ресурси Варна,23:48-68.
3. **Карапеткова М. (1976):** Състав и характер на ихтиофауната в българските черноморски реки. – Хидробиология, 4: 52-59.
4. **Карапеткова М., Живков М.,(2010):**Рибите в България, София, Изд. "Гяя-Либлис", ISBN-13:978-954-300-063-0.
5. **Маринов Б.(1978):** Ихтиофауната на българския сектор на река Дунав и нейното стопанско значение. - В: РУСЕВ, Б., В. НАЙДЕНОВ (ред.), Лимнология на българския сектор на р. Дунав. Изд. БАН, София, 201-228.
6. **Пешев И.(1970):** Ихтиофаунистичен обзор на някои реки в Източна България. – Известия на Народния музей – Варна, 6: 143-156.
7. **Рождественский, А. (1986):** Хидрохимия на Българския сектор на Черно море. Изд БАН 189 с.
8. **Стоянов Ст.,(1963):**Състав и Характер на Рибната Фауна на Българското Черноморие. БАН, ИЦНИИРР-Варна, III, 79-101.
9. **Dobrovolev I. S., Pinchuk V. I.(1993):**Genetic divergence in Black Sea goby fish group Ponticola, as evaluated by biochemical markers.Vestnik Zoologii2.58-63.
10. **Dobrovolev I. S. (1996):** Lactate dehydrogenase isoenzymes in the biochemical taxonomy and fish population genetics.– Proceedings of the Institute of Fisheries-Varna,24: 28-66.
11. **Gysels, E.; Hellemans, B.; Pampoulie, C.; Volckaert, F. A. M., (2004b):**mPhylogeography of the common goby, *Pomatoschistus microps*, with particular emphasis on the colonization of the Mediterranean and the North Sea. Mol. Ecol. 13, 403–417.
12. **Gysels, E.; Hellemans, B.; Patarnello, T.; Volckaert, F. A. M., (2004a):**Current and historic gene flow of the sand goby *Pomatoschistus minutus* on the European Continental Shelf and in the Mediterranean Sea. Biol. J. Linn. Soc. 83, 561–576.
13. **Hoese, D.F. & Larson H. (2006):** Description of two new species of *Nesogobius* (Pisces: Gobioidae: Gobiidae) from southern Australia. *Memoirs of Museum Victoria*. 63(1): 7-13.
14. **Kumar S, Stecher G, and Tamura K (2016):** MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution* 33:1870-1874.
15. **Librado, P. and Rozas, J. (2009):** DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25: 1451-1452.
16. **Miller, P.J., Vasil'eva, E.D., (2003):** *Neogobius iljin*, 1927. In: Miller, P.J. (Ed.), *The Freshwater Fishes of Europe*. AULA-Verlag, Wiesbaden, pp. 164–171.
17. **Nelson, J.S., (1994):** *Fishes of the World*. 3rd Edn., John Wiley and Sons, New York, USA., pp:600. Pampoulie et al. 2004.
18. **Sorice M., V. Caputo (1999):** Genetic variation in seven goby species (Perciformes: Gobiidae) assessed by electrophoresis and taxonomic inference. – *Marine Biology*, 134:327-333.
19. **Vasil'eva E. D., (2007):** “Gobies of the Genus *Rhinogobius* (Gobiidae) of Primorye and Water Bodies of Middle Asia and Kazakhstan. I. Morphological Characteristic and Taxonomic Status,” *Vopr. Ikhtiol.* 47 (6), 733–742.
20. **Vassilev M., Pehlivanov L., (2005):** Checklist of Bulgarian freshwater fishes. *Acta zoologica bulgarica*, 57, 2: 161 – 190.
21. **Vassilev M., A. Apostolou, B. Velkov, P. Ivanova, M. Panayotova, D. Dobrev, L. Pehlivanov (2011):** Status of gobiid ichthyofauna in Bulgaria: taxonomical, conservative and social aspects. – *Natura Montenegrina, Podgorica*, 10 (2): 115-124.
22. **Wallis G. P., J. A. Beardmore (1984a):** An electrophoretic study of the systematic relationships of some closely related goby species (Pisces, Gobiidae). – *Biological Journal of the Linnean Society*, 22 (2): 107-123.
23. **Wallis G. P., J. A. Beardmore (1984b):** Genetic differentiation between populations of *Pomatoschistus minutus* from the Bristol Channel and the Adriatic. – *Genetica*, 62: 75-80.
24. **Zaitsev, Yu. and Mamaev, V.O., (1997):** Biological diversity in the Black Sea: A study of change and decline, *Black Sea Environmental Series*, Vol. 3, United Nations Publishing, New York, 208 pages.
25. **Zarev V., A. Apostolou, B. Velkov, M. Vassilev, (2013):** "Review of the distribution of the Family Gobiidae (Pisces) in the Bulgarian Danube tributaries", *Ecologica Balkanica*, 5 (2), pp. 81-89.

