



Пловдивски университет
„Паисий Хилендарски“
Биологически факултет



Катедра „Молекулярна биология“

ДАРИНКА КАМЕНОВА БОЯДЖИЕВА-ДОЙЧИНОВА

АВТОРЕФЕРАТ

на дисертационен труд за присъждане
на образователна и научна степен „доктор“

МОЛЕКУЛЯРНО ТАКСОНОМИЧНО ИЗСЛЕДВАНЕ НА СЕМЕЙСТВО CLUPEIDAE (СЕЛДОВИ) В БЪЛГАРСКАТА АКВАТОРИЯ НА ЧЕРНО МОРЕ

Област на висше образование: 4. Природни науки, математика
и информатика

Професионално направление: 4.3. Биологически науки

Докторска програма: Молекулярна биология

Научен ръководител: Доц. д-р Атанас Арnaudов

Пловдив, 2025

Дисертационният труд съдържа 134 страници, 12 таблици, 33 фигури и едно приложение. Библиографската справка включва 179 заглавия, от които 16 на кирилица и 163 на латиница.

Дисертационният труд е обсъден и насочен за защита на заседание на разширен катедрен съвет на катедра „Молекулярна биология“ към Биологически факултет на Пловдивски университет „Паисий Хилендарски“, проведено на 30.09.2025 г.

Публичната защита ще се състои на

Материалите по защитата са на разположение в библиотеката на ПУ „Паисий Хилендарски“ и са публикувани на интернет страницата на университета.

Научно жури в състав:

Вътрешни членове:

доц. д-р Елена Димитрова Апостолова-Кузова, доц. д-р Атанас Димов Арнаудов

Външни членове:

проф. д-р Нася Борисова Томлекова, проф. д-р Петя Павлова Иванова, доц. д-р Цветослав Венциславов Койнарски

Резервни членове:

проф. д-р Дилян Георгиев Георгиев, проф. д-р Людмила Николаевна Николова

Издавам искрена благодарност на проф. д-р Илия Денев† и доц. д-р Атанас Арнаудов за оказаното доверие и подкрепа. Признателност изразявам към гл. ас. д-р Младен Найденов, гл. ас. д-р Данаил Минчев, д-р Ина Кирилова и д-р Мария Гевезова за ценните препоръки и съдействие. Благодаря на гл. ас. д-р Фериха Церкова и доц. д-р Елица Петрова-Павлова от Института по рибни ресурси – Варна, както и на г-жа Стефка Толева и г-н Георги Пейчев за събраните образци. Сърдечно благодаря на семейството си за постоянната подкрепа и мотивация през годините.

СЪДЪРЖАНИЕ

1. Въведение.....	4
2. Цел и задачи.....	5
3. Материали и методи.....	5
3.1. Материали	5
3.2. Методи.....	6
4. Резултати.....	8
5. Обсъждане.....	26
6. Заключение	31
7. Изводи.....	31
8. Приноси	32
9. Публикации	32

1. Въведение

Представителите на семейство Clupeidae наброяват между 150 и 216 вида, обединени в пет подсемейства (Alosinae, Clupeinae, Dorosomatinae, Dussumieriinae, Pellonulinae) и около 63 рода (Nelson, 2006; Карапеткова и Живков, 2010). Това са предимно морски пелагични риби (трициона, сардина, сардинела), проходни (карагъоз) и сладководни (езерна цаца). Разпространени са във всички морета и океани, но най-богато е разнообразието им в тропиците.

Семейство Clupeidae има важна роля в ихтиофауната на Черно море. У нас то е представено с пет рода и девет вида (Карапеткова и Живков, 2010). Интересите към него се определят и от икономическото му значение. За българския морски промишлен риболов триционата (*Sprattus sprattus* L., 1758) е най-значимият обект – 4588 тона за 2019 г. С промишлено значение е и карагъозът (*Alosa immaculata* Benn., 1835) – улов от 25.63 тона общо в Черно море и р. Дунав за 2019 г. (Министерство на земеделието. Ситуационен анализ на сектор Рибарство в България, София 2020).

Методите на класическата ихтиология често не позволяват точно определяне на видовете. Морфологичното идентифициране на представителите на семейство Clupeidae (и особено на род *Alosa*) е трудно. Причина за това е вътревидовата фенотипна пластичност (Mc Dowal 2001, 2003) и междувидовата хибридизация (Alexandrino et al., 2006; Faria et al., 2011; Vernigora, 2020). Това обуславя необходимостта от изследвания на черноморските селдови с помощта на ДНК-секвениране на маркерни гени. Този вид изследвания осигуряват висока възпроизводимост и позволяват сравняване на данни получени в различни периоди от време от различни части на света. В настоящото изследване бяха използвани три генетични маркера: митохондриалните гени NADH1 и Cyt b и вътрешният транскрибиран спейсер ITS1. Генът Cyt b се характеризира с относително постоянна скорост на еволюция, което го определя като подходящ маркер както за изследване на близкородствени видове, така и на по-отдалечени таксони. Генът NADH1 е особено полезен при разграничаване на видове с близка екологична и морфологична характеристика, поради наличието на висока междувидова вариабилност. За допълнителна обективност беше включен и ядреният маркер – ITS1. Той се транскрибира, но не се транслира, което позволява натрупване на значителна междувидова мутационна изменчивост. Този избор е основан на доказаната им ефективност при филогенетични и молекулярно таксономични анализи, особено при риби.

2. Цел и задачи

Цел: Да се проведе молекулярно таксономично изследване на представители на семейство Clupeidae в българската акватория на Черно море чрез оценка на вариабилността на митохондриалните гени Cyt b и NADH1 и на вътрешния транскрибиран спейсер ITS1.

Задачи:

1. Да се уловят представители на семейство Clupeidae от различни участъци на българското Черноморско крайбрежие. Да се определи видовата им принадлежност с помощта на съществуващите определителни таблици въз основа на морфологични и морфометрични методи.
2. Да се конструират праймери, които позволяват размножаването на подходящи фрагменти от гените кодиращи Cyt b и NADH1 и спейсера ITS1.
3. Да се амплифицират избраните фрагменти от двата митохондриални гена Cyt b и NADH1 и вътрешния транскрибиран спейсер ITS1.
4. Да се секвенират ампликони от гените Cyt b, NADH1 и спейсера ITS1 от набавените екземпляри на семейство Clupeidae.
5. Да се анализират нуклеотидните полиморфизми в секвенциите на гените Cyt b, NADH1 и ITS1. Да се сравнят с аотитраните в базата данни NCBI, с цел изследване на вътревидово и междувидово разнообразие.
6. Да се анализират междувидовите филогенетични връзки в представителите на семейство Clupeidae в българската акватория на Черно море.

3. Материали и методи

3.1. Материали

Изследвани бяха общо 155 представители на семейство Clupeidae (110 бр. от род *Alosa*; 40 бр. от род *Sprattus*; 2 бр. от род *Sardina*; 3 бр. от род *Sardinella*). Уловът беше извършен с риболовен кораб на Института по рибни ресурси – Варна, от Дуранкулак на север до р. Резовска на юг. Опашните перки бяха консервирани в 70% етанол за последваща ДНК екстракция.

3.2. Методи

3.2.1. *Определяне на видовата принадлежност по морфологични белези*

Представителите на семейство Clupeidae бяха идентифицирани чрез определители, базиращи се на систематизирани морфологични белези за всеки вид. Използвани са определителите на Васильева, 2007; Дренски, 1951; Георгиев, 1966; Карапеткова и Живков, 2010; Пешев и Боев, 1962.

3.2.2. *Изолитране на ДНК*

За изолитране на ДНК бяха използвани фрагменти от опасната перка на образците и Blood & Tissue кит на фирма Qiagen.

3.2.3. *Определяне количеството на изолитраната ДНК*

Количеството на изолитраната ДНК беше проверено спектрофотометрично при 260 nm, а качеството беше контролирано чрез електрофореза на 1% агарозен гел.

3.2.4. *Биоинформатичен анализ с цел конструиране на праймери*

За изготвяне на праймерите бяха използвани нуклеотидни секвенции на митохондриалните гени Cyt b и NADH1, както и секвенции на ITS1 от базата данни NCBI. Алайнмънтът беше извършен с програмите Geneious 4.8.5 и Vector NTI 10.1 (Invitrogen). От консенсусната секвенция бяха създадени ген-специфични праймери с дължина 18 – 20 bp и температура на анилинг 56°C.

3.2.5. *Провеждане на PCR реакциите:*

Състав на реакционните смеси за PCR:

Таблица 1. Състав на реакционните смеси

2µL (~ 120 ng)	ДНК с количество ~ 120 ng
по 1 µL (10 µmol/L)	прав и обратен праймер
21 µL	стерилна дестилирана вода до общо количество на реакционната смес 50 µL
25 µL	PCR Master Mix

Програма на PCR реакциите:

Таблица 2. Програма на PCR реакциите

	Cyt b		NADH1		ITS1	
1)	95°C	5 min	95°C	5 min	94°C	5 min
2)	95°C	15 s	95°C	15 s	94°C	45 s
3)	56°C	15 s	54°C	15 s	58°C	45 s
4)	72°C	40 s	72°C	2 min	72°C	2.5 min
5)	35 цикъла		35 цикъла		35 цикъла	
6)	72°C	7 min	72°C	7 min	72°C	10 min
7)	4°C	∞ min	4°C	∞ min	4°C	∞ min

3.2.6. Гел-електрофореза на ДНК

PCR продуктите бяха разделени на 1% агарозен гел съдържащ 0,5 µg/mL етидиев бромид.

3.2.7. Екстракция на ДНК фрагменти от гела

За пречистване на PCR продуктите беше използван QIAquick Gel extraction kit (Qiagen, Cat № 28704). Следван беше протоколът, препоръчан от фирмата.

3.2.8. Секвениране на изолираните фрагменти

Извършено беше директно еднопосочно секвениране на фрагмента от гена Cyt b и директно двупосочно секвениране на целия NADH1 ген във фирма Eurofins GATS, Германия. PCR ампликоните на ITS1 бяха клонирани в плазмидни вектори pDrive като се използва PCR Cloning Kit (Qiagen, Cat № 231224). Реакциите на лигиране се проведеха с 250 µL прясно приготвени компетентни бактериални клетки (*E. coli* – TOP 10 – Invitrogen). Плазмидите съдържащи PCR ампликоните бяха изолирани с QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Cat № 27104). Секвенирането беше извършено в MWG – Biotech AG, Fankfurt, Германия.

3.2.9. Биоинформатичен анализ на данните от секвениране на гените Cyt b и NADH1

- Maximum parsimony – MP: програма PAUP 4.0a (v. 169)
- Bayesian inference – BI: програма MrBayes 3.2.6
- Neighbor joining – NJ: Geneious Tree Builder под Geneious Prime 2024.0.2

– Maximum Likelihood – ML: програма PhyML 3.3.20180214

3.2.10. Биоинформатичен анализ на данните от секвениране на ITS1

Използван беше онлайн nblast анализ за потвърждаване, че изолираните секвенции принадлежат на интересувания ни спейсер ITS1. Приложен беше алгоритъмът на Altschul et al., 1997. За множествения алайнмънт беше използвана програмата Vector NTI 10.1 (Invitrogen) и алгоритъм ClustalW. Избраният алгоритъм позволи да се оценят филогениите с максимално подобие (ML) въз основа на молекулен часовник (Felsenstein, 1981). Кладограмата беше конструирана с помощта на софтуер Tree Viewer (v. 1.6.6). Получените последователности бяха обработени от PHYLIP (Phylogeny Inference Package, версия 3.5c Copyright 1986-1993 by Joseph Felsenstein of Washington).

4. Резултати

4.1. Резултати от анализа на гена NADH1 при род Alosa

4.1.1. Конструирани праймери

Конструираните праймери бяха универсални за трите рода – Alosa, Sardina, Sprattus. Те бяха подбрани по такъв начин, че да позволят амплифицирането на гена NADH1 в пълната му дължина (975 bp). Правият праймер се намира в края на 16S rRNA (от позиция 1529 до позиция 1547 вкл.), а обратният в началото на tRNA-Gln и Ile (от позиция 1 до 18 вкл.). Комбинацията Fw1 и Rev2 показва най-добри резултати.

Fw1 5'-AAGTCCTACGTGATCTGAG-3'

Fw2 5'-GCTATTAAGGGTTCGTTTG-3'

Rev1 5'-A GCACCCAGAGTTTTGATC-3'

Rev2 5'-CGTTCAGGCACAGCTCC-3'

4.1.2. PCR продукти от амплификацията на гена NADH1

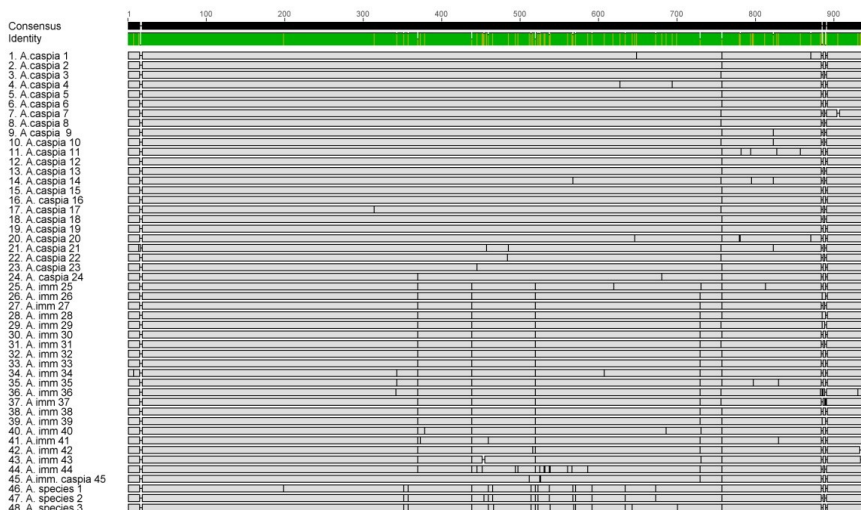
Амплифицираните PCR продукти се визуализираха като размерът на ампликоните съответстваше на очаквания – 975 bp (фиг. 1).



Фигура 1. Резултати от PCR амплификацията на NADH1 на част от образците в род *Alosa* (19-24 *A. caspia*; 25-31 *A. immaculata*); маркер 1kb Plus DNA Ladder New England Biolabs N3200S

4.1.3. Алайнмънт на секвенциите на гена *NADH1*

Множественият алайнмънт на секвенциите беше извършен с програмата Geneious 4.8.5. (фиг. 2).



Фигура 2. Алайнмънт на секвенциите на гена NADH1 в род *Alosa*

4.1.4. Единични нуклеотидни полиморфизми на гена *NADH1*

Новополучените последователности за всички 48 образци с дължина на фрагмента 860 bp, бяха депозираны в GenBank под номера за достъп: PP391086-PP391130 и PP421162-PP421164. Извършеният множествен алайнмънт, установи единични нуклеотидни полиморфизми в трите групи (табл. 3). Молекулярните данни от биоинформатичния анализ потвърдиха, че в род *Alosa* се формират три групи, както бяха определени по морфологични белези. Първа група включва 24 таксона от вида *A. caspia*. Втора група – 21 представители на вида *A. immaculata*. Трета група е съставена само от три екземпляра, които означихме като *A. species* (*A. sp.*)

Таблица 3. Позиции на SNPs на гена *NADH1* при род *Alosa*

Позиция SNP	352	358	370	439	460	466	494	498	514	520	523
<i>A. immaculata</i> 19 бр.	A	G	G	T/C	G	T	G	T	T	C/T	A
<i>A. caspia</i> 24 бр.	A	G	A	C	G	T	G	T	T	T	A
<i>A. immaculata</i> № 44	A	G	G/A	T/C	G	T	A/G	C/T	T	C/T	A
<i>A.immaculata</i> / <i>caspia</i> № 45	A	G	A	C	G	T	G	T	T	T	A
<i>A. species</i> 3 бр.	G/A	A/G	A	T/C	A/G	C/T	G	T	C/T	C/T	G/A

Позиция SNP	525	531	538	539	561	567	568	571	592	634	730	757
<i>A.immaculata</i> 19 бр.	A	G	A	C	T	C	G	G	A	A	G/A	A
<i>A. caspia</i> 24 бр.	A	G	A	C	T	C	G	G	A	A	A	G/A
<i>A.immaculata</i> № 44	C/A	A/G	C/A	A/C	A/T	T/C	G	G	A	A	G/A	A
<i>A.immaculata</i> <i>/caspia</i> № 45	G/A	G	A	C	T	C	G	G	A	A	G/A	A
<i>A. species</i> 3 бр.	A	G	G/A	C	T	C	A/G	A/G	G/A	G/A	A	A

След *in silico* транслация на получените секвенции, проверихме дали нуклеотидните замени водят до кодиране на друга аминокиселина или до изместване на активната рамка на четене. Навсякъде мутациите са тихи, водят до промяна на кодон с негов синонимен.

4.1.5. Кладограма на гена *NADH1*

Кладограмата на гена *NADH1* се характеризираше със следните резултати:

– Метод на максимална пестеливост (MP): Fitch резултат 73; индекс на съвпадение 0.8767; индекс на задържане 0.9357.

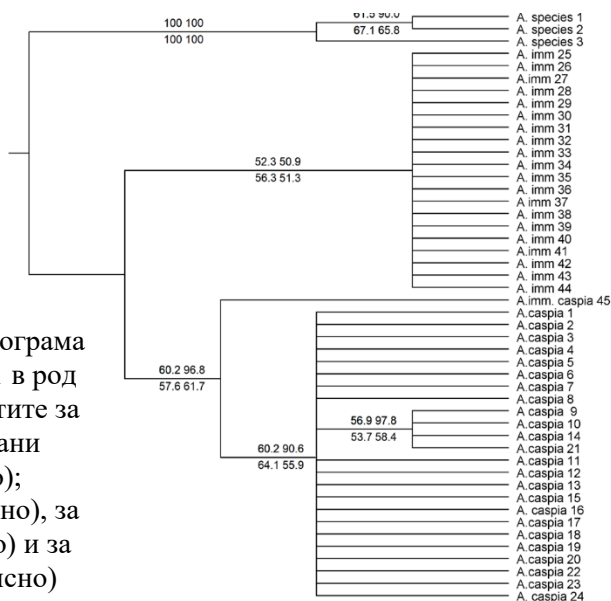
– Метод на Баезиева статистика: log-likelihood резултат в интервала $[-1732; -1707]$; автокорелация в интервала $[1323; 1484]$; ефективни размери на извадката, вариращи от 666 до 748.

– Метод на групиране по съседство (NJ): обедини изследваните секвенции в три клъстера, които съвпадат с видовете определени морфологично.

– Метод на максимално подобие (ML): log-likelihood резултат от -1668; composite log-likelihood -55786; пестеливост (parsimony) 70.

Четири различни метода, репродуцираха силно припокриващи се резултати за топологиите на кладограмите с три открояващи се групи – *A. immaculata*, *A. caspia* и *A. species*.

Фигура 3. Кладограма на гена *NADH1* в род *Alosa*. Стойностите за MP са показани (горе вляво); за BI (горе вдясно), за NJ (долу, вляво) и за ML (долу, вдясно)



4.2. Резултати от анализа на гена NADH1 при род Sprattus

4.2.1. Конструирани праймери

Праймерите на гена NADH1 са общи за трите рода (Alosa, Sprattus, Sardina). Комбинацията Fw1 и Rev2 показва най-добри резултати.

Fw1 5'-AAGTCCTACGTGATCTGAG-3'

Fw2 5'-GCTATTAAGGGTTCGTTTG-3'

4.2.2. PCR продукти от амплификацията на гена NADH1

Амплифицираните PCR продукти се визуализираха като размерът на ампликоните съответстваше на очаквания – 975 bp (фиг. 4).



Фигура 4. Резултати от PCR амплификацията на гена NADH1 на част от образците в род Sprattus; маркер 1kb Plus DNA Ladder New England Biolabs N3200S

4.2.3. Алайнмънт на секвенциите на гена NADH1

Множественият алайнмънт на секвенциите беше извършен с програмата Geneious 4.8.5.



Фигура 5. Алайнмънт на секвенциите на гена NADH1 в род Sprattus

4.2.4. Единични нуклеотидни полиморфизми на гена *NADH1*

По биоинформатични данни в род *Sprattus* се оформиха четири групи, различаващи се една от друга по набор от SNPs (табл. 4). Първа група включва девет образци (от 1 до 9). Втора група е от шест екземпляра (от 10 до 15). Трета група е съставена от четири индивида (от 16 до 19). Четвърта група също от четири екземпляра (от 20 до 23).

Таблица 4. Позиции на SNPs на гена *NADH1* в род *Sprattus*

Позиция SNP	123	135	150	427	562	631	682	697	715	781
Първа гр. (1 – 9)	G/A	A	G	A	G	G	G	A	A	A
Втора гр. (10 – 15)	A	A	G	A	A/G	G	G	A	G/A	A
Трета гр. (16 – 19)	A	G/A	C/G	A	G	G	C/G	A	A	G/A
Четвърта гр. (20 – 23)	A	A	G	G/A	G	A/G	G	G/A	A	A

Транслацията *in silico* показва, че установените нуклеотидни замени в образците от род *Sprattus* не водят до промени в кодираните аминокиселини или в активната рамка на четене.

4.2.5. Кладограма на гена *NADH1*

Кладограмата на гена *NADH1* при представителите на род *Sprattus* се характеризираше със следните резултати:

- Метод на максимална пестеливост (MP): Fitch резултат 47; индекс на съвпадение 0.9375; индекс на задържане 0.9230.

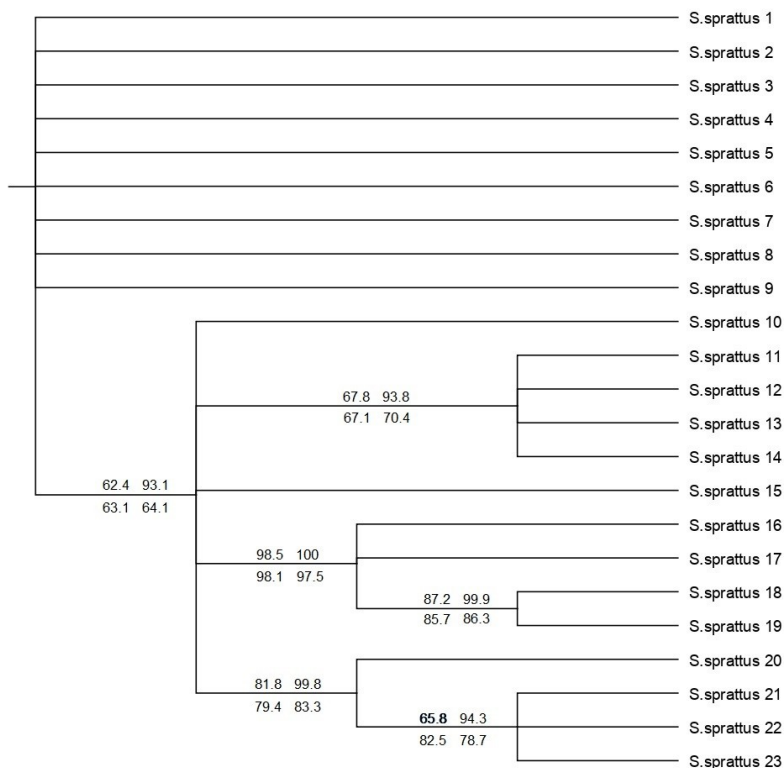
- Метод на Баезиева статистика: log-likelihood резултат в интервала [–1567; –1550]; автокорелация в интервала [1323; 1484]; ефективни размери на извадката, вариращи от 666 до 748.

- Метод на групиране по съседство (NJ): обедини изследваните секвенции от трикона се в четири клъстера.

- Метод на максимално подобие (ML) чрез програма PhyML конструира кладограма с log-likelihood резултат от -1532 и composite log-likelihood от -27048. Всички възли имат много висока статисти-

ческа достоверност (bootstrap support). Изчислената пестеливост (parsimony) беше 47, идентична на тази на RAUP 4.0a.

Четири различни метода показаха силно припокриващи се резултати за топологиите на кладограмите и формирха четири генетични групи трикона (фиг. 6).



Фигура 6. Кладограма на гена NADH1 в род *Sprattus*. Стойностите за МР са показани (горе вляво); за ВІ (горе вдясно), за NJ (долу, вляво) и за ML (долу, вдясно)

4.3. Резултати от анализа на гена NADH1 при род *Sardina*

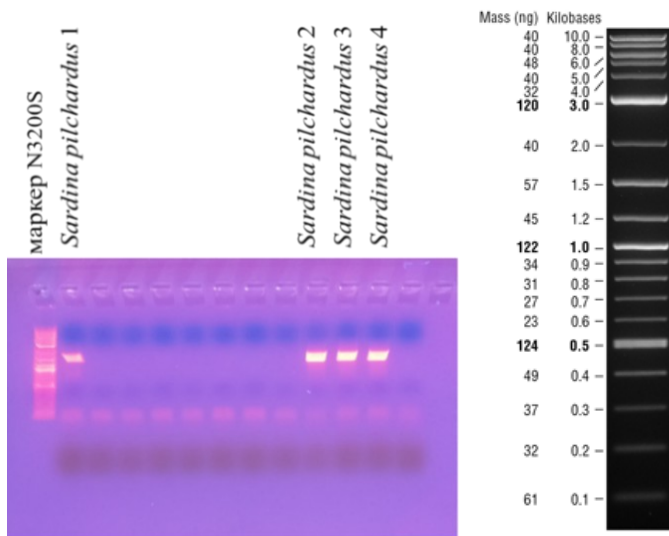
4.3.1. Конструирани праймери

Праймерите на гена NADH1 са универсални за родове *Alosa*, *Sprattus* и *Sardina*. Най-подходящата праймерна комбинация беше Fw2 и Rev2.

Fw2 5'-GCTATTAAGGGTTCGTTTG-3'
 Rev2 5'-CGTTCAGGCACAGCTCC-3'

4.3.2. PCR продукти на гена *NADH1*

Амплифицираните PCR продукти се визуализираха, като размерът на ампликоните съответстваше на очаквания – 975 bp (фиг. 7).



Фигура 7. Резултати от PCR амплификация на гена *NADH1* на образците в род *Sardina*; маркер 1kb Plus DNA Ladder New England Biolabs N3200S

4.3.3. Алайнмънт на секвенциите на гена *NADH1*

От анализираните десет образци, само четири бяха с успешна амплификация (фиг. 7). Извършеният алайнмънт с аотирана секвенция в NCBI показва, че тези четири екземпляра, морфологично определени като *S. pilchardus* не принадлежат към този вид. Молекулярните данни за образец *S. pilchardus* 1 сочат, че той е представител на вида *A. immaculata*. Останалите три образци (*S. pilchardus* 2, 3 и 4) бяха определени по молекулярни данни като тропическа сардина – *Sardinella aurita* (Valenciennes, 1847) – вид, който се среща изключително рядко в Черно море (фиг. 8).



Фигура 8. Алайнмънт на секвенциите на гена NADH1 при род Sardina

4.4. Резултати от анализа на гена Cyt b при род Alosa

4.4.1. Конструирани праймери

При разработването на праймерите бяха подбрани нуклеотидни последователности с дължина 18 – 20 bp и температура на анийлинг около 56°C, разположени във вътрешността на гена Cyt b. Праймерите бяха специфични за всеки отделен род. Комбинацията Fw2 и Rev2 показва най-добри резултати.

Fw1 5'-TTAGCRGCACARATTTTACAGGA-3'

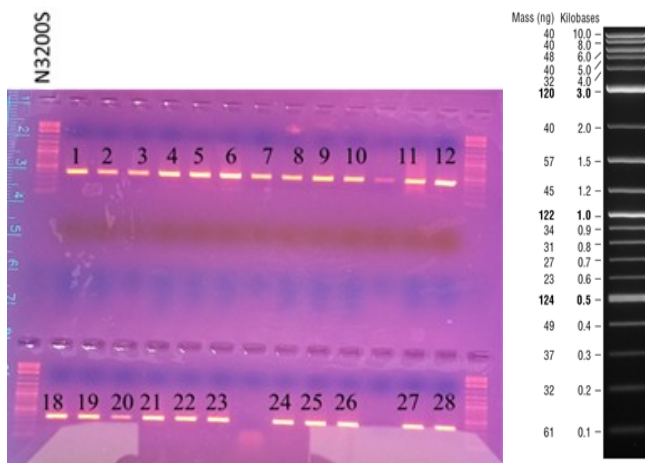
Fw2 5'-CTGGCTATACACTACACTTCTGA-3'

Rev1 5'-TGCGAAGAATCGGGTTAGAGT-3'

Rev2 5'-CTCAGATTTCATTCTACTAGTGCG-3'

4.4.2. PCR продукти на гена Cyt b

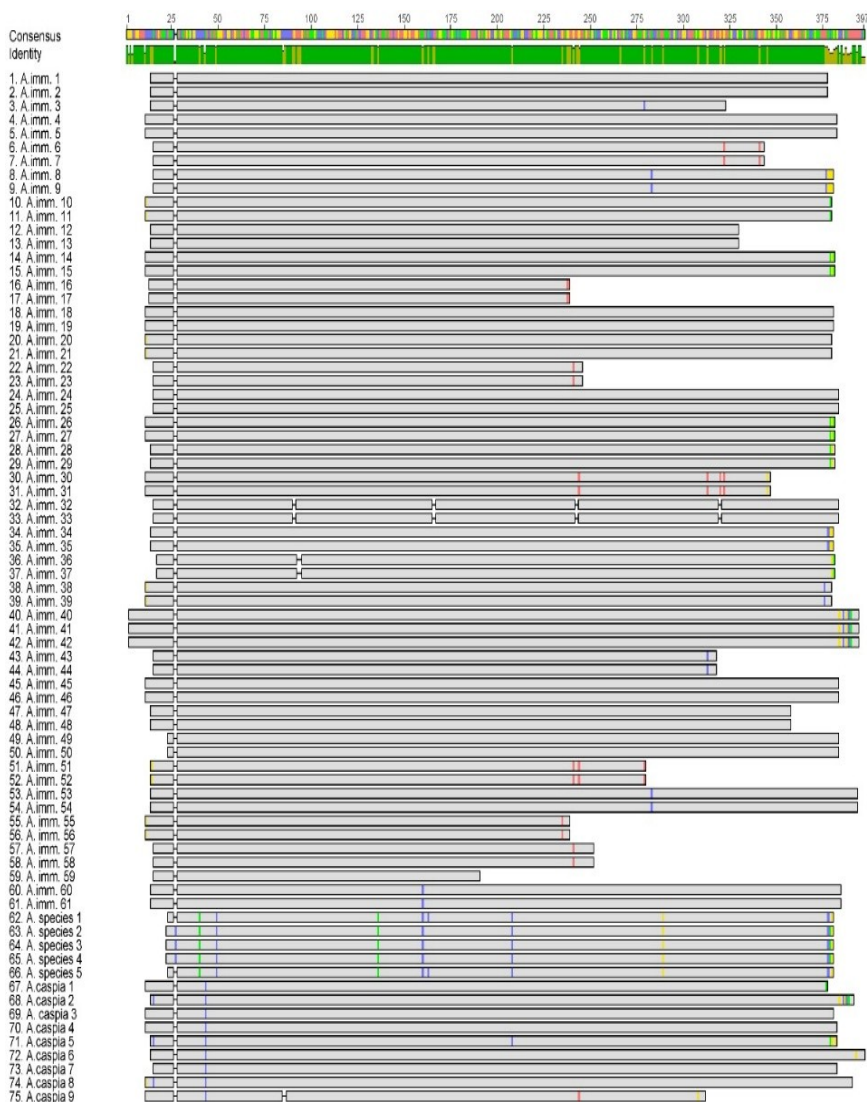
Амплифицираните PCR продукти се визуализираха като размерът на ампликоните съответстваше на очаквания – 350 bp (фиг. 9)



Фигура 9. Резултати от PCR амплификацията на гена Cyt b на част от образците в род Alosa; маркер 1kb Plus DNA Ladder New England Biolabs N3200S

4.4.3. Алайнмънт на секвенциите на гена *Cyt b*

Множественият алайнмънт на секвенциите беше извършен с програмата Geneious 4.8.5.



Фигура 10. Алайнмънт на секвенциите на гена *Cyt b* при род *Alosa*

4.4.4. Единични нуклеотидни полиморфизми на гена *Cyt b*

В групата на *A. caspia* полиморфните позиции бяха две: 44 (C/T) и 86 (T/C). Те са части от кодони съответно за аминокиселините валин и глицин. Петте екземпляра от трета група, означени като *A. species* се характеризираха с набор от полиморфизми, отличаващи ги от групите на *A. immaculata* и *A. caspia*. (табл. 5).

Таблица 5. Позиции на SNPs на гена *Cyt b* при род *Alosa*

Позиция SNP	27	40	44	49	86	136	160	208
<i>A.immaculata</i> (61 бр.)	–	C	T	T	C	C	T	T
<i>A. caspia</i> (от 1 до 14)	–	C	C/T	T	C	C	T	T
<i>A. caspia</i> (от 15 до 34)	–	C	C/T	T	T/C	C	T	T
<i>A. species</i> (5 бр.)	C/-	T/C	T	C/T	C	T/C	C/T	C/T

Транслацията *in silico* показва, че всички единични нуклеотидни замени на гена *Cyt b* водят до промяна на кодон с негов синонимен. Няма промяна във вида на кодираната аминокиселина.

4.4.5. Кладограма на гена *Cyt b*

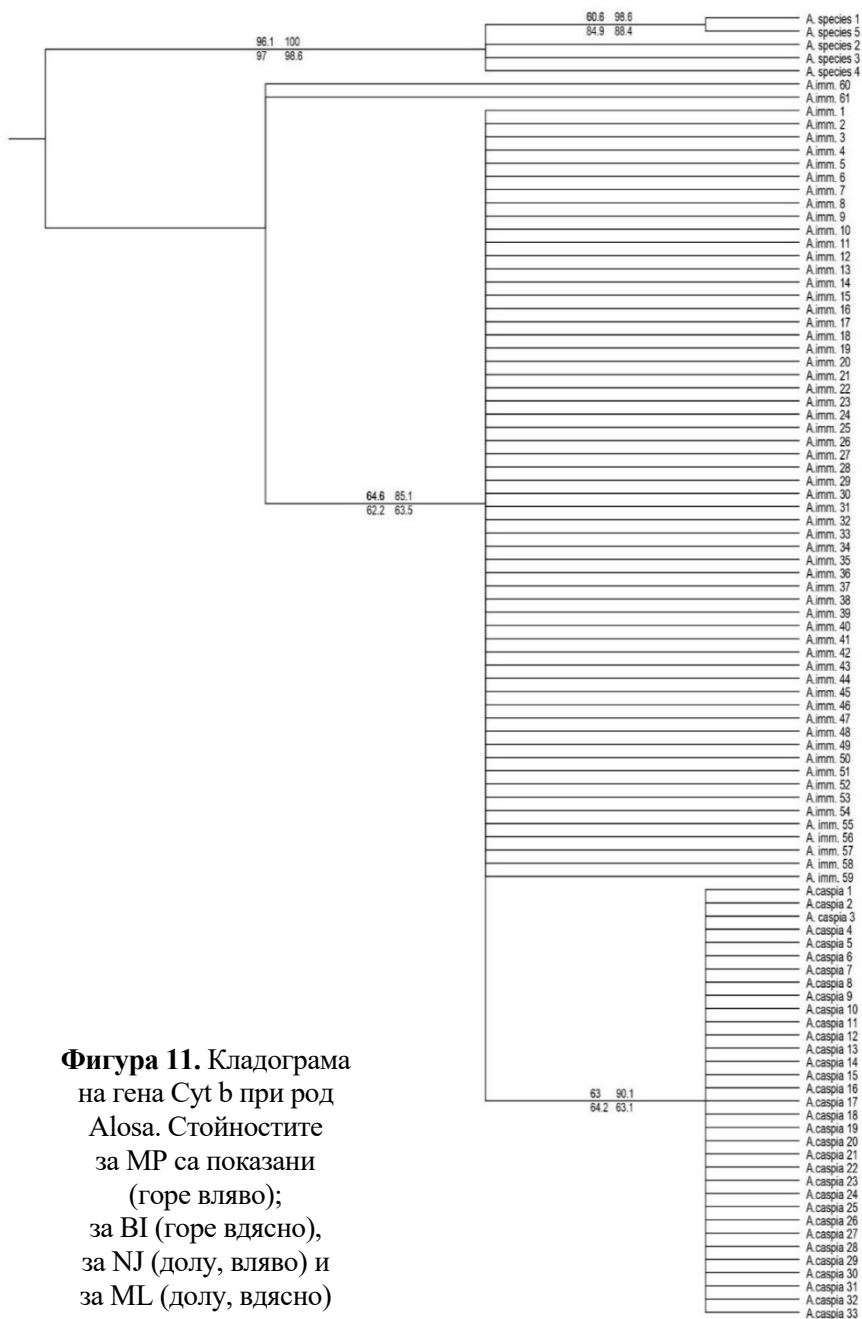
Резултатите от кладограмата на гена *Cyt b* при род *Alosa* в голяма степен бяха сходни с тези, получени за гена *NADH1* при същия род.

– Метод на максимална пестеливост (MP) създаде кладограма с Fitch резултат от 7 (индекс на съвпадение = 0.3500; индекс на задържане = 0.8115). Всички изследвани позиции бяха от тип „unpod“, делециите бяха обработвани като липсващи позиции. Позициите с установена изменчивост се оказаха информативни, като техният общ брой е 7.

– Метод на Баезиева статистика (BI) продуцира кладограма с log-likelihood резултат в интервала [–295; –279].

– Метод на групиране по съседство (NJ) ясно очерта три основни клъстера както при анализа на гена *NADH1*, така и при *Cyt b*, които съответстваха на морфологично определените образци.

– Метод на максимално подобие (ML) чрез програма PhyML конструира кладограма с log-likelihood резултат от – 260 и composite log-likelihood от – 21783. Изчислената пестеливост (parsimony) е 7 – резултат, идентичен с този получен посредством RAUP 4.0a.



Фигура 11. Кладограма на гена *Cyt b* при род *Alosa*. Стойностите за MP са показани (горе вляво); за BI (горе вдясно), за NJ (долу, вляво) и за ML (долу, вдясно)

4.5. Резултати от анализа на гена *Cyt b* при род *Sprattus*

4.5.1. Конструирани праймери

Конструираните праймери бяха специфични за род *Sprattus*. Тествани бяха и четирите праймерни комбинации, като двойката Fw1 и Rev2, показва най-добри резултати.

Fw1 5'-TATACACTACACCTCTGACATC-3'

Fw2 5'-GCTATACACTACACCTCTGAC-3'

Rev1 5'-TGAACCAACGCGTTACCCAC-3'

Rev2 5'-CCGGGTAAAGTGGCATTGTC-3'

4.5.2. PCR продукти на гена *Cyt b*

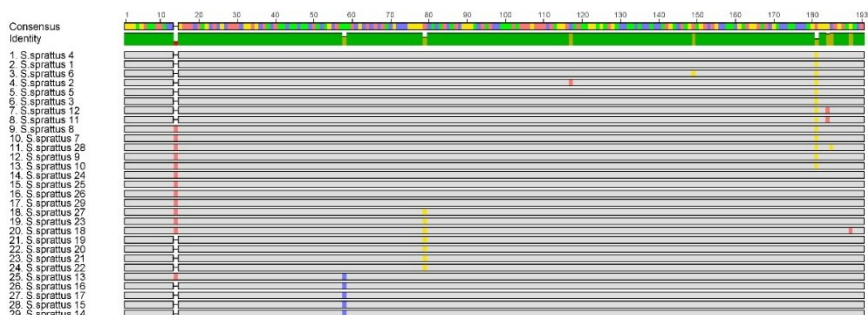
Амплифицираните PCR продукти се визуализираха като размерът на ампликоните съответстваше на очаквания – 350 bp (фиг. 12).



Фигура 12. PCR продукти от амплификацията на гена *Cyt b* в *S. sprattus*; маркер 1kb Plus DNA Ladder New England Biolabs N3200S

4.5.3. Алайнмънт на секвенциите на гена *Cyt b*

Множественият алайнмънт на секвенциите беше извършен с програмата Geneious 4.8.5.



Фигура 13. Алайнмънт на секвенциите на гена Cyt b при род Sprattus

4.5.4. Единични нуклеотидни полиморфизми (SNP) на гена Cyt b

При 13 от образците беше установен нуклеотиден вариант от типа инсерция/делеция (indel) на позицията 14, потенциално водещ до изместване на рамката на четене. Тази мутация вероятно е грешка при секвенирането. Полиморфизмите на позиции: 58 (C/T), 79 (G/A), 181 (G/A), 184 (A/G), след *in silico* транслация бяха определени като тихи мутации, при които кодоните съответно за изолевцин, глицин, триптофан и аланин се заменят със синонимни кодони.

Таблица 6. Позиции на SNPs на гена Cyt b при род Sprattus

Позиция SNP	14	58	79	181	184
Първа група (от 1 до 12 и 28) 7, 8, 9, 10, 28	– A/–	T	A	G/A	A/G 11,12
Втора група (24, 25, 26, 29)	A/–	T	A	A	G
Трета група (от 18 до 23 и 27)	–	T	G/A	A	G
Четвърта група (от 13 до 17)	–	C/T	A	A	G

4.5.5. Кладограма на гена Cyt b

Кладограмата за вида *S. sprattus* конструирана въз основа на гена Cyt b, показва следното:

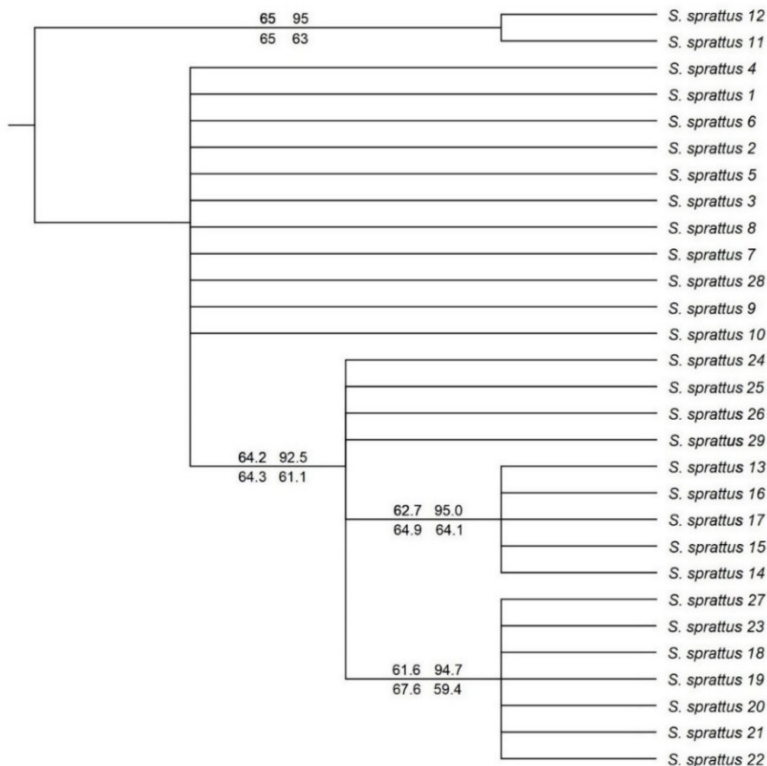
– Метод на максимална пестеливост (MP), Fitch резултат от 8 (индекс на съвпадение = 1.000; индекс на задържане = 1.000). Всички изследвани позиции бяха от типа „unrod“, делециите бяха обработ-

вани като липсващи позиции. 8 позиции, показващи изменчивост, бяха определени като неинформативни, броят на информативните позиции беше изчислен на 4.

– Метод на Баезиева статистика (BI) даде интервал на log-likelihood стойността [–348; –334].

– Метод на групиране по съседство (NJ) обедини изследваните секвенции от трикона в четири клъстера.

– Метод на максимално подобие (ML) чрез програма PhyML създаде кладограма с log-likelihood резултат от –323 и composite log-likelihood от –7739. Всички възли имат много висока статистическа достоверност. Изчислената пестеливост е 8 – идентична на тази чрез RAUP 4.0a.



Фигура 14. Кладограма на гена Cyt b при род *Sprattus*. Стойностите за MP са показани (горе вляво); за BI (горе вдясно), за NJ (долу, вляво) и за ML (долу, вдясно)

4.6. Резултати от анализа на гена Cyt b при род *Sardina*

Определените по морфологични белези образци като *S. pilchardus* не се потвърдиха по молекулярни данни. Множественият алайнмънт доказва, че те са от друг таксон – *Sardinella aurita* (фиг. 8). Това е причината изготвените за род *Sardina* праймери да не осъществят амплификация. Праймерите Fw1 и Rev2 имат по пет нуклеотидни несъответствия, Fw2 и Rev1 съответно по четири и шест несъответствия с анотирана секвенция за *S. aurita* (Дисертационен труд, Приложение 1, фиг. 2).

4.7. Резултати от анализа на спейсера ITS1 в представители от род *Alosa*, *Sprattus*, *Sardina*

4.7.1. Конструирани праймери

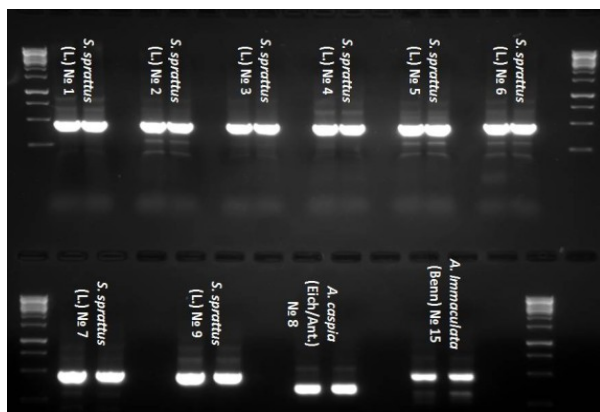
Изследваните за спейсера ITS1 – общо 22 образци, бяха морфологично разпределени в четири вида – *A. immaculata* (7 бр.); *A. caspia* (2 бр.); *S. sprattus* (11 бр.) и *S. pilchardus* (2 бр.) (Дисертационен труд, Приложение 1, табл. 5). Използваните в изследването праймери са следните:

Fw 5'-GTGGTGCATGGCCGTTCTTA-3'

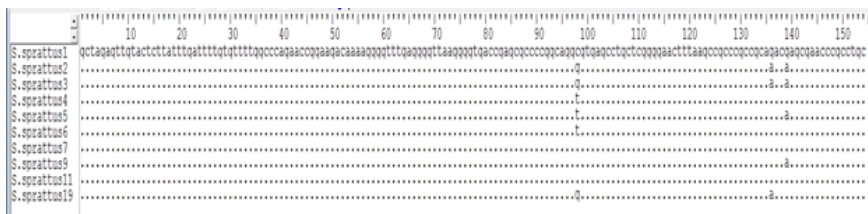
Rev 5'-GCTGCGTTCTTCATCGACGC-3'

4.7.2. PCR продукти и клониране във вектори

Амплифицираните PCR продукти за ITS1 бяха с очакван размер (около 300 bp). След изолиране от гела, последва клониране в pDrive вектори.

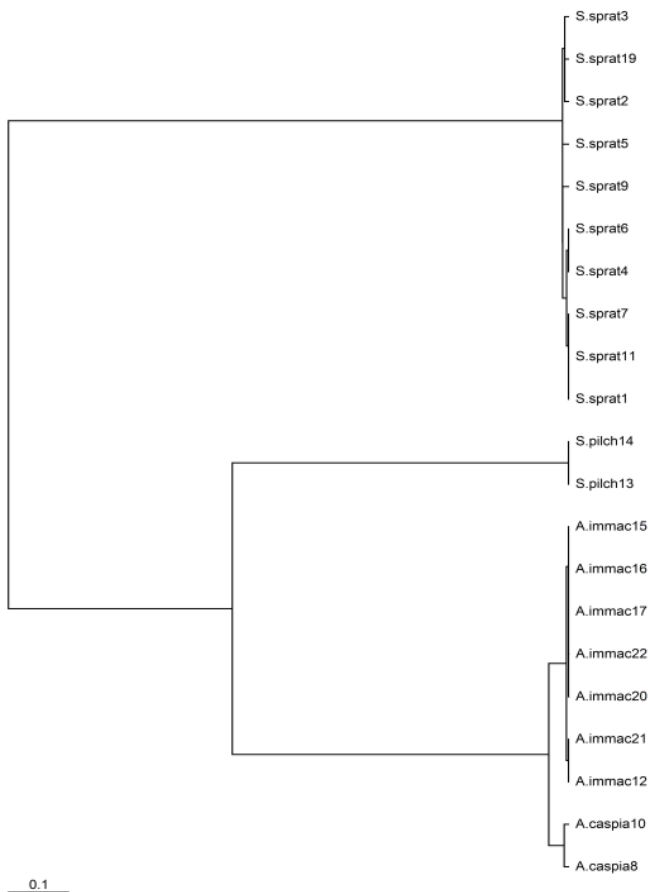


Фигура 15. PCR продукти за спейсера ITS1



Фигура 17. Позиции на SNP в спейсера ITS1 при *S. sprattus*

4.7.5. Кладограма на ITS1 последователностите



Фигура 18. Кладограма основана на различията в ITS1

5. Обсъждане

5.1. Последователности на гена NADH1 при род *Alosa*

От извършения биоинформатичен анализ се установиха три различни групи в род *Alosa* – *A. immaculata*, *A. caspia*, *A. species*. Всяка група се различава от останалите по специфичен набор от SNP и морфологични белези. В настоящото проучване имаше екземпляри, които бяха морфологично определени като един таксон, но молекулярните данни не потвърдиха това. От общо 48 изследвани екземпляра, 13 показва несъответствия между морфологични и молекулярни характеристики. Това кореспондира с резултатите получени от редица автори в различни изследвания с представители на рода (Bani et al., 2019; Chiesa et al., 2016; Vernigora, 2020). Първа група се състои от 24 индивида от вида *A. caspia* (Acc. No PP391086 – PP391107, PP421163, PP421164), която притежава полиморфизми на три – позиции: 438 C/T, 519 T/C и 756 – G/A (табл. 3). В групата се разграничават три подгрупи: образците от първа и трета подгрупа бяха уловени по централното и южното Черноморие, а тези от втора – само по централното.

Втора група се състои от 21 индивида от вида *A. immaculata* (Acc. No PP391108 – PP391127, PP421162) с SNP на три позиции – 370 G/A, на 439 T/C и на 520 C/T (табл. 3). Отново има три подгрупи и в тази група. Образец *A. immaculata*. №44 от Созопол (Acc. No PP391126) силно се различава и въпреки това определено принадлежи към клона на *A. immaculata*. Образец *A. immaculata*. №45 от н. Емине наподобява едновременно *A. immaculata* и *A. caspia*.

Трета група образува съвсем отделен клон. Състои се от три образци уловени от района на Бяла и Несебър (*A. sp.* 1, *A. sp.* 2, *A. sp.* 3 Acc. No PP391128 – PP391130). Представителите на групата имат полиморфизми на 13 позиции (табл. 3). Не бяха намерени анотирани последователности за NADH1 за вида *A. tanaica* в базата данни на NCBI. За по-коректно тези образци ги означихме като *A. sp.* Предполагаме, че е възможно да са от вида *A. tanaica*, който се среща в останалите черноморски държави, но не и в България (Yankova et al. 2014). Това би било заемане на нова локация за представителите му. Друга вероятност е, тези индивиди да представляват нов таксон или полиморфизъм на предците, или дори вътревидова хибридизация на неизследвани таксони от Черно море и следователно да отразяват друга мтДНК линия (Faria et al., 2006). Няма достатъчно данни за потвърждаване на тяхната видова принадлежност. Сравняването на последователностите им с анотирани в базата данни на NCBI установи 99% сходство с видовете *A. fallax* и *A. immaculata*.

5.2. Последователности на гена NADH1 при род *Sprattus*

По биоинформатични данни се оформиха четири групи различаващи се една от друга по набор от полиморфизми. Първа група е от девет екземпляра (от 1 до 9) притежаващи само едно SNP – транзиция на позицията 123 G/A. Втора група е от шест образци (от 10 до 15). В рамките на групата се оформиха две подгрупи – едната (11, 12, 13, 14), с транзиция на позицията 562 A/G, а другата е на позицията 715 G/A. Трета (от 16 до 19) и четвърта група (от 20 до 23) са също с нуклеотидни вариации. Четири SNP бяха отчетени в трета група: на позиции 135 и 781 G/A и трансверзия C/G на позиции 150 и 682. В четвърта група на позиции 427 и 697 е замяна G/A, а на позицията 631 A/G (табл. 4). Увеличеното риболовно усилие е влошило биологичния статус на популацията на *S. sprattus* в Черно море. Прекомерният улов на трициона предполага разделяне на общите рибни запаси на отделни единични. Това противоречи на концепцията за единна популация на черноморската трициона (Zuev et al., 2018). Установена е тясна отрицателна корелация между свързулова и малката средна дължина и ниската средна възраст на *S. sprattus* в Черно море, което води до вътревидова диференциация и набор от зарибителни единици (Zuev, 2019; Zuev et al., 2022). Популационната структура на триционата пред българското крайбрежие е била проучвана в рамките на многогодишен мониторинг (1973-1998 г.), който установи наличие на две механично смесени популации, които са добре изолирани – едната от Черно море, а другата най-вероятно е имигрант от Средиземно море. В черноморската популация е открита и субпопулация (Доброволов и Иванова, 1999).

5.3. Последователности на гена NADH1 при род *Sardina*

В хода на настоящото изследване молекулярните резултати влязоха в противоречие с морфологичната идентификация на образците. От десет екземпляра, морфологично определени като *S. pilchardus*, успешна амплификация беше постигната само при четири. Вероятна причина за неуспеха при останалите шест е неефективна хибридизация на използваните универсални праймери за род *Alosa*, *Sprattus* и *Sardina*. Един от успешно амплифицираните образци (*Sardinella pilchardus* 1, от района на Варвара) при подравняването показва най-голямо сходство с вида *A. immaculata* (Дисертационен труд, Приложение 1, фиг. 2). Останалите три екземпляра (*S. pilchardus* 2, 3 и 4; уловени в Бургаския залив) съвпаднаха напълно с референтна секвенция на *Sardinella aurita* (фиг. 8). В последното десетилетие се отчита разширяване на ареала на север на този термофилен вид. Вероятна причина за това са климатичните

промени (Sabatés et al., 2006; Tsikliras, 2008). Поради морфологична близост, двата вида често се бъркат, което затруднява научни, екологични и търговски оценки. Молекулярната идентификация, включително иновативни ДНК-базирани методи (Kakarelidou et al., 2024), е от съществено значение за точното им разграничаване. Настоящото изследване демонстрира подобен случай на погрешно морфологично определение на *S. pilchardus*, доказан молекулярно като *S. aurita*.

5.4. Последователности на гена Cyt b при род *Alosa*

Биоинформатичният анализ показва наличие на три различни групи в род *Alosa* – *A. immaculata*, *A. caspia*, *A. species*. Първа група е съставена от 61 образци от вида *A. immaculata*. Втора група е от 34 образци от вида *A. caspia* с полиморфизми на следните позиции: на позиция 44 С/Т, на позиция 86 част от представителите на групата (от 15 до 34) съдържат С точно като видовете от *A. immaculata* (табл. 5, фиг. 10). Останалите *A. caspia* (от 1 до 14) – Т/С. Молекулярните различия между двата вида са твърде малки 0,8% (Faria et al., 2006), което обяснява трудностите при морфологичното идентифициране. Трета група е съставена от пет образци означени като *A. species* (от Обзор, н. Емине и Дуранкулак) с най-много полиморфизми. На позиции 27, 49, 160 и 208 замяна С/Т. На позиции 40 и 136 Т/С (табл. 5). Биоинформатичният анализ потвърди наличието на три ясно разграничими групи в рамките на род *Alosa*, в съответствие с морфологичната идентификация. Молекулярните различия вероятно отразяват еволюционна изолация, свързана с географски и екологични фактори. Подобна структура е наблюдавана и в други райони (Orlova et al., 2024), което предполага микроеволюционна динамика.

5.5. Последователности на гена Cyt b при род *Sprattus*

Биоинформатичният анализ показва формиране на четири отделни групи при *S. sprattus* въз основа на двата изследвани гена (Cyt b и NADH1), въпреки че, митохондриалният ген Cyt b е по-консервативен от NADH1 (Chapman et al., 1994). Първа група включва общо 13 образци уловени от Варна, Несебър, Созопол, Приморско и Царево. Всички те имат на позиция 181 G/A. Образци 11 и 12 (съответно от Бяла и Кранево) притежават още една замяна на позиция 184 A/G. Те може да се разглеждат като външна група. Втора група включва четири образци (24, 25, 26, 29) от Варна, Кранево и Приморско, при които има една нуклеотидна замяна – на позиция 14 (A/–). Сравнението с референтната секвенция на гена Cyt b при *S. sprattus* (NC_009593.1) от базата данни NCBI показва, че

адениновият нуклеотид на позиция 14 представлява инсерция, която липсва в референтната последователност. Наличието ѝ е необичайно, тъй като води до изместване на рамката на четене (frameshift). Приемаме, че тази мутация е грешка при секвенирането. Трета група е съставена от седем образци (18, 19, 20, 21, 22, 23, 27) уловени от Варна, Несебър, Созопол, Приморско и Царево със замяна на позиция 79 G/A. Последната, четвърта група (от 13 до 17) включва образци от Бяла, Варна, Кранево и Приморско и се характеризира с нуклеотидна вариация на позиция 58 (C/T).

5.6. Последователности на гена Cyt b при род *Sardina*

Не беше установена амплификация на гена Cyt b при десетте образца, морфологично определени като *S. pilchardus*, поради използване на праймери, неспецифични за род *Sardinella*. Четирите праймерни комбинации, разработени за род *Sardina*, показаха от четири до шест нуклеотидни несъответствия спрямо референтна секвенция на *S. aurita* (Дисертационен труд, Приложение 1, фиг.2). Изследване на Leonardo et al. (2015) подчертава, че специфичността на праймерите е критична за успешната амплификация и идентификация на близкородствени видове като сардина и сардинела от семейство Clupeidae. В бъдещи изследвания ще бъдат конструирани нови праймери, базирани на анотирани секвенции на гена Cyt b при *S. aurita*, с цел повторен анализ.

5.7. Последователности на ITS1 спейсера при представители на род *Alosa*, *Sardina* и *Sprattus*

Резултатите от анализа на спейсера ITS1 (фиг. 18) показаха ясно разграничаване на образците по родова и видова принадлежност. Седемте екземпляра от *A. immaculata* (от Каварна, н. Калиакра и р. Камчия), образуват хомогенна група с високо сходство (~100%), което предполага принадлежност към една популация. Двата екземпляра от *S. pilchardus* (от н. Калиакра) не показват полиморфизми и вероятно също са от една популация. *A. caspia* и *A. immaculata* формират общ филогенетичен клъстер, но с ясно разграничени видове. Единадесетте образца от *S. sprattus* се групират в две подгрупи – от южната част на Черно море (Созопол, Приморско) и от северната (Варна, Варненско езеро), което предполага наличието на поне две генетично различни популации в българската акватория. Подобно разделение е докладвано и от Доброволов и Иванова (1999). ITS1 се утвърждава като ефективен молекулен маркер за филогенетичен и популационен анализ при представители на семейство Clupeidae (Keskin & Atar, 2013; Palomba et al., 2022). Той поз-

волява както видова идентификация, така и оценка на генетичната структура на популации в различни географски райони.

5.8. Обсъждане на обобщените данни от филогенетичните изследвания на родове *Alosa* и *Sprattus*

Това е първото изследване, разглеждащо молекулярната филогене-неза на представителите на семейство Clupeidae в българската акватория на Черно море. Подобно на Faria et al. (2006), така и настоящото проучване потвърждава, че род *Alosa* е добре обособена филогенетична група. Видовете *A. immaculata* и *A. caspia* образуват близкородствени клъстери, независимо от използвания молекулярен маркер (NADH1, Cyt b, ITS1). Кладограмите съвпадат с морфологичното групиране, което доказва реални родствени връзки между образците.

Филогенетичните анализи показаха, че *S. sprattus* в Черно море не е хомогенна популация, а съвкупност от генетични линии с частично припокриващи се ареали. Сравнителният анализ по маркерите NADH1, Cyt b и ITS1 подкрепя значителното припокриване между отделните групи. Canales-Aguirre et al. (2021) потвърждават полифилетичния произход на род *Sprattus* чрез анализ на пет митохондриални гени. Видът *S. sprattus* се оказва по-близък до представители на род *Clupea*, отколкото до останалите видове от род *Sprattus*. Обособяват се две ясно разграничени групи, съответстващи на разпределението на видовете във всяко полукълбо. Ilhan et al. (2023) установяват значителна хаплотипна разнообразност при черноморските популации на *S. sprattus*, като COX1 показва висока вариабилност (14 хаплотипа), а 16S rRNA – значително по-ниска (3 хаплотипа). Това потвърждава по-голямата информативност на бързо еволюиращите митохондриални гени за вътревидова диференциация. Авторите свързват различията в хаплотипната структура както с исторически колонизационни процеси, така и със съвременни фактори като ограничен генен поток и локални адаптации. Те подчертават значението на миграционните коридори през Босфора за генетичната вариабилност в Черно море. Въпреки отсъствието на очевидни бариери в морската среда, за рибите е доказано, че дори малки географски разстояния могат да ограничат генното течение (Limborg et al., 2012), а бреговата линия на Черно море създава такива прегради.

6. Заключение

Настоящото изследване разкри генетичното разнообразие на представители на семейство Clupeidae в българската акватория на Черно море чрез анализ на два митохондриални гени (Cyt b, NADH1) и спейсерът ITS1. Получените кладограми (по четири различни метода) обективно отразяват реалните родствени връзки между изследваните образци. Филогенетичните анализи показаха висока достоверност и съответствие между молекулярните и морфологичните данни. Те потвърдиха близкото родство между *A. immaculata* и *A. caspia*, както и наличието на обособени локални популации при род Sprattus. Резултатите доказват ефективността на използваните маркери и поставят основа за бъдещи генетични и консервационни стратегии за опазване на видовете.

7. Изводи

1. Запазената морфология на уловените 155 образци на семейство Clupeidae от българската акватория на Черно море позволи първоначалното определяне на видовата им принадлежност въз основа на съществуващите определителни таблици.
2. Секвенциите на използваните молекулярни маркери (NADH1, Cyt b, ITS1) позволиха идентифицирането на изследваните представители на семейство Clupeidae. Молекулярната идентификация потвърди с малки изключения видовата принадлежност на образците, определена по морфологични белези.
3. Ясна генетична диференциация между видовете *Alosa immaculata* и *Alosa caspia*. Групирането на образците в кладограмите съответства на тяхната принадлежност, определена по морфологични характеристики.
4. Молекулярните маркери при род Sprattus показаха генетичното разнообразие на рода, което предполага наличие на локални популации, вероятно изолирани по географски или екологични признаци.
5. Конструираните кладограми, построени по четири независими метода (максимална пестеливост, Баезиева статистика, групиране по съседство и максимално подобие), до голяма степен съвпадат, което потвърждава надеждността на получените топологии.

8. Приноси

1. Настоящият дисертационен труд е първото изследване, което предоставя молекулярни данни и филогенетични връзки на митохондриалните гени NADH1 и Cyt b и вътрешния транскрибиран спейсер ITS1 при представители на семейство Clupeidae от българската акватория на Черно море.
2. Установени и анотирани са 48 нови последователности на гена NADH1 при представители на род Alosa, които са депозиранни в базата данни NCBI, като по този начин се допринася към глобалния генетичен ресурс за този род.
3. Създадена е колекция от 155 ДНК проби на представители на родове Alosa, Sprattus и Sardinella, което предоставя възможност за бъдещи проучвания.
4. Конструиран е набор от ген-специфични праймери, който позволява амплификацията на пълната секвенция на гена NADH1 (от позиция 1 до 975 bp), както и на фрагменти от гена Cyt b (350 bp) и спейсера ITS1 (300 bp) при изследваните видове.
5. Приложена е методика за конструиране на кладограми, посредством методите на максимална пестеливост, Баезиева статистика, групиране по съседство и максимално подобие.
6. Настоящото изследване спомага за изясняване на молекулярната таксономия на семейство Clupeidae в Черно море и може да послужи като основа за бъдещи популационно-генетични и консервационни проучвания.

9. Публикации

1. **Boyadzhieva-Doychinova D**, F. Tserkova, M. Gevezova, D. Klisarova, I. Denev (2012). Application of Variability in ITS1 Sequences for Studying Biodiversity of Black Sea Clupeid Fishes (Pisces: Clupeidae) Acta Zoologica Bulgarica, 4, 95-102; 2012 (IF₂₀₁₂ 0.4)
2. **Boyadzhieva-Doychinova D**, F. Tserkova & Iliya Denev † (2020). Molecular Taxonomy Study of the Genus Alosa H. F. Linck, 1790 (Actinopterygii: Clupeidae) along Bulgarian Black Sea Coast Based on Cytochrome b Sequences Acta Zoologica Bulgarica, 15, 21-25; 2020 (IF₂₀₂₀ 0.448)
3. **Boyadzhieva-DoychinovaD**, D. Minchev, B. Georgieva, A. Arnaudov, I. Denev† & M. Naydenov (2024). Molecular Analysis of Shad Species (Pisces: Clupeidae) from Bulgarian Black Sea Waters Acta Zoologica Bulgarica, 20, 7-14; 2024 (IF₂₀₂₄ 0.4)