

МЕДВЕДЕВ

Дмитрий Александрович

**МОЛЕКУЛЯРНАЯ ФИЛОГЕНИЯ И АНАЛИЗ
ТАКСОНОМИЧЕСКИХ ОТНОШЕНИЙ БЫЧКОВЫХ РЫБ
(GOBIIDAE) ЧЕРНОМОРСКО-КАСПИЙСКОГО БАССЕЙНА**

03.02.06 – ихтиология

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

МОСКВА - 2013

Работа выполнена в Лаборатории экологии низших позвоночных Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова Российской академии наук

Научный руководитель: Доктор биологических наук
Виктор Павлович Васильев

Официальные оппоненты: **Сергей Афанасьевич Евсеенко**
доктор биологических наук, заведующий
Лабораторией океанической ихтиофауны
Федерального государственного бюджетного
учреждения науки Института океанологии
Российской академии наук

Николай Сергеевич Мюге
кандидат биологических наук, заведующий
Лабораторией популяционной биологии
Всероссийского научно-исследовательского
института рыбного хозяйства и океанографии

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетного
учреждение науки Институт общей генетики
им. Н.И. Вавилова Российской академии наук

Защита состоится 25 декабря 2013 г. в 10 час. на заседании диссертационного совета Д 002.213.02 при Федеральном государственном учреждении науки Институте проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова РАН по адресу: 119071, Москва, Ленинский проспект, д. 33., тел./факс 8(495)9523584, email: zashita@sevin.ru.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ОБН РАН по адресу: 119071, Москва, Ленинский проспект, д. 33.

Автореферат разослан 22 ноября 2013 года.

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат биологических наук

Е.А. Кацман

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность. Рыбы, принадлежащие к семейству Gobiidae одна из наиболее сложных групп Понто-Каспийского региона. Всего в бассейне обитает около 50 видов, большая часть которых является эндемиками. Систематика черноморско-каспийских бычков является объектом продолжительных дискуссий. Не решенными остаются вопросы, касающиеся таксономической структурированности представителей семейства на уровне рода и филогенетических связей между этими родами. Продолжается также дискуссия в отношении таксономической самостоятельности отдельных популяций широко распространенных в Черноморско-Каспийском бассейне видов. Применение генетических методов, по мнению многих исследователей, способно решить большинство имеющихся проблем.

Геологическая история Понто-Каспийского региона богата событиями, которые не могли не отразиться на эволюции гидробионтов. К ним можно отнести разделение и последующее неоднократное возникновение связей между бассейнами Каспия и Черного моря, за время их существования, кроме того влияние оказали значительные изменения, происходившие во время чередования ледниковых и межледниковых периодов.

Оценка влияния последовательных геоморфологических преобразований на гидробионтов Понто-Каспийского региона послужило целью многих филогеографических работ (Audzijonyte et al., 2006, 2008; Cristescu et al., 2003; Glembiuk et al., 2006 и др.). Было показано, что наиболее полную картину дает изучение групп родственных видов, имеющих сходную биологию. Такие работы были проведены в отношении ряда групп беспозвоночных. Среди позвоночных наиболее перспективно изучение распределения генетических линий широко распространенных в регионе видов семейства Gobiidae.

Цель исследования. Выявление филогенетических связей бычков Черноморско-Каспийского бассейна на основе изменчивости митохондриального гена цитохрома *b* и реконструкция эволюционной истории этой группы.

В работе решались следующие задачи.

- реконструкция филогенетических связей черноморско-каспийских представителей сем. Gobiidae
- анализ филогеографической структуры широко распространенных видов
- анализ особенностей молекулярно-генетического разнообразия в связи с исторической геоморфологией региона

- решение некоторых таксономических проблем: популяционно-видовой структуры широко распространенных видов, таксономической структуры некоторых родов и родовой структуры семейства Gobiidae Понто-Каспия.

Научная новизна работы. Изучена изменчивость митохондриального гена цитохрома *b*, позволившая проанализировать филогенетические связи черноморско-каспийских бычков и представить новую оригинальную таксономическую концепцию, имеющую в своей основе наиболее полный объем имеющихся в настоящее время данных.

На основе оригинальных данных была проанализирована филогеографическая структура наиболее широко распространенных видов и групп близких видов. Для *N. syrman* анализ филогеографической структуры был представлен впервые. Сопоставление филогеографических паттернов позволило выявить общие черты в характере дивергенции различных видов и их связь с палеогеографической историей Понто-Каспийского региона.

В ходе работы была впервые обнаружена генетическая линия каспийских бычков, относящихся к подроду *Pontiloa*, и отличающаяся морфологически от всех изученных ранее видов этого региона.

Теоретическое и практическое значение. Понто-Каспийский регион, чья историческая геоморфология хорошо документирована, предоставляет хорошие возможности в отношении познания генезиса его фауны и анализа формирования генетического разнообразия обитающих здесь видов. Представители семейства Gobiidae являются основным элементом ихтиофауны этого региона, а некоторые из них имеют важное промысловое значение.

Результаты работы вносят вклад в исследование формирования генетического разнообразия различных групп животных Понто-Каспийского региона, фауна которого включает значительное число эндемичных видов. Изучение генетической дифференциации популяций, видов и отдельных групп бычковых рыб Черноморско-Каспийского бассейна из различных изолятов, наложение молекулярно-генетических данных на карты исторической геоморфологии и анализ полученных результатов представляет несомненный общебиологический интерес. Результаты анализа данных по изменчивости гена цитохрома *b* в контексте геоморфологических преобразований рассматриваемого региона позволило подтвердить некоторые гипотезы, выдвигавшиеся в отношении широко распространенных видов бычков. Прежде всего, в этом заключается теоретическая значимость настоящей работы.

Практическое значение диссертации обусловлено в первую очередь тем, что некоторые виды бычков имеют хозяйственное значение как объекты рыболовства. Рациональная эксплуатация таких групп видов предполагает знания их таксономической и популяционной структуры. Кроме этого

некоторые виды черноморско-каспийских бычков проявили способность к активной колонизации и распространились в водоемах западной Европы и Северной Америки. Изучение филогеографической структуры таких видов может не только способствовать выявлению источников инвазии, но и позволяет выявлять виды, обладающие потенциальной способностью к активному расширению своего ареала. Изучение генетического разнообразия гидробионтов Понто-Каспия имеет большое природоохранное значение для сохранения биологического разнообразия этого региона, и могут найти применение в природоохранных программах.

Апробация работы. Основные положения работы были представлены на научной конференции: «Молекулярно-генетические подходы в таксономии и экологии» (Ростов-на-Дону, 2013), Всероссийской конференции молодых ученых: «Биоразнообразие: глобальные и региональные процессы» (Улан-Удэ, 2013) и Международных научных конференциях: «Популяционная генетика: современное состояние и перспективы» (Москва 2011), World Conference on Marine Biodiversity (Aberdeen, Scotland, 2011), «Эктотермные позвоночные Восточной Европы и сопредельных территорий: эволюционные, экологические и природоохранные аспекты» (Тамбов, 2013).

Положения, выносимые на защиту:

1. Митохондриальный ген цитохрома *b* является эффективным молекулярным маркером при решении проблем, связанных с систематикой и филогенией черноморско-каспийских рыб семейства Gobiidae на родовом, видовом и популяционном уровнях.

2. Группа эндемичных сарматских бычков имеет монофилетическое происхождение и включает в себя ряд близких родов: *Benthophilus*; *Caspiosoma*; *Mesogobius*; *Neogobius* sensu Берг, 1949; *Proterorhinus*.

3. Род *Neogobius* sensu Берг имеет парафилетическое происхождение объединяя две филетические линии *Ponticola* (*N. constructor*, *N. cephalargoides*, *N. ratan*, *N. cyrius*, *N. eurycephalus*, *N. gorlap*, *N. platyrostris*, *N. kessleri*, *N. syrman*, *N. rhodioni*, *N. gymnotrachelus*) и собственно *Neogobius* (*N. melanostomus*, *N. fluviatilis*, *N. caspius*). Это может свидетельствовать о таксономической неоднородности р. *Neogobius*.

4. Генетическая близость бычка травяника (*Gobius ophiocephalus*) к другим представителям р. *Gobius* не дает оснований для его выделения в самостоятельный род (р. *Zosterisessor*).

5. Популяции широко распространенных видов, населяющие различные изоляты Понто-Каспийского региона, имеют заметные, а в ряде случаев существенные, различия в структуре гена цитохрома *b*.

6. Изменение палеоэкологических условий Понто-Каспийского региона в позднем плиоцене-голоцене привело к формированию близких филогенетических линий, имеющих различные экологические предпочтения.

7. Обнаруженные генетические различия между изолированными популяциями близких видов в ряде случаев являются значимыми, согласуются с имеющимися таксономическими гипотезами и могут быть отражены в систематике черноморско-каспийских бычков.

Публикации результатов работы. По теме диссертации опубликовано 7 научных работ, из них 3 статьи в журналах, включенных в «Перечень ведущих рецензируемых журналов и изданий в которых должны быть опубликованы результаты диссертации на соискание научной степени доктора и кандидата наук».

Личный вклад автора. Автор принял непосредственное участие на всех этапах исследования, включая сбор материала с 2008 по 2011 гг.

Структура и объем диссертации. Диссертационная работа состоит из введения, 4 глав, выводов и списка литературы. Основное содержание работы изложено на 137 страницах печатного текста, иллюстрировано 29 рисунками и 18 таблицами. Список литературы содержит 227 цитируемых работ.

Благодарности. Автор считает своим долгом выразить искреннюю признательность научному руководителю д.б.н. В.П. Васильеву, а также д.б.н. Е.Д. Васильевой за предложенную тему, всестороннюю помощь, ценные советы и консультации в ходе написания данной работы.

Автор выражает сердечную благодарность д.б.н. М.В. Холодовой, к.б.н. П.А. Сорокину и всем сотрудникам кабинета методов молекулярной диагностики ИПЭЭ РАН за предоставленную возможность и помощь в проведении молекулярно-генетического анализа, ценные замечания и советы при обсуждении результатов работы; заведующему лабораторией экологии низших позвоночных ИПЭЭ РАН д.б.н. М.И. Шатуновскому за поддержку при выполнении работы.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Глава 1 ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

Первая глава включает в себя три раздела, в которых представлены основные предпосылки к решению поставленных нами задач, современные взгляды и дискуссионные проблемы.

1.1. Молекулярно-генетические методы в зоологических исследованиях. В разделе представлен обзор посвященный применению молекулярно-генетических методов в современных зоологических филогенетических исследованиях. Дана краткая характеристика некоторым наиболее распространенным молекулярно-генетическим маркерам. Особое внимание уделено использованию в качестве молекулярно-генетических маркеров кодирующих последовательностей ДНК. В разделе кратко описаны основные направления, в которых применяются эти методы.

1.2. Геологическая история Понто-Каспийского региона и ее влияние на гидробионтов. В разделе изложена периодизация геоморфологических событий, происходивших в истории Понто-Каспийского бассейна и отразившихся на его обитателях. Среди наиболее важных отмечено время разделения единого Сарматского моря на западный (Черноморский) и восточный (Каспийский) бассейны (около 5 млн. лет назад). Приведено время восстановления и существования связи между Черноморским водоемом и Каспийским в Плейстоцене (приблизительно 2,0 – 0,9 млн. лет назад) и время чередования ледниковых и межледниковых периодов на территории Среднерусской равнины в течение Плейстоцена и Голоцена (около 1,6 млн. лет 10000 назад) приводивших к резким колебаниям солености и фаз трансгрессии и регрессии бассейнов.

Кроме того описаны результаты исследований филогеографической структуры черноморско-каспийских видов беспозвоночных и позвоночных. Замеченные различия в уровне дивергенции и сопоставление их со временем появления генетических линий легло в основу трех зоогеографических гипотез, объясняющих полученные филогеографические картины.

1) Глубокие генетические различия являются следствием древней викариантной дивергенции, связанной с разделением Восточного Паратетиса на восточный – Каспийский и западный - Черноморский бассейны.

2) Сравнительно небольшие генетические различия могли возникнуть в результате недавнего расселения и последующей дивергенции.

3) Смешанный вариант, при котором недавнее расселение накладывается на уже существовавшую древнюю дивергенцию.

1.3. Современные представления о системе бычковых рыб бассейна Понто-Каспия. Раздел посвящен рассмотрению таксономических гипотез выдвигавшихся на разных этапах изучения черноморско-каспийских бычков. Внимание уделяется изменением взглядов исследователей по мере накопления данных, основным таксономическим проблемам и дискуссиям, возникавшим вокруг них. Рассмотренные таксономические проблемы можно объединить в две группы. 1) Проблемы связанные с филогенетической структурой черноморско-каспийских бычков, родственными связями между обособленными группами, местом черноморско-каспийских бычков в семействе Gobiidae. 2) Проблемы таксономического статуса обособленных

популяций. Одной из важнейших частей этого раздела является рассмотрение современных таксономических представлений, формирование которых было бы невозможно без применения молекулярно-генетических методов.

Глава 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.

В работе были использованы материалы по 15 видам бычковых рыб Черноморско-Каспийского бассейна, собранные с 2003 по 2012 гг. и представленные в коллекции Зоологического музея Московского государственного университета. В том числе были использованы собственные сборы, проводившиеся с 2008 по 2011 гг. в различных районах Черного и Каспийского бассейнов (рис. 1). Структура митохондриального гена цитохрома *b* изучена у 181 экз.

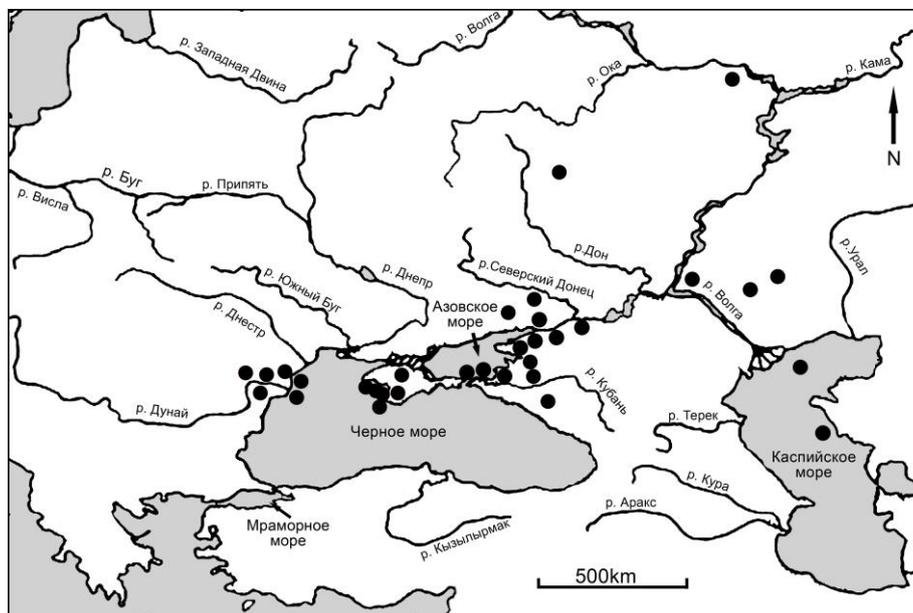


Рис. 1. Точки сбора материала в пределах бассейна Понто-Каспия

Выделение ДНК из изучавшихся образцов было проведено с использованием набора «DNA Diatom PREP» («Изоген», Россия). При амплификации полной последовательности митохондриального гена цитохрома *b* были использованы праймеры AJG15, H5 (Akihito et al., 2000).

AJG15 – CAA-AAA-CCA-TCG-TTG-TAA-TTC-AAC-T,

H5 – GAA-TTY-TRG-CTT-TGG-GAG

Для амплификации участка цитохрома *b* длиной 408 п.н., который использовали при предварительном анализе филогеографической структуры представителей рода *Proterorhinus* были использованы праймеры Glu, Cb2 (Kocher et al. 1989).

Glu-(L14724) TGA-TAT-GAA-AAA-CCA-TCG-TTG

Cb2-(H15174) CCC-TCA-GAA-TGA-TAT-TTG-TCC-TCA

Для секвенирования использовали автоматический генетический анализатор ABI 3500 (Applied Biosystems, USA).

Выравнивание последовательностей, подбор моделей молекулярной эволюции, построение филогенетических деревьев, расчет показателей генетического разнообразия и дистанций, оценка степени насыщения последовательностей нуклеотидными заменами и оценка селективной нейтральности нуклеотидных замен были проведены с использованием пакетов программ: BioEdit 7; DAMBE v.5.3.8; DnaSP v5; Modeltest 3.7; MEGA5; PhyML 2.4.4; MrBayes 3.1.2; Network 4.6.1.1

Глава 3 РЕЗУЛЬТАТЫ

У 181 изученных экземпляров бычков бассейна Понто-Каспия, принадлежащих 15 видам, выявлено 90 гаплотипов митохондриального гена цитохрома *b*, 16 из которых совпали с гаплотипами, ранее включенными в базу данных NCBI. Вместе с гаплотипами из базы NCBI для филогенетического анализа было использовано 364 гаплотипа (475 последовательностей). После выравнивания длина сравниваемых последовательностей составила 1098 п.н.

3.1. Реконструкция филогенетических связей черноморско-каспийских представителей семейства Gobiidae

Работе по реконструкции филогенетических связей предшествовала оценка эффекта насыщения. Данный анализ необходим, так как при насыщении последовательностей нуклеотидными заменами возможны искажения в филогенетических построениях.

Нами был рассчитан уровень насыщения для имеющегося набора данных и его критические значения для деревьев с ассиметричной топологией. Полученные данные показали, что наблюдаемый уровень насыщения в 2 – 4 раза ниже критических значений, а, следовательно, наблюдаемое насыщение не вносит искажения в наши филогенетические построения.

В результате анализа данных были построены филогенетические деревья методами максимального правдоподобия (ML), максимальной экономии (MP) и ближайшего соседа (NJ) объединенные на рис. 2. Топология каждого из них, независимо от метода и модели построения, показывает четкую обособленность представителей родов эндемичной сарматской группы, от бычков имеющих средиземноморское происхождение. На деревьях MP и NJ виды, распространенные в Средиземном море и Восточной Атлантике (роды *Knipowitschia*, *Pomatoschistus*, *Gobius* s. strict и бычок-травяник) оказались в одной кладе (рис. 2). Дерево, построенное методом максимального правдоподобия (ML), в отличие от двух других показало обособленность родов *Knipowitschia* и *Pomatoschistus* от других представителей средиземноморских бычков (рис. 2).

В отношении ветвей эндемичной сарматской клады топология филограмм

ML и NJ оказалась сходной, но отличающейся от MP филограммы положением подклады, включающей виды родов *Benthophilus* и *Caspiosoma* (рис. 2). На схемах ML и NJ филетическая группа бычков-пуголовок *Benthophilus* - *Caspiosoma* близка к подкладе, включающей роды *Proterorhinus*, *Mesogobius* и часть видов рода *Neogobius* s. lato, обозначенную на всех схемах как филетическая линия «Ponticola». MP-схема, напротив, демонстрирует близость подклады бычков-пуголовок к филогенетической группе *N. melanostomus* - *N. fluviatilis* - *N. caspius* (обозначена на филограммах как линия «Neogobius»). Эти различия топологий согласуются с относительно низкими значениями бутстрэп-поддержки образования подклады *Benthophilus-Caspiosoma*. На всех деревьях группа видов, рассматривавшаяся Бергом (1949) в качестве рода *Neogobius*, распадается на две обособленные филетические линии: «Ponticola» и «Neogobius» с высокими значениями бутстрэп-поддержки; при этом сестринская группа линии «Ponticola» на всех схемах формируется видами родов *Mesogobius* и *Proterorhinus* (рис. 2).

Видовой состав указанных филетических линий стабилен на всех полученных схемах (рис. 2). Линия «Ponticola» включает наибольшее число изученных видов: сюда вошли все представители подрода *Ponticola* в понимании Ильина (1927) и бычок-гонiec *Neogobius gymnotrachelus*, относимый им к монотипичному подроду *Babka*. Ближайшая к *Ponticola* филетическая линия включает виды рода *Proterorhinus* и бычка-мартовика *Mesogobius batrachocephalus*. В пределах подклады бычков-пуголовок на всех филогенетических схемах с высоким уровнем бутстрэп-поддержки от собственно пуголовок (род *Benthophilus*) отделяется линия *Caspiosoma*. В кладу *Neogobius* вошли виды, относимые ранее к трем подродам *Neogobius* s. lato: *Apollonia*, *Eichwaldiella*, *Neogobius*.

Наибольший уровень генетических дистанций в пределах клады, объединяющей бычков из Средиземноморья и Атлантики, обнаруживает бычок *Gobius niger* (табл. 1). На всех филогенетических схемах *G. niger* образует сестринскую группу по отношению к подкладе, объединяющей остальные виды рода *Gobius* s. stricto и бычка-травяника *G. ophiocephalus* (рис. 2); оценки генетических дистанций между всеми видами этой подклады достаточно сходны (табл. 1).

Таблица 1. Значения генетических дистанций были рассчитаны с использованием модели TN93 между видами рода *Gobius*, в программе MEGA 5.0 на основе 8 последовательностей гена цитохрома *b*

Виды	1	2	3	4
1 <i>G. ophiocephalus</i>				
2 <i>G. couchi</i>	0,186			
3 <i>G. fallax</i>	0,180	0,163		
4 <i>G. bucchichi</i>	0,161	0,178	0,182	
5 <i>G. niger</i>	0,248	0,232	0,242	0,218

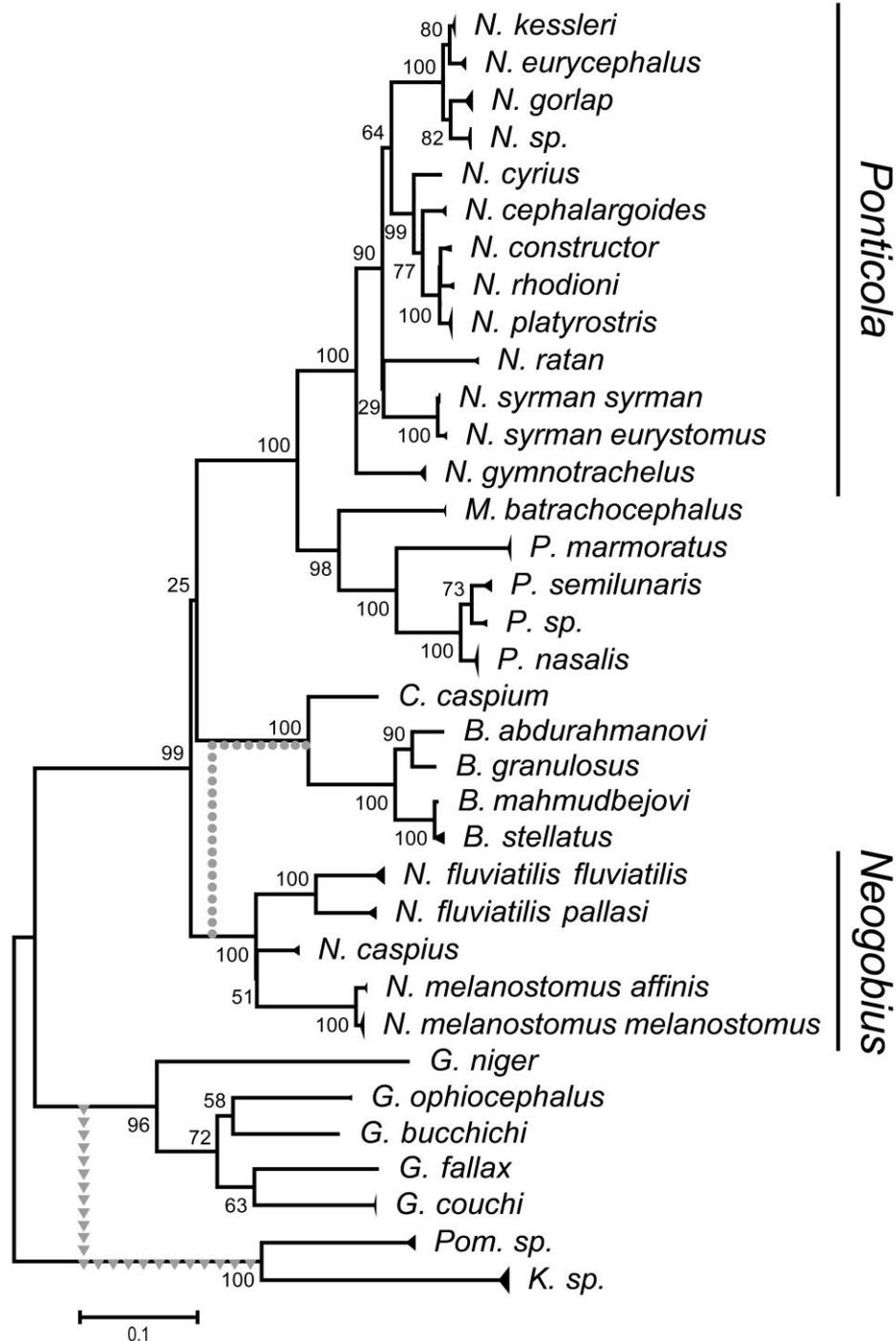


Рис. 2. Филогенетические отношения ряда видов бычков (сем. Gobiidae) Черноморско-Каспийского бассейна по данным анализа генетических дистанций рассчитанных по модели TN93+G в программе MEGA 5.0 методом максимального правдоподобия (ML) на основе гаплотипов цитохрома *b*, мтДНК (1098 п.н.). Индексы – бутстрэп-поддержка в % от 1000 реплик. Длина отрезка соответствует дистанции указанной под ним. Различия, наблюдаемые в топологии деревьев построенных различными методами обозначены серым. Положение клады (*Benthophilus-Caspiosoma*) на МР дереве показано кругами, клады (*Knipowitschia – Pomatoschistus*) на NJ и МР деревьях – треугольниками.

3.2. Филогеография бычков, широко распространенных в Черноморско-Каспийском бассейне.

Многие представители бычков, имеющих сарматское происхождение, широко распространены в пределах Черноморско-Каспийского бассейна. Некоторые исследователи выдвигали гипотезы о таксономической самостоятельности отдельных популяций. Работы по выявлению особенностей географического распределения генетических линий в пределах рассматриваемого региона проводились ранее и включали несколько наиболее многочисленных видов *N. fluviatilis*, *N. melanostomus*, *N. gymnotrachelus*, *P. marmoratus*. Нам удалось получить данные по ряду видов, не охваченных подобными исследованиями ранее, *N. eurycephalus*, *N. gorlap*, *N. kessleri*, *N. syrman*. В основе филогенетического анализа лежала изменчивость участка митохондриального гена цитохрома *b* длиной 1098 п.н. При помощи теста Таджimy (Tajima, 1989) проводилась оценка нейтральности происходящих эволюционных процессов в каждой популяции (генетической линии). Было показано, что во всех рассмотренных нами популяциях эволюция нуклеотидных последовательностей была нейтральной кроме популяции черноморского бычка цуцыка (табл. 2). Результаты анализа генетического разнообразия и средние внутригрупповые дистанции каждой популяции или филогенетической линии представлены в таблице 2.

N. fluviatilis. Полученные нами гаплотипы образуют две ветви, обособленные генетически и географически, представленные на филогенетическом дереве, построенном на основе собственных данных (рис. 3б). Уровень бутстреп-поддержки образования ветвей филогенетических деревьев, соответствующих черноморским и каспийским линиям, высок (рис. 2), вне зависимости от метода построения деревьев. При рассмотрении филогенетических деревьев и медианной сети гаплотипов (рис. 4б), полученных нами в результате филогенетического анализа, виден значительный уровень дивергенции между двумя линиями. Дистанция между линиями *N. fluviatilis* (9,4%) оказалась более чем в десять раз больше средних внутригрупповых дистанций (табл. 2).

N. melanostomus. Картина распределения генетических линий *N. melanostomus* аналогична картине полученной в отношении популяций бычка-песочника. Также как и у *N. fluviatilis* мы видим дифференциацию гаплотипов на две географически обособленные линии (рис. 3в). Одна, из которых включает гаплотипы из бассейна Черного моря, а вторая из Каспия. Образованные клады имеют высокий уровень бутстреп-поддержки (рис. 2). Уровень различий между линиями *N. melanostomus* значительно ниже, чем у *N. fluviatilis*, это наглядно продемонстрировано на филогенетических деревьях (рис. 3в) и медианных сетях гаплотипов (рис. 4в). Межгрупповые дистанции ($1,1\% \pm 0,3\%$) более чем в два с половиной раза превышает уровень внутригрупповых дистанций (0,4%).

N. syrman. Полученные филогенетическое дерево и медианная сеть гаплотипов, включающие все имеющиеся данные по гену цитохрома *b* *N.*

syрман (рис. 3д, 4д) продемонстрировали образование двух обособленных гаплогрупп с высоким уровнем бутстреп-поддержки. Одна из линий включала гаплотипы из Каспия, а вторая из Черноморского бассейна. Полученная картина дивергенции говорит о невысоком уровне расхождения между двумя популяциями. Дистанция TN93+G между 2 каспийскими образцами почти в 5 раз превышала среднюю внутригрупповую дистанцию черноморской популяции. Средняя межгрупповая дистанция (0,72%) оказалась в десять раз больше внутригрупповой дистанции бычков из Черного моря и только в два раза больше дистанции между каспийскими гаплотипами *N. syрман*.

Таблица 2. Генетическое разнообразие линий и результаты теста Таджимы на нейтральность, рассчитанные в программе DnaSP 5 (N - число последовательностей; S - число вариабельных сайтов; h - число гаплотипов; Hd - гаплотипическое разнообразие; π - нуклеотидное разнообразие; SD – стандартное отклонение; k - среднее число нуклеотидных различий; D - тест Таджимы на нейтральность). Средние внутригрупповые дистанции TN93+G линий и стандартная ошибка - SE, рассчитаны в программе MEGA5.

Наименование генетической линии	N	S	h	Hd±SD _{Hd}	π ±SD _{π} (%)	k	D	Средние внутригрупповые дистанции ± SE (%)
<i>N. f. fluviatilis</i>	11	17	4	0,673±0,123	0,636±0,112	6,982	0,909	0,9±0,14
<i>N. f. pallasi</i>	8	29	6	0,929±0,084	1,103±0,131	12,107	0,437	0,8±0,11
<i>N. m. melanostomus</i>	12	15	7	0,924±0,047	0,374±0,036	4,106	-0,744	0,4±0,07
<i>N. m. afinis</i>	7	2	2	0,286±0,196	0,052±0,036	0,571	-1,237	0,4±0,08
<i>N. s. syрман</i>	12	3	4	0,561±0,154	0,080±0,025	0,879	-0,379	0,08 ±0,05
<i>N. s. eurytomus</i>	2	4	2	1,000	0,364	4,000	–	0,37
<i>N. eurycephalus</i>	10	11	4	0,644±0,152	0,291±0,098	3,200	-0,793	0,29±0,09
<i>N. kessleri</i>	15	5	4	0,371±0,153	0,101±0,043	1,105	-0,950	0,1±0,05
<i>N. gorlap</i>	9	19	6	0,833±0,127	0,516±0,154	5,667	-0,929	0,52±0,12
<i>N. sp.</i>	11	17	9	0,964±0,051	0,384±0,046	4,218	-1,224	0,39±0,11
<i>P. sp.</i>	4	15	3	0,833±0,222	0,789±0,208	8,667	0,603	0,79±0,21
<i>P. semilunaris</i>	58	41	28	0,904±0,029	0,675±0,031	7,405	-0,680	0,67±0,15
<i>P. nasalis</i>	30	18	13	0,860±0,042	0,232±0,042	2,540	-1,519	0,27±0,08
<i>P. marmoratus</i>	82	35	28	0,807±0,039	0,142±0,020	1,554	-2,462	0,17±0,04

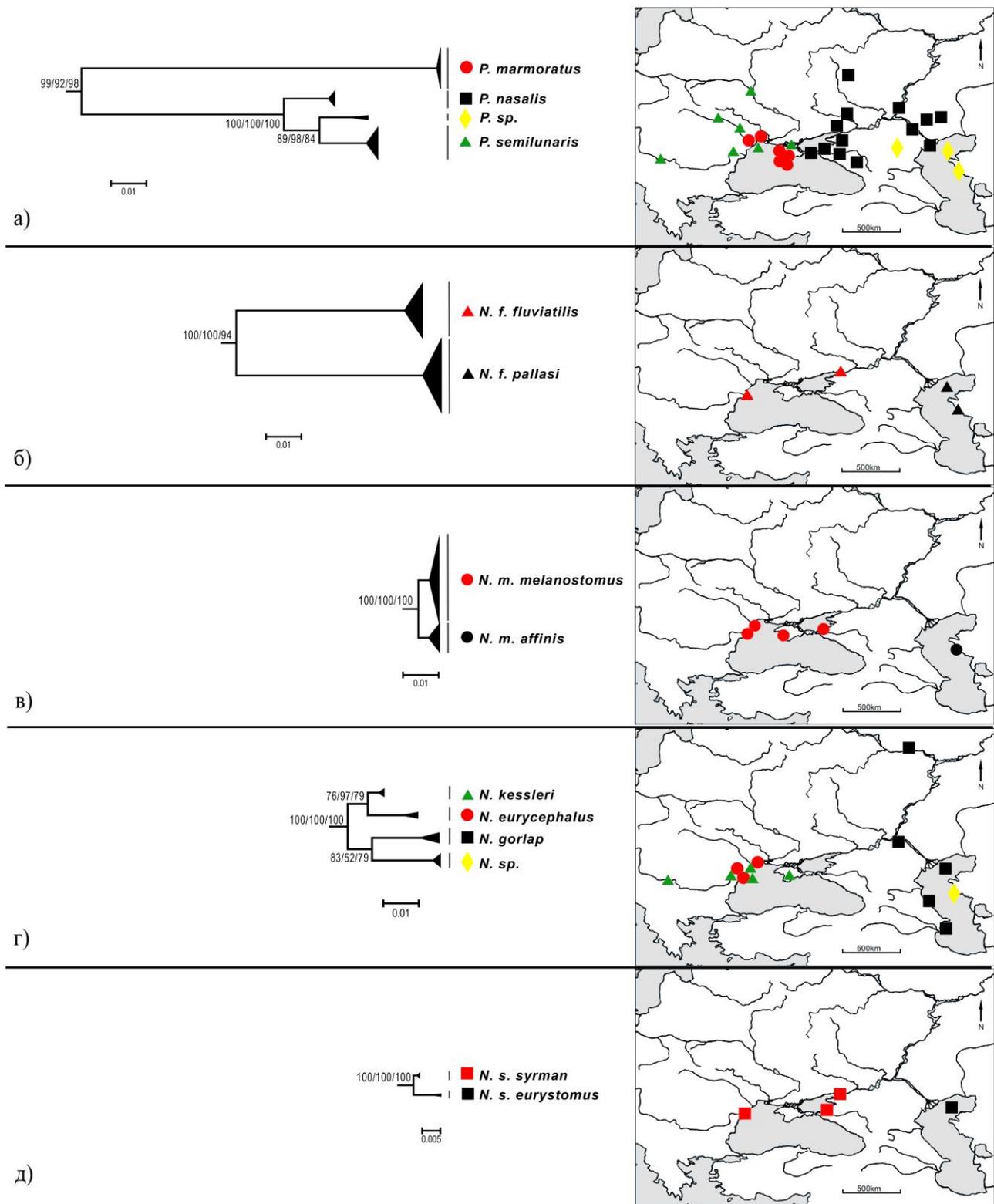


Рис. 3. Фрагменты филогенетического дерева (рис 2) и схемы пространственного распределения гаплотипов а) *Proherorhinus*, б) *N. fluviatilis*, в) *N. melanostomus*, г) *N. kessleri*, *N. eurycephalus*, *N. gorlap*, *N. sp.* д) *N. syrman*.

N. kessleri, *N. eurycephalus*, *N. gorlap*, *N. sp.* Результаты филогенетического анализа показали близость видов *N. gorlap*, *N. kessleri*, *N. eurycephalus* (рис. 2). Гаплотипы бычков пойманных в Каспийском море в районе г. Актау (Казахстан) образовали самостоятельную ветвь близкую к вышеперечисленным видам. Каждая из четырех рассматриваемых линий генетически обособлена. Наименьшая средняя внутригрупповая дистанция была обнаружена у *N. kessleri* (0,1%), наибольшая у *N. gorlap* (0,52%) (табл. 2). *N. kessleri* и *N. eurycephalus* образуют общую кладу, также как и *N. gorlap* с *N. sp.* поддержки ветвления каждой из этих двух клад на отдельные линии значительны, но не максимальны и требуют обсуждения. Образование клад *N. kessleri* - *N. eurycephalus* и *N. gorlap* - *N. sp.* имеет максимальное значение бутстреп-поддержки независимо от метода построения деревьев (рис. 3г). Наиболее близкими оказались *N. kessleri* и *N. eurycephalus*, генетическая дистанция между ними (0,0196) значительно больше средних внутригрупповых дистанций этих видов. Остальные межгрупповые дистанции сопоставимы и находятся в пределах 0,0353 – 0,0411. Медианная сеть гаплотипов демонстрирует иную картину (рис. 4г). Галогруппы *N. gorlap* и *N. sp.* обособлены друг от друга и приблизительно одинаково удалены от *N. kessleri* и *N. eurycephalus*, имеющих монофилетическое происхождение (рис. 3г). Бычки, относящиеся к линиям *N. gorlap* и *N. sp.* были собраны в пределах бассейна Каспийского моря, но в одних локалитетах не встречались. Рыбы, относящиеся к линиям *N. kessleri* и *N. eurycephalus* из Черного моря, напротив, были пойманы вместе в оз. Сасык и в р. Дунай у г. Измаил (рис. 3г).

Proterorhinus. Оценка изменчивости митохондриального гена цитохрома *b* бычка-цуцыка проводилась нами в два этапа. Первоначально мы проанализировали изменчивость небольшого участка длиной 408 п.н. у 45 особей (8 гаплотипов) из 15 точек, дополнив собственные данные последовательностями, представленными в базе данных NCBI. В качестве внешней группы для филогенетического анализа были использованы 2 гаплотипа *N. melanoctomus* из р. Черная, п-ов Крым. Увеличение длины последовательности маркера до 1098 п.н. и включение материала из ряда необследованных ранее точек позволило получить более полную информацию об изменчивости цитохрома *b* и пространственном распределении генетических линий. Вместе с данными из базы NCBI было проанализировано 174 последовательности, среди которых было выявлено 72 гаплотипа. Филогенетический анализ выявил одинаковую картину, как при использовании последовательности длиной 1098 п.н. так и при изучении участка длиной 408 п.н. Были обнаружены четыре генетически обособленные гаплогруппы (рис. 3а, 4а), две из них «*P. marmoratus*» и «*P. semilunaris*» найдены в водоемах северо-западной части Черноморского бассейна. Линия «*P. nasalis*» оказалась наиболее широко распространенной, гаплотипы принадлежащие этой линии были обнаружены в бессточных реках Большой и Малый Узень, бассейне р. Волга, бассейне Азовского моря, включая Керченский пролив. У восточного побережья и в северном Каспии были обнаружены гаплотипы принадлежащие

линии, представленной в предшествующих работах одним гаплотипом из Кумо-Манычской впадины «*P. sp.*». Уровень гаплотипической изменчивости этих групп оказался приблизительно одинаков (табл. 2). Наименьшее значение нуклеотидного разнообразия наблюдалось в линии, обозначенной *P. marmoratus*. Тест Таджимы на селективную нейтральность выявил наличие не нейтральных эволюционных изменений в линии *P. marmoratus* ($P < 0.01$) (табл. 2). Учитывая значения гаплотипической и нуклеотидной изменчивости, и звездообразную структуру данной гаплогруппы на медианной сети гаплотипов у нас есть основания говорить о наличии эффекта основателя в этой линии. Значения средних внутригрупповых дистанций, рассчитанных с использованием модели TN93, не высоки и составляют менее 1% для каждой из гаплогрупп. Значения средних межгрупповых дистанций сильно варьируют, между линией *P. marmoratus* и остальными линиями она составляет 0,145 – 0,153 и 0,022 – 0,034 между линиями *P. nasalis*, *P. semilunaris* и *P. sp.*

Глава 4 ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Филогенетические отношения бычковых рыб Черноморско-Каспийского бассейна рассматривались ранее разными авторами на основе различных систем признаков, в том числе и с использованием данных о нуклеотидных последовательностях кодирующих участков ДНК (Neilson, Stepien, 2009a). По сравнению с предшествующими молекулярно-генетическими исследованиями, благодаря добавлению оригинальных данных по ряду не изученных ранее популяций, нами были получены новые результаты, представляющие несомненный интерес с точки зрения выяснения филогенетических отношений, обоснования таксономических гипотез и оценки степени дивергенции популяций и видов из различных изолятов Понто-Каспийского региона. Изучение изменчивости гена цитохрома *b* бычков из различных популяций в пределах естественного ареала позволило рассмотреть в новом свете таксономические гипотезы, касающиеся широко распространенных видов. Однако, молекулярно-генетические данные имеющиеся в нашем распоряжении позволяют обсуждать лишь некоторые из существующих таксономических проблем этой группы.

4.1. Филогения представителей семейства *Gobiidae* Черноморско-Каспийского бассейна

Согласно полученным нами данным, виды эндемичных понто-каспийских бычков, объединенные Бергом (1949) в один род *Neogobius*, разделяются на две самостоятельные филетические линии, одна из которых включает также понто-каспийские роды *Mesogobius* и *Proterorhinus*. Эти результаты сходны с полученными Степьем с соавторами (Stepien et al., 2005; Stepien, Tumeo, 2006; Neilson, Stepien, 2009a) и подтверждают парафилетичность выделенного Бергом рода *Neogobius*. Следует отметить, что положение группы видов бычков-пуголовок *Benthophilus* – *Caspiosoma* в наших филогенетических построениях (рис. 2) и на филогенетических деревьях, представленных в работе Нейлсона и

Степиен (Neilson, Stepien, 2009a) неустойчиво. Бутстрэп-поддержки образования подклады *Benthophilus-Caspiosoma* и на наших деревьях, и на деревьях цитируемых авторов не велики, только на дереве, построенном на основе изменчивости гена COI (Fig. 4, Neilson, Stepien, 2009a) бутстрэп-поддержка значительна и составляет 87%. На основании сопоставления этих результатов можно полагать, что выявленная неустойчивость положения филогенетической линии *Benthophilus-Caspiosoma* обусловлена неполной представленностью бычков-пуголовок в филогенетическом анализе. К группе бычков-пуголовок в настоящее время относят 4 рода и 21-24 вида, тогда как до сих пор для филогенетического анализа доступны (и использовались в настоящей работе и Neilson, Stepien, 2009a) всего 5 видов двух родов, что составляет менее 25 %. В этой связи мы считаем, что полученные к настоящему времени молекулярно-генетические данные недостаточны для построения надродовой системы бычков Понто-Каспия. Тем не менее, они позволяют решить некоторые вопросы на уровне отдельных родов.

Согласно нашим данным, бычок-травяник *Gobius ophiocephalus* на каждой из полученных филогенетических схем группируется вместе с другими видами рода *Gobius*, обнаруживая наибольшую близость (и соответственно наименьшую генетическую дистанцию) к бурому бычку *G. bucchichi* (рис. 2, табл. 1). Оба эти вида наиболее близки и по внешним морфологическим и краниологическим характеристикам (Васильева, 1992a), что было отмечено ранее Световидовым (1964), объединявшим их в отдельный подрод *Zosterisessor*. Ряд авторов выделяют в самостоятельный род *Zosterisessor* лишь бычка-травяника (Ильин, 1927 (как *Zostericola*); Miller, 2004; Богущкая, Насека, 2004; Kottelat, Freyhof 2007; Neilson, Stepien, 2009a; Kovačić, Patzner, 2011). Наши данные показывают необоснованность этой таксономической концепции (как и объединения в самостоятельный таксон надвидового ранга бурого бычка и травяника) и подтверждают принадлежность травяника к роду *Gobius s. stricto* (Васильева, 1992a).

В пределах филогенетической группы *N. melanostomus* - *N. fluviatilis* - *N. caspius* уровень генетической дистанции между всеми видами достаточно сходен – 0.101-0.124. В разное время все эти виды выделяли в самостоятельные подроды рода *Gobius s. lato*: *Apollonia* с типовым видом *Gobius melanostomus*, *Neogobius* с типовым видом *G. fluviatilis* и *Eichwaldia* Smitt, 1900 с типовым видом *G. caspius*. Поскольку название *Eichwaldia* оказалось преокупированным для рода ископаемых брюхоногих моллюсков, позднее для последнего подрода было предложено замещающее название - *Eichwaldiella* Whitley, 1930. Однако в последующем большинство авторов не выделяли хвалынского бычка *N. caspius* в самостоятельный род или подрод, за исключением Богущкой и Насеки (2004). Два других вида этой клады на основе данных молекулярно-генетического анализа сначала были объединены в самостоятельный род *Apollonia*, противостоящий остальным видам, оставленным в роде *Neogobius* (Stepien, Tumeo, 2006). Затем к ним добавился хвалынский бычок, и родовое название было заменено на *Neogobius* (Neilson,

Stepien, 2009a). Согласно полученным нами данным, в один таксон родового ранга следует объединить все виды, входящие в эту филетическую линию. Как уже указывалось ранее (Vasil'eva, 2003), руководствуясь статьей 23.9.3 Международного кодекса зоологической номенклатуры, за этим родом следует закрепить название *Neogobius* Pjlin, 1927.

Среди видов рода *Neogobius sensu* Берг, 1949, вошедших в филетическую линию «Ponticola», ранее выделяли два подрода: *Babka* с типовым видом бычок-гонец *Gobius gymnotrachelus* Kessler, 1857 и *Ponticola* с типовым видом *G. ratan* Nordmann, 1840 (рис. 2). Берг (1949) считал, что бычка-гонца следует включить в отдельный род *Mesogobius* вместе с бычком-кнутом *M. batrachocephalus* (Pallas, 1814). Неправомочность такого объединения была показана Васильевой и Богачик (1991), а краниологические отличия *Gobius gymnotrachelus* от видов, включавшихся в подрод *Ponticola*, рассматривались как свидетельство в пользу правомочности выделения его в подрод *Babka* рода *Gobius* (Васильева, 1992б). Ряд авторов подняли статус монотипического подрода *Babka* до родового (Neilson, Stepien, 2009a; Freyhof, 2011). На каждой из полученных нами филограмм бычок-гонец образует сестринскую группу по отношению к остальным изученным видам данной группы; монофилетическое происхождение объединенной филетической линии «Ponticola» не вызывает сомнений (рис. 2). Уровень генетической дистанции между бычком-гонцом и видами *Ponticola s. stricto* крайне низок (0.083) на фоне дистанций между другими номинальными таксонами и не достигает уровня генетических дистанций как между видами рода *Gobius* (0,161 - 0,248), так и между видами филетической линии «Neogobius» (0,101 - 0,124). Эти результаты свидетельствуют в пользу таксономического единства (на надвидовом уровне) бычка-гонца и видов, выделявшихся ранее в подрод *Ponticola*. Уровень генетической дистанции видов этой филогенетической линии от видов филогенетической линии «Neogobius» сопоставим с уровнем их дистанции от видов родов *Gobius*, *Mesogobius*, *Benthophilus*. Полученные результаты предполагают родовой статус филетической линии «Ponticola» (рис. 2). Поскольку оба входящих в нее подрода были описаны одновременно (Ильин, 1927), за данным родом следует сохранить более распространенное название *Ponticola*.

Таким образом, представленная в настоящей работе таксономическая интерпретация филогенетических отношений черноморско-каспийских бычков принципиально отличается от системы, предложенной ранее Нейлсоном и Степиен (Neilson, Stepien, 2009a), где род *Neogobius sensu* Берг, 1949 разделен на три рода - *Neogobius s. stricto*, *Ponticola* и *Babka*, а вид *Gobius ophioccephalus* выделен в род *Zosterisessor*. Полученные нами молекулярно-генетические данные не подтверждают данную концепцию. Более того, если следовать логике цитируемых авторов, то следует выделить несколько новых монотипических родов как среди видов родов *Ponticola* и *Neogobius s. stricto*, так и видов рода *Gobius*.

4.2. Анализ распределения филогенетических линий широко распространенных видов и групп близких видов бычков в пределах Понто-Каспийского региона.

Полученные нами данные во многом сходны с результатами исследований, проводившихся ранее. Привлечение новых данных о генетической структуре рыб из необследованных ранее районов, позволило сопоставить филогеографическую структуру ряда близких видов черноморско-каспийских бычков и попытаться проследить этапы формирования их генетического разнообразия.

Обнаруженные генетические линии *N. fluviatilis*, *N. melanostomus*, *N. syrman* географически обособлены в бассейнах Черного и Каспийского морей. В связи с этим можно предположить, что возникновение этих линий связано с их географической изоляцией. Это заключение справедливо как для *N. syrman* обитающего исключительно в морских водах (13-14 ‰) (Miller (ed), 2003), так и для двух других видов не смотря на их присутствие в бассейне р. Волга. Уровень генетической дивергенции между популяциями этих видов различен. Если наблюдаемые дистанции между линиями *N. melanostomus* и *N. syrman* сходны и составляют 0,011 и 0,0072, то дистанция между линиями *N. fluviatilis*, приблизительно в 10 раз больше и составляет 0,094. Изучение морфологической изменчивости широко распространенных представителей рода *Neogobius sensu* Берг 1949 приводило исследователей к выводам о таксономической самостоятельности отдельных популяций этих видов (*N. fluviatilis*, *N. melanostomus*, *N. syrman*, *N. ratan*, *N. gymnotrahelus*). Последующие исследования внешних морфологических признаков и особенностей строения черепа не подтвердили существование большинства этих подвидов. Однако, обнаруженные генетические различия могут говорить о таксономической самостоятельности черноморских и каспийских популяций *N. fluviatilis*, *N. melanostomus*, *N. syrman*.

Состав группы *N. kessleri*, *N. gorlap*, *N. eurycephalus* и *N. sp.* был определен на основе результатов реконструкции филогенетических связей черноморско-каспийских представителей семейства Gobiidae (рис. 2). Все эти виды, как и рассмотренный ранее *N. syrman*, относятся к группе *Ponticola*, при этом *N. kessleri*, *N. gorlap*, *N. eurycephalus* и *N. sp.* образуют общую монофилетическую кладу. Как и следовало ожидать, гаплотипы всех рассмотренных нами видов образовали соответствующие филетические линии.

Существование одной из рассматриваемых в этой группе линий *N. sp.* из Каспийского моря было показано впервые. Изначально при видовой идентификации эти рыбы были отнесены к виду *N. gorlap* из-за наличия сходных морфологических черт, но при этом оставались сомнения в их видовой принадлежности, и, поэтому они были обозначены *N. sp.* В результате филогенетического анализа гаплотипы *N. sp.* образовали сестринскую ветвь по отношению к линии *N. gorlap*. Рыбы, относящиеся к линии *N. sp.* были обнаружены в Каспийском море у г. Актау, при этом рыб, относящихся к линии *N. gorlap*, в этом месте обнаружено не было. Как и следовало ожидать *N. gorlap*

и *N. kessleri* оказались генетически близкими. Долгое время два этих вида рассматривали как один. Это происходило до тех пор, пока в результате применения методов сравнительной кариологии не были выявлены различия между ними. При этом ареалы видов не пересекаются (Miller (ed), 2003).

В то время как на филогенетических деревьях наблюдается образование одной клады, включающей линии *N. gorlap* и *N. sp.* (рис. 3г) построенная нами медианная сеть гаплотипов показывает равное удаление двух этих линий от черноморской группы (рис. 4г) и, соответственно, невозможность объединения их в один кластер. В результате анализа распределения филогенетических линий мы можем говорить о существовании видов имеющих черноморское (*N. eurycephalus* и *N. kessleri*) и каспийское (*N. gorlap* и *N. sp.*) происхождение. Наибольшую генетическую близость в группе проявили *N. eurycephalus* и *N. kessleri*. Средняя межгрупповая дистанция TN93+G составила 0,0196. *N. eurycephalus* и *N. kessleri* имеют «хорошие» морфологические отличия, а также каждый из видов имеет определенные предпочтения к уровню солености. *N. eurycephalus* встречается в солоноватых водах и лишь иногда заходит в пресные, а *N. kessleri* встречается только в водах с соленостью 0 – 3 ‰. Нередко оба вида можно обнаружить в одних и тех же локалитетах (Манило, 2009), что еще раз свидетельствует о эвригалинности этих видов. Возможное симпатрическое видообразование *N. eurycephalus* и *N. kessleri* объясняет наличие явных морфологических различий, но факторы способствовавшие разделению этих видов, как и причины возникновения различных предпочтений к уровню солености остаются невыясненными.

На филогенетическом дереве *Proterorhinus* представлены четыре линии. Их распределение на первый взгляд не связано с существующими в настоящее время бассейнами, к тому же две из представленных линий были обнаружены в одних и тех же локалитетах. Линия, наиболее удаленная от остальных *P. marmoratus* (генетическая дистанция между *P. marmoratus* и другими линиями находится в пределах 0,1446 – 0,1528), локализована в северо-западной части Черного моря, включая побережье Крыма, Одесскую бухту. Рыбы с гаплотипом, принадлежащим к линии *P. marmoratus*, были обнаружены в нижнем течении р. Днестр. Три другие линии имеют сходные межгрупповые дистанции, находящиеся в пределах 0,0219 – 0,0339. Одна из этих линий, *P. semilunaris*, распространена в тех же пределах что и линия *P. marmoratus*, но в отличие от нее проникает в реки значительно дальше вверх по течению. Наиболее широко распространенной в пределах Понто-Каспийского региона является линия *P. nasalis*. Гаплотипы, принадлежащие к этой линии, были обнаружены в бассейне Азовского моря, Керченском проливе, бассейне Волги и бессточных реках Большой и Малый Узень. Гаплотипы, относящиеся к третьей линии, были обнаружены как в Кума-Манычской впадине, так и в Каспийском море (рис. 3а).

Таблица 3. Гаплотипический состав смешанных («морских» и «пресноводных») черноморских популяций *Proterorhinus* (по данным изменчивости участка *cyt b* длиной 408 п.н.)

Локальности	Соленость	Число гаплотипов /экземпляров относящихся к черноморским линиям <i>Proterorhinus</i>	
		<i>P. semilunaris</i>	<i>P. marmoratus</i>
Дельта р. Днепр	0 – 2 ‰	9/10	3/5
Одесский залив	14 – 17 ‰	4/5	12/17

Предшествующие исследователи рассматривали *P. marmoratus* и *P. semilunaris* как соответственно морской и пресноводный виды и на основе этого выдвигали гипотезы об их происхождении. Однако, полученные нами данные позволили показать, что возникновение этих видов не связано с изменением солености в пределах Черного моря. В противном случае эти два вида вряд ли бы обитали совместно (табл. 3). Это не отрицает возможности формирования у двух этих видов предпочтений к различным уровням солености.

Гаплогруппа соответствующего *P. marmoratus* s. stricto из северо-восточной части Черного моря включает экземпляры из устья и пресноводной части р. Черная (Крым), а также бычков из Казачьей бухты и оз. Донузлав, обладающих тем же самым гаплотипом, что и экземпляр из верхнего течения р. Черная, и рыб преобладающих в Стрелецкой бухте (66.7 %) и Севастопольском Заливе (90 %). Вероятно тот же самый гаплотип был свойственен голотипу *Gobius marmoratus* описанный из Севастополя. Молекулярный анализ не подтверждает валидности *P. tataricus* описанный из этой области после оценки морфометрических различий (Freyhof, Naseka 2007). Несмотря на необходимость дальнейшего исследования ядерного генома бычка-цуцика из других популяций, следует отметить, что морфологический анализ проводился на основе генетически гетерогенных выборок. В связи с этим не вызывает удивления высокая морфологическая изменчивость *P. tataricus* и малая диагностическая ценность обнаруженных различий. Все это свидетельствует о видовом единстве *P. tataricus* и *P. marmoratus*.

Третья генетическая линия «*P. nasalis*» имеет наиболее широкое распространение. Гаплотипы относящиеся к этой линии были обнаружены в бассейне Азовского моря и бассейне р. Волга. Область происхождения этой линии однозначно установить не представляется возможным. В этой связи наиболее вероятными выглядят две таксономические гипотезы, основанные на данных молекулярного анализа:

1) Бычок-цуцик, относящийся к третьей генетической линии, действительно принадлежит широко распространенному в бассейнах Каспия и

Азовского моря виду *P. nasalis* (в этом случае *P. semipellucidus* должен рассматриваться как его младший синоним);

2) Третья генетическая линия представляет отдельный вид, занимающей бассейн Азовского моря и бассейн р. Волга, генетически отличный от линии бычка-цуцика, обитающей в Каспийском (или в Среднем и Южном Каспии) и определенной как *P. nasalis s. stricto*.

Обнаруженный Nielsen, и Stepien (2009б) гаплотип из Черноземельского канала имел не большие, но заметные отличия от остальных гентических линий *Proterorhinus*. Nielsen, и Stepien (2009б) предположили существование самостоятельной генетической линии *P. sp.* изолированной в Черноземельском канале (Кумо-Манычская впадина). Полученные нами гаплотипы из Северного Каспия и восточного побережья Каспийского моря показали значительное сходство с гаплотипом из Кумо-Манычской впадины. Представленная картина в значительной степени удовлетворяет второй гипотезе. В пользу каспийского происхождения линии широко распространенной в пресноводном бассейне Северного Каспия и бассейне Азовского моря говорит обнаружение гаплотипов, принадлежащих этой генетической линии, в бессточных реках Большой и Малый Узень, которые были изолированы в течение последних 25 тыс. лет.

Сравнение филогеографических картин характерных для различных широко распространенных видов позволяет выделить линии дивергенция, между которыми имеет наивысшие значения. Генетические дистанции TN93 между линиями *P. marmoratus s. stricto* и остальными тремя линиями *Proterorhinus* находятся на уровне 15%, а дистанции между черноморской и каспийской линиями *N. fluviatilis* – 9,4 %. Эти дистанции значительно превышают различия между изолированными популяциями остальных рассмотренных видов. Nielsen, и Stepien (2009б) предполагали, что дивергенция линии *P. marmoratus s. stricto* от остальных связана с колебаниями уровня солености в позднем миоцене, однако эта гипотеза не подтвердилась. Близость трех генетических линий *P. nasalis*, *P. semilunaris*, *P.sp.* две из которых имеют каспийское происхождение, наводит на мысль о возникновении столь глубокой дивергенции в результате древнего разделения бассейнов Каспия и Черного моря (~5 млн. лет назад). Различия в уровне дивергенции между линиями, имеющими каспийское и черноморское происхождение, могут быть связаны с отсутствием селективной нейтральности черноморской линии *P. marmoratus s. stricto*.

Дивергенция между черноморскими и каспийскими линиями *N. melanostomus*, *N. syrman*, а также линиями *N. kessleri* - *N. gorlap*, *N. gorlap* - *N. eurycephalus*, *N. gorlap* - *N. sp.*, *N. kessleri* - *N. sp.*, *N. eurycephalus* - *N., sp.*, *P. nasalis* - *P. semilunaris*, *P.sp.* - *P. nasalis* и *P. semilunaris* - *P.sp.* значительно ниже и связана с возникновением непостоянных соединений между двумя бассейнами в конце плиоцена - голоцена (2 млн. лет – н.в.). На данный момент такая трактовка является наиболее аккуратной и правдоподобной в отличие от иных гипотез (Nielsen, Stepien, 2009а). Подобная картина дивергенции наблюдается и у других видов Понто-Каспийских гидробионтов (Audzijonyte et

al., 2006, 2008; Cristescu et al., 2003; Glembiuk et al., 2006 и др.) и соответствует упомянутым выше зоогеографическим гипотезам.

Сложная картина пространственного распределения генетических линий черноморско-каспийских бычков и различия в уровне дивергенции между ними является отражением богатой геоморфологическими событиями истории Понто-Каспийского региона. Полученные нами результаты свидетельствуют в пользу гипотез о таксономической обособленности изолированных популяций бычков в Черном и Каспийском морях.

В данной работе рассмотрена лишь часть проблем, касающихся генетического разнообразия, филогении и таксономии черноморско-каспийских бычков. Не решенными остались вопросы, касающиеся филогении и таксономии обособленной группы бычков-пуголовок (*Benthophilus*, *Benthophiloides*, *Caspiosoma*, *Anatrirostrum*), филогенетической структуры рыб, относящихся к группе кавказских речных бычков. Представляет интерес изучение филогении группы песчаных бычков (*Pomatoschistus*, *Knipowitschia*, *Goiusculus*, *Economidichthys*). Дискуссионным остается систематическое положение эндемичных черноморско-каспийских бычков в семействе Gobiidae.

ВЫВОДЫ

1. Митохондриальный ген цитохрома *b* является эффективным молекулярным маркером при решении проблем связанных с систематикой и филогенией Черноморско-каспийских рыб семейства Gobiidae на родовом, видовом и популяционном уровнях.

2. Группа эндемичных сарматских бычков имеет монофилетическое происхождение и включает в себя ряд близких родов: *Benthophilus*; *Caspiosoma*; *Mesogobius*; *Neogobius* sensu Берг, 1949; *Proterorhinus*. Однако, для выяснения положения черноморско-каспийских бычков в таксономической структуре семейства необходимо использование маркеров имеющих меньшую скорость эволюции.

3. Род *Neogobius* sensu Берг имеет парафилетическое происхождение, объединяя две филетические линии *Ponticola* (*N. constructor*, *N. cephalargoides*, *N. ratan*, *N. cyrius*, *N. eurycephalus*, *N. gorlap*, *N. platyrostris*, *N. kessleri*, *N. syrman*, *N. rhodioni*, *N. gymnotrachelus*) и собственно *Neogobius* (*N. melanostomus*, *N. fluviatilis*, *N. caspius*). Это может свидетельствовать о таксономической неоднородности рода *Neogobius*.

4. Генетическая близость бычка травяника (*Gobius ophiocephalus*) к другим представителям рода *Gobius* не дает оснований для его выделения в самостоятельный род *Zosterisessor*.

5. Популяции широко распространенных видов, населяющие различные изоляты Понто-Каспийского региона, имеют заметные, а в ряде случаев существенные, различия в полиморфизма гена цитохрома *b*. Различный уровень дивергенции популяций таких видов связан с неоднократным разделением их ареалов. Основное влияние на дивергенцию широко распространенных видов и групп близких видов оказали два последовательных этапа преобразования Понто-Каспийского региона: 1) древнее разделение бассейнов Черного и Каспийского морей (5 млн. лет назад), 2) возникновение временных связей между изолятами Понто-Каспия в плиоцене – голоцене (2 млн. лет – н. в.).

6. Обнаруженные генетические различия между изолированными популяциями близких видов в ряде случаев являются значимыми, согласуются с имеющимися таксономическими гипотезами и могут быть отражены в систематике черноморско-каспийских бычков.

СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ

1. Sorokin P.A., Medvedev D.A., Vasil'ev V.P., Vasil'eva E.D.. 2011. Further studies of mitochondrial genome variability in Ponto-Caspian *Proterorhinus* species (ACTINOPTERYGII: PERCIFORMES: GOBIIDAE) and their taxonomic implications // ACTA Ichthyologica et Piscatoria. V. 41, №2, P. 95–104.

2. Медведев Д.А. 2013. Молекулярная филогения и некоторые особенности формирования генетического разнообразия бычковых рыб (Gobiidae) сарматской группы // Вестник Тамбовского государственного университета Т.18, №6, С. 3045-3049.

3. Медведев Д.А., Сорокин П.А., Васильев В.П., Чернова Н.В., Васильева Е.Д. 2013. Реконструкция филогенетических связей черноморско-каспийских бычков (Gobiidae, Perciformes) на основе изменчивости митохондриального генома и некоторые проблемы таксономии // Вопросы ихтиологии. Т. 53, №6, С. 687–698.

Тезисы в сборниках материалов конференции:

1. Медведев Д.А., Сорокин П.А., Васильева Е.Д., Васильев В.П. 2011. Продолжение исследований изменчивости митохондриального гена цитохрома *b* Понто-Каспийских видов *Proterorhinus* (Gobiidae) и их таксономическое значение. // Популяционная генетика современное состояние и перспективы: Материалы молодежной международной конференции 17 – 18 ноябрь. Москва, Россия. М.: Цифровичок. С. 204.

2. Vasil'eva E., Sorokin P., Medvedev D., Vasil'ev V. 2011. New taxonomic hypotheses for the tubenose goby genus *Proterorhinus* (Gobiidae) resulted from phylogeographic studies // Combined Abstract Booklet. World Conference on Marine Biodiversity, September. P. 181.

3. Васильева Е.Д., Медведев Д.А., Васильев В.П. 2013 Проблемы таксономии бычковых рыб (Gobiidae, Percies) Понто-Каспия: данные молекулярно-генетических исследований // Молекулярно-генетические подходы в таксономии и экологии: тезисы докладов научной конференции (г. Ростов-на-Дону, 25–29 марта 2013 г.) / отв. ред. чл.-корр. РАН Д.Г. Матишов. – Ростов н/Д: Изд-во ЮНЦ РАН, С. 24.

4. Медведев Д.А. 2013. Молекулярная филогения черноморско-каспийских бычков (Gobiidae, Perciformes) и некоторые проблемы таксономии. // Биоразнообразие: глобальные и региональные процессы: Материалы всероссийской конференции молодых ученых, Улан-Удэ (Россия), 16-21 сентября 2013 г. – Улан-Удэ: Изд-во БНЦ СО РАН, С. 10-11.