

Шарина Светлана Николаевна

**МОЛЕКУЛЯРНО-ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ
КАМБАЛООБРАЗНЫХ РЫБ (PISCES, PLEURONECTIFORMES)
ДАЛЬНЕВОСТОЧНЫХ МОРЕЙ РОССИИ ПО НУКЛЕОТИДНЫМ
ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЯМ ГЕНОВ ЦИТОХРОМА *b* И
ЦИТОХРОМОКСИДАЗЫ 1**

03.02.07 – генетика

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Владивосток – 2010

**Работа выполнена в Лаборатории генетики Учреждения Российской академии наук
Институте биологии моря им. А.В. Жирмунского ДВО РАН (ИБМ ДВО РАН)**

Научный руководитель:

доктор биологических наук

Картавец Юрий Федорович

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук

Евгений Станиславович Балакирев

кандидат биологических наук, с.н.с.

Сергей Владимирович Шедько

Ведущая организация:

Учреждение Российской академии наук Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН.

Защита состоится 27 декабря 2010 г. в 14 часов на заседании диссертационного совета Д.005.008.01 при Учреждении Российской академии наук Институте биологии моря им. А.В. Жирмунского ДВО РАН по адресу: 690041, г. Владивосток, ул. Пальчевского, 17. Телефон: (4232) 310-905, факс (4232) 310-900, e-mail: inmarbio@mail.primorye.ru.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Учреждения Российской академии наук Института биологии моря им. А.В. Жирмунского ДВО РАН (690041, г. Владивосток, ул. Пальчевского, 17).

Отзывы просим присылать на e-mail: mvaschenko@mail.ru.

Автореферат разослан ___ ноября 2010 г.

Ученый секретарь

диссертационного совета,

кандидат биологических наук

Ващенко

М.А. Ващенко

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Систематика камбал изучена слабо и классификация представителей в пределах отряда камбалообразные, в основном, базировалась на морфо-анатомических признаках. Имеется лишь несколько работ, выполненных с использованием молекулярных маркеров (Pardo et al., 2005).

В представляемой работе основной акцент сделан на исследовании семейства (сем.) камбаловые (Pleuronectidae) как наиболее распространенного в водах Дальнего Востока России и Тихого океана в целом. Таксономические отношения в сем. Pleuronectidae до сих пор остаются предметом многочисленных исследований. Вследствие использования различных методик, в настоящее время известно несколько вариантов классификации камбаловых рыб, предложенных разными авторами (Norman, 1934; Sakamoto, 1984; Линдберг, Федоров, 1993; Cooper, Charleau, 1998). Родовая принадлежность разных видов семейства часто пересматривается, порой без достаточных для этого оснований, число родов в подсемействе Pleuronectinae меняется, что вызывает определенную критику (Расс, 1996). Одной из конкретных проблем является большая синонимия и, соответственно, необходимость прояснения таксономического статуса ряда представителей рассматриваемого семейства. Это касается, например, валидности нескольких представителей рода палтусовидных камбал *Hippoglossoides*, таких как *H. dubius*, *H. robustus*, *H. ellassodon* (Фадеев, 1978; Коваль, Богданов, 1982; Винников, 2003; Винников и др., 2006).

Филогенетические взаимоотношения родов и видов внутри сем. камбаловые изучены слабо. Палеонтологические находки весьма редки (Pardo et al., 2005) и не дают ясного представления о последовательности происхождения видов в группе.

В последние десятилетия для анализа системы таксономических отношений (систематики) и филогении рыб и других животных чаще всего используется сравнительный анализ митохондриального генома и входящих в него генов митохондриальной ДНК (мтДНК).

В данной работе для филогенетических исследований были выбраны два гена мтДНК – это ген субъединицы 1 цитохромоксидазы *c* (цитохромоксидаза 1, *Co-I*) и ген цитохрома *b* (*Cyt-b*). В последние десятилетия эти гены наиболее популярны в молекулярной филогенетике и обычно используются для анализа на уровне вид–семейство (Johns, Avise, 2004; Hebert et al., 2004; Картавцев, Ли, 2006; Kartavtsev, 2009a; b).

Цель и задачи исследования. Цель данной работы – исследование генетической изменчивости, филогенетических отношений и дивергенции камбалообразных рыб дальневосточных морей России на основе анализа нуклеотидных последовательностей генов *Co-I* и *Cyt-b*.

Для достижения этой цели были поставлены следующие задачи:

1) определить первичные нуклеотидные последовательности (далее – последовательности) и нуклеотидный состав генов *Co-I* и *Cyt-b* исследуемых представителей камбалообразных рыб;

2) выяснить, как соотносятся уровни внутри- и межвидовой дивергенции у исследуемых представителей различных таксонов камбалообразных рыб;

3) провести реконструкцию филогенетических взаимоотношений исследуемых видов камбалообразных рыб с использованием в качестве молекулярных маркеров генов *Co-1* и *Cyt-b*;

4) провести сравнительный анализ филогении сем. камбаловые и других семейств, полученных с использованием различных митохондриальных маркеров и морфологических данных;

5) подтвердить или опровергнуть монофилетичность сем. Pleuronectidae и его подсемейств;

6) уточнить таксономический статус видов рода *Hippoglossoides* – *H. robustus*, *H. elassodon* и *H. dubius*.

Научная новизна работы. Впервые с помощью молекулярно-филогенетических методов установлены эволюционные взаимосвязи между видами внутри сем. Pleuronectidae. Уточнены уровни внутри- и межвидовой дивергенции исследуемых видов. Выдвинута гипотеза о преобладающем способе видообразования камбалообразных рыб.

Установлен монофилетичный статус сем. Pleuronectidae и представленных в исследовании подсемейств (Pleuronectinae, Hippoglossoidinae и Hippoglossinae). Сделано оригинальное предложение исключить трибу Microstomini из подсемейства Pleuronectinae.

Показана полифилетичность рода *Limanda*. Впервые сделано предложение рассматривать виды *Limanda sakhalinensis* и *L. limanda* как самостоятельные таксоны родового ранга в составе подсемейства Hippoglossoidinae.

Уточнена филогения рода *Hippoglossoides*. Рекомендована синонимизация выделенных ранее таксонов *Hippoglossoides robustus* и *H. elassodon* со сведением их, согласно приоритету, к виду *Hippoglossoides elassodon* Jordan, Gilbert, 1880.

Теоретическая и практическая значимость работы. Представленные генетические маркеры *Co-1* и *Cyt-b* могут быть применены для идентификации видов камбалообразных рыб в таксономических, эволюционных и рыбохозяйственных целях, а также использованы в Международном проекте по штрихкодированию рыб на основе ДНК, Fish-BOL (<http://www.fishbol.org/>).

Работа послужит основой для дальнейших исследований в области систематики и филогении сем. Pleuronectidae и в целом отряда Pleuronectiformes.

За время работы были определены и депонированы в международную базу данных – Генный банк (GenBank, NCBI: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 132 нуклеотидные последовательности представителей сем. Pleuronectidae для двух генов мтДНК *Co-1* и *Cyt-b*.

Апробация работы. Результаты работы были представлены на российских и международных конференциях: «Modern Achievements in population, Evolutionary and

Ecological Genetics: International Symposium» (Владивосток – МБС «Восток», 2007), «Штрих-кодирование видов рыб России на основе ДНК. Интеграция в глобальную программу Fish-BOL». Рабочее совещание (Владивосток, 2007), «Second International Barcode of Life Conference» (Тайпей, Тайвань, 2007), «DNA Barcoding and Molecular Phylogenetics: The International Workshop» (Владивосток, 2007), «Школа-конференция молодых ученых «Секвенирование полных геномов»» (Иркутск, 2009), «Modern Achievements in Population, Evolutionary, and Ecological Genetics: International Symposium» (Владивосток – МБС «Восток», 2009), «The 2nd International workshop on DNA barcoding of Northeast Asian Fishes: Population, Species, and Phylogeny» (Сеул, Корея, 2010), на ежегодных конференциях Учреждения Российской академии наук Института биологии моря им. А.В. Жирмунского ДВО РАН (Владивосток, 2008, 2009).

Личный вклад автора. Автором были собраны образцы камбалообразных рыб из залива Восток (Японское море), выделена ДНК, проведены ПЦР реакции и реакции циклосеквенирования, разработаны специфические праймеры для гена *Co-1* камбалообразных рыб, проведен анализ нуклеотидных последовательностей. Статистический анализ данных проводился с помощью научного руководителя.

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 17 работ, из них 6 статей в рецензируемых международных и российских журналах; 4 входят в текущий список ВАК.

Структура и объем работы. Диссертация состоит из введения, 5 глав, заключения, выводов, списка литературы и приложения. Работа изложена на 161 странице, иллюстрирована 13 рисунками, содержит 5 таблиц и приложение с 5 таблицами. Список литературы содержит 149 наименований.

Работа выполнена при финансовой поддержке грантов ДВО РАН (07-ШБ-06-035, 07-Ш-Г-06-042, 08-Ш-Б-06-031, 09-П23-07, 09-И-23-07, 10-Ш-В-06-131) и РФФИ (07-04-00186, 08-04-91200).

Благодарности. Автор считает своим приятным долгом выразить глубокую признательность своему руководителю Картавцеву Юрию Федоровичу за внимательное и конструктивное руководство.

Автор выражает благодарность группе ученых за помощь в сборе и идентификации материала для настоящей работы: сотрудникам ИБМ ДВО РАН Ю.Ф. Картавцеву, А.С. Соколовскому, В.В. Земнухову, К.А. Винникову (ДВГУ) за сбор материала в б. Киевка (Японское море), И.И. Глебову (ТИНРО-центр) за сбор материала в Беринговом море; А.А. Баланову (ИБМ ДВО РАН) за помощь в определении рыб и подготовке их к хранению в коллекции музея ИБМ ДВО РАН в качестве ваучерных образцов.

Автор считает необходимым поблагодарить коллектив лаборатории генетики ИБМ ДВО РАН за создание рабочей атмосферы и моральную поддержку.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

В главе приведен обзор по биологии, таксономии и филогении отряда камбалообразные (Pleuronectiformes) с акцентированием внимания на сем. камбаловые (Pleuronectidae). Рассмотрены методы исследования генетической изменчивости. Уделено внимание рассмотрению моделей нуклеотидных замен первичных последовательностей.

Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объекты исследования. Материалом для молекулярно-филогенетического анализа послужили 66 представителей 17 видов сем. Pleuronectidae. Отлов рыб проводили в трех морях Дальнего Востока РФ. Японское море: *Liopsetta pinnifasciata* (5 экз.) и *Hippoglossoides dubius* (1 экз.) – бухта Киевка; *Pseudopleuronectes obscurus* (4 экз.), *Pseudopleuronectes herzensteini* (5 экз.), *Platichthys stellatus* (5 экз.), *Limanda punctatissima* (5 экз.), *Cleisthenes herzensteini* (3 экз.) – зал. Восток; *Pseudopleuronectes yokohamae* (5 экз.) – прол. Старка. Берингово море: *Lepidopsetta polyxustra* (4 экз.), *Gliptocephalus zachirus* (4 экз.), *Limanda sakhalinensis* (5 экз.), *Hippoglossoides elassodon* (2 экз.), *Hippoglossoides robustus* (6 экз.), *Reinhardtius hippoglossoides* (5 экз.), *Pleuronectes quadrituberculatus* (4 экз.), *Atherestes stomias* (1 экз.). Охотское море (о. Парамушир): *Hippoglossus stenolepis* (2 экз.).

Выделение и амплификация ДНК. Геномную ДНК выделяли из кусочков белой мышечной ткани, фиксированной в 96% этиловом спирте, по стандартной методике (Маниатис и др., 1984; Sambrook et al., 1989; Гафуров, 1999) с небольшими модификациями, состоящими в удалении фенола из протокола и добавлении рибонуклеазы. Амплификацию участков мтДНК проводили с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) согласно протоколу с использованием праймеров, представленных в работах Ward et al., 2005; Takashima et al., 2006; Kartavtsev et al., 2007, разработанных доктором К. Saitoch (Япония) и собственно автором.

Определение нуклеотидной последовательности. Секвенирование генов *Co-1* и *Cyt-b* мтДНК проводили с использованием ген-специфических праймеров и набора реактивов «Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit» V. 3.1 (Applied Biosystems, США) по методике производителя. Определение нуклеотидной последовательности ДНК осуществляли на автоматическом секвенаторе ABI-3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, ABI, США) методом флуоресцентно меченых терминаторов – 2'-, 3'-дидезоксинуклеозидтрифосфатов Big Dye™ (ABI, США) на базе ИБМ ДВО РАН.

Первичный анализ нуклеотидных последовательностей. Консенсусные последовательности получали, используя редактор последовательностей ChromasPro (<http://www.techneylsium.com.au/chromas.html>).

Для сравнительного филогенетического анализа были использованы нуклеотидные последовательности, извлеченные из геномного банка.

Для филогенетического анализа, с учетом данных генного банка проанализировали: 83 последовательности полного гена *Co-1* для 26 видов камбалообразных рыб и 2 видов трескообразных, которые были взяты в качестве внешней группы. Кроме того, были проанализированы 177 последовательностей полного гена *Cyt-b* для 57 видов камбалообразных рыб и 2 видов трескообразных. Для объединенных данных по генам *Co-1* и *Cyt-b* использовали 75 последовательностей принадлежащих к 21 виду сем. Pleuronectidae и одну последовательность для сем. Soleidae, в качестве внешней группы.

Длина последовательностей после выравнивания и приведения к одной длине составила 1154 пар нуклеотидов (пн) и 887 пн для генов *Co-1* и *Cyt-b* соответственно.

Филогенетический анализ. На основе выровненного набора последовательностей строили филогенетические деревья. Определенную модель нуклеотидных замен, использованную для расчета расстояний и построения деревьев, подбирали с помощью программы Modeltest 3.7 (Posada, 1998). Все деревья строили, используя четыре подхода: максимальной парсимонии (MP), ближайшего соседства (NJ), Байесовский (BA) и максимального правдоподобия (ML).

Для описанного набора последовательностей (по гену *Co-1*, *Cyt-b* и объединенных последовательностей этих генов), как лучшая, была выбрана модель TrN+I+G (Tamura, Nei, 1993), с различными значениями параметра гамма-распределения (G): для гена *Co-1* G = 0,4792, для гена *Cyt-b* G = 0,6326, для объединенного набора последовательностей G = 0,4272. Устойчивость полученных филогенетических деревьев оценивали методом бутстрепа (Zharkikh, Li, 1992a, b, 1995; Hasegawa, Kishino, 1994), используя для NJ- и ML-деревьев 1000 бутстреп-реплик; BA-дерево создавали с 10⁶ модельных генераций, для построения MP-дерева поиск стартовых деревьев проводили по принципу обмена ближайшими соседями, CNI (close-neighbor-interchange), и уровнем поиска 1, использовали опцию случайного добавления стартовых деревьев (10 реплик) при CNI-поиске.

Генные деревья *Co-1* и *Cyt-b* строили, используя либо все нуклеотиды, либо только 1-ю и 2-ю позиции в кодонах для объединенных данных.

Деревья строили с помощью ПП MrBayes и PAUP, визуализировали и при необходимости редактировали, используя программу TreeView (Page, 1996). Общий статистический анализ был выполнен с использованием программы STATISTICA 6.0 (StatSoft, 2001).

Глава 3. МОЛЕКУЛЯРНАЯ ФИЛОГЕНЕТИКА КАМБАЛООБРАЗНЫХ РЫБ НА ОСНОВЕ ГЕНА СУБЪЕДИНИЦЫ 1 ЦИТОХРОМОКСИДАЗЫ C

При анализе нуклеотидного состава гена *Co-1* соотношение пиримидинов (Т, С) к пуринам (А, G) отклонялось от пропорции 50%:50% (Kartavtsev et al., 2008) и составило: (1) 57,7%:42,3% для трех позиций в кодоне, (2) 60,2%:39,8% для первой позиции в кодоне, (3) 55,3%:44,7% для второй позиции, (4) 59,9%:40,1% для третьей нуклеотидной позиции в кодоне (данные учитывались для всех камбалообразных, использованных в анализе). Такое смещение от равновесной пропорции отмечается для многих живых систем (Лукашов, 2009).

Считается, что преобладание пиримидинов является отражением гидрофобных свойств белок-кодирующих генов (Nailor et al., 1996; Inoue et al., 2001).

Для сравнения дивергенции в иерархии таксономических (филетических) групп вычисляли попарные p -расстояния, что позволило составить примерное представление о нуклеотидном разнообразии на четырех различных уровнях иерархии. Значения средних p -расстояний составили: (1) на внутривидовом $1,13 \pm 0,16\%$, (2) на внутривидовом $7,93 \pm 0,30\%$, (3) на внутрисемейственном $11,62 \pm 0,08\%$ и (4) на внутриотрядном $19,03 \pm 0,13\%$ (средняя арифметическая \pm стандартная ошибка, SE) (рис. 1). Оценивая различия между внутривидовым и межвидовым уровнями, данные о p -расстояниях можно привлечь для выяснения реализованной модели видообразования. В частности, они позволяют сделать вывод, что среди представителей отряда камбалообразных преобладает географическая модель видообразования с накоплением случайных генетических изменений в течение длительного периода времени формирования подвидов, а затем видов и дальнейшей независимой эволюцией линий (Dobzhansky, 1955; Ayala et al., 1974; Bush, 1975; Templeton, 1981; Мауг, 1982; King, 1993; Harrison, 1998). Конечно, учитывая сложность концепции вида, вывод о преобладании той или иной модели, основанный только на генетических расстояниях, не может быть окончательным. Необходим учет и других характеристик изменчивости таксонов (Картавец, 2005; Картавец, Ли, 2006).

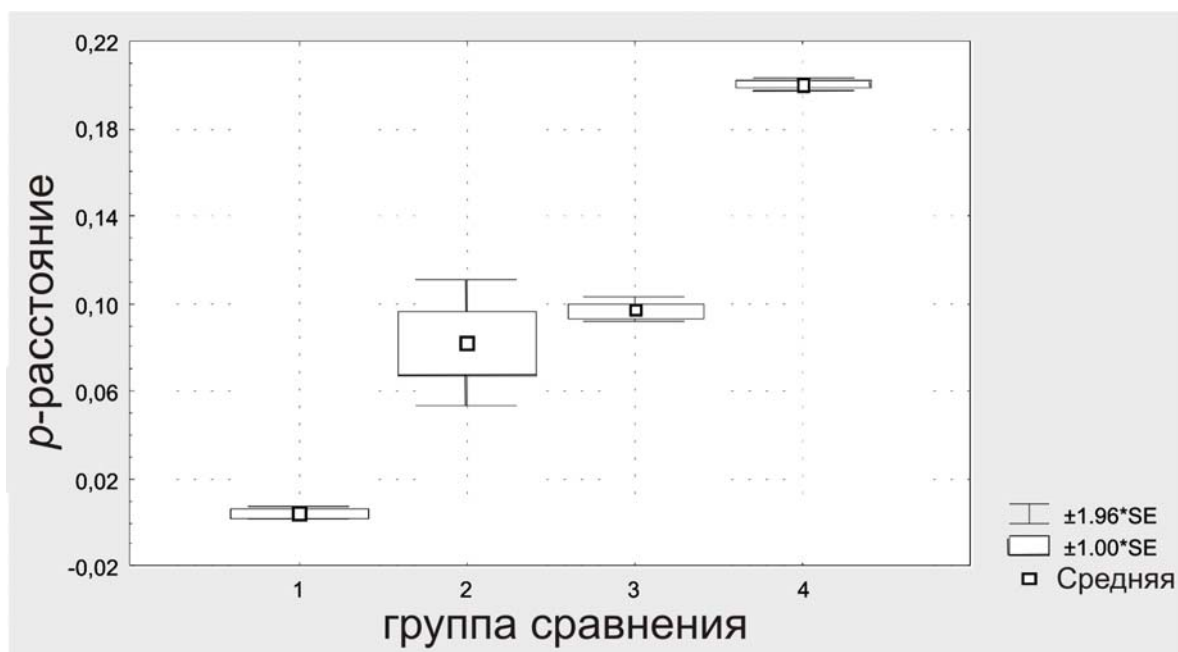


Рис. 1. График, иллюстрирующий результаты однофакторного дисперсионного анализа и изменчивость средних p -расстояний на четырех уровнях дифференциации (группах сравнения) камбалообразных (Pleuronectiformes) для последовательностей гена *Co-1*. Группы сравнения (ось X): (1) внутривидовая, для особей одного вида, (2) внутривидовая, для особей одного рода, (3) внутрисемейственная, для особей, принадлежащих к одному семейству и (4) внутриотрядная, для особей, принадлежащих к одному отряду. Средние арифметические для p -расстояний (ось Y) даны в долях.

Рассмотрим подробнее результаты филогенетических реконструкций (рис. 2).

Наиболее рельефную ветвь представляет внешняя группа, что вполне естественно в связи с достаточной генетической удаленностью трескообразных от камбалообразных.

Наиболее крупную ветвь на представленном дереве (рис. 2) формирует сем. *Pleuronectidae*, которое в соответствии с целями исследования рассмотрено более подробно.

Монофилетичность этого семейства была предложена ранее (на основании результатов, полученных для *12S* и *16S* рРНК) для этого и ряда других семейств (Новиков, 2002; Pardo et al., 2005; Kartavtsev et al., 2007; Kartavtsev et al., 2008). Данные о монофилетичности сем. *Pleuronectidae* хорошо поддерживаются также неполными последовательностями *Co-1* (Kartavtsev et al., 2008), последовательностями гена *Cyt-b* (Kartavtsev et al., 2007) и морфологией (Cooper, Chapleau, 1998; Ratnasingham, Hebert, 2007).

Все роды на представленном дереве формируют обособленные кластеры, исключение составляют роды *Pseudopleuronectes* и *Limanda*, которые формируют полифилетичные кластеры.

Однако, учитывая тот факт, что полифилетические группы систематиками не признаются, в случае, если данные исследования надежно подтверждают полифилию группы, ее классификацию следует пересмотреть (Абрамсон, 2007). Таким образом, необходимо уточнить систематическое положение этих двух родов.

Под Pseudopleuronectes. Вид *P. yokohamae* формирует полифилетичный кластер с видами *P. obscurus* и *P. herzensteini*. Таксономический статус этих видов и их принадлежность к роду *Pseudopleuronectes* активно обсуждается в литературе: одни авторы считают, что вид *P. obscurus* принадлежит роду *Pleuronectes*, как, например, Сакамото (Sakamoto, 1984) на основании сравнительно-анатомического исследования скелетных признаков. Другие авторы относят этот вид к роду *Liopsetta*, как, например, Норман (Norman, 1934), использовавший наружные морфологические признаки, которыми виды характеризуются в определителях и монографиях (Norman, 1934; Линдберг, Федоров, 1993; Расс, 1996). Однако последняя систематическая ревизия Купера и Чаплау (Cooper, Chapleau, 1998), основанная на остеологических данных, показала, что оба эти вида принадлежат роду *Pseudopleuronectes*, что согласуется с исследованиями, основанными на данных анализа сейсмодатированной системы (Воронина, Евсеенко, 2001; Винников, 2007) и на сравнении электрофоретических спектров белков (Коваль, Богданов, 1982), которые показали, что все три представленных вида (*P. yokohamae*, *P. obscurus*, *P. herzensteini*) принадлежат к роду *Pseudopleuronectes*. Очевидно, требуется дальнейшее исследование этого рода с использованием других молекулярных маркеров.

Под Limanda. В сравнительном анатомическом исследовании Купера и Чаплау (Cooper, Chapleau, 1998) монофилия этого рода не была подтверждена.

Валидность всех остальных представленных родов сем. *Pleuronectidae* полностью поддерживается нашими данными.

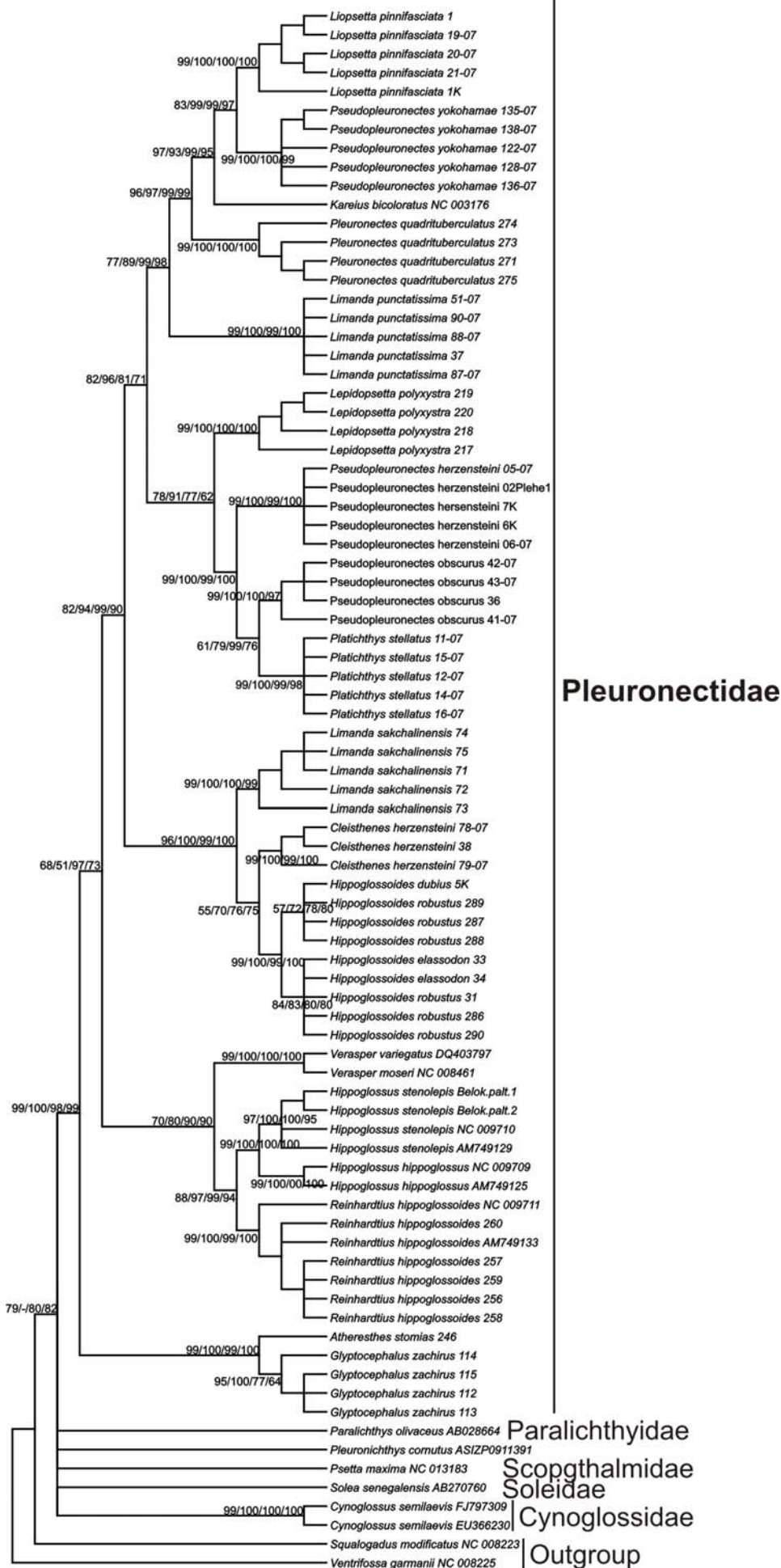


Рис. 2. Укорененное консенсусное (50%) МР-дерево, показывающее филогенетические взаимосвязи на основе последовательностей гена *Co-1*. В узлах показана бутстреп-поддержка для МР, NJ (n=1000 реплик), ВА (10⁶ генераций) и МL (n=500 реплик) методов реконструкции деревьев (МР/НJ/ВА/МL). Деревья укореняли по двум внешним таксонам: трескообразные (Gadiformes).

Представители рода *Hippoglossoides* формируют смешанный кластер. *P*-расстояние между этими видами составило $1,06 \pm 0,11\%$, расстояние между видами *H. robustus* и *H. elassodon* равно $1,05 \pm 0,13\%$, расстояние между последовательностями в пределах *H. robustus* – $0,83 \pm 0,10\%$, а расстояние между последовательностями в пределах *H. elassodon* – $1,5 \pm 0,3\%$. Эти данные могут свидетельствовать о том, что виды этого рода слабо различаются генетически.

Синонимия видов *H. elassodon* и *H. robustus* уже предлагалась ранее на основании морфологических и молекулярно-филогенетических данных (Ivankov et al., 2002; Kartavtsev et al., 2002; Vinnikov, 2003; Винников, 2006; Kartavtsev et al., 2007). При сравнении вида *H. dubius* с *H. elassodon* по результатам электрофоретических различий по белковым и ферментным системам сыворотки крови и мышц было сделано заключение, что, вероятно, они являются подвидами одного вида (Коваль, Богданов, 1982). Все эти результаты подтверждаются и нашими данными, в том числе и при сравнении средних *p*-расстояний для этих видов. Учитывая полученную информацию, а также литературные данные по морфологии и экологии рассматриваемых в работе таксонов камбал, правомочно группу *H. elassodon* + *H. robustus* принимать как один полиморфный вид *H. elassodon* (Jordan, Gilbert, 1880). Второй таксон - *H. robustus*, как более поздний, следует считать синонимом вида *H. elassodon* (Jordan, Gilbert, 1880). Данные об отнесении в эту группу *H. dubius* следует принять с осторожностью.

Остальные виды на представленном дереве формируют набор близких кластеров, обособляющий отдельных особей, которые классифицируются как образцы одного вида. Такое отнесение индивидуальных последовательностей к “своим” видам служит дополнительным подтверждением возможности идентификации видов камбал по гену *Co-I* (barcoding) (Kartavtsev et al., 2008). Эти данные хорошо согласуются с описанной выше низкой внутривидовой и высокой межвидовой дивергенцией, обнаруженной по *p*-расстояниям.

Глава 4. МОЛЕКУЛЯРНАЯ ФИЛОГЕНЕТИКА КАМБАЛООБРАЗНЫХ РЫБ НА ОСНОВЕ ГЕНА ЦИТОХРОМА В

Ген *Cyt-b* широко используется в качестве филогенетического инструмента (Банникова, 2004) для оценки филогении рыб не только на внутри- и межродовом уровне, но и на уровне семейств и даже более крупных таксономических подразделений (Lydeard, Røe, 1997; Шедько, 2002).

Проведенный анализ нуклеотидного состава выявил отклонение как в соотношении пропорций отдельных нуклеотидов, так и в соотношении пуринов и пиримидинов (Т+С):(А+Г). Пропорции (Т+С):(А+Г) составили: (1) 57,6%:42,4% для трех позиций в кодоне, (2) 60,5%:39,5% для первой позиции в кодоне, (3) 55,3%:44,7% для второй позиции,

(4) 59,9%:40,1% для третьей нуклеотидной позиции в кодоне (средняя рассчитывалась для всех камбалообразных, использованных в анализе). Такое отклонение от равновесной пропорции уже было ранее описано в литературе для многих белок-кодирующих генов (Kim et al., 2004; Kartavtsev et al., 2007). Статистический анализ нуклеотидной последовательности гена *Cyt-b* показывает значимые отклонения состава и таксономические отличия. Считается, как уже было отмечено для *Co-I*, что такие смещенные пропорции нуклеотидных оснований отражают гидрофобные свойства полипептидов, кодируемых белковыми генами (Nailor et al., 1996). Однако обнаруженные таксономические отличия (выявленная гетерогенность пропорций нуклеотидов), очевидно, существенны и для эволюции таксонов и отражают их обособленную дивергенцию (Kartavtsev et al., 2007; 2008; 2009a; b).

Оценка *p*-расстояний для различных этапов эволюционной истории показывает увеличение нуклеотидного разнообразия на (1) внутривидовом – $2,22 \pm 0,31\%$, (2) внутривидовом – $9,93 \pm 0,26\%$, (3) внутрисемейственном – $13,81 \pm 0,05\%$, и (4) внутриотрядном – $23,96 \pm 0,30\%$ уровнях (рис. 3). Учитывая существенную разницу оценок генетических расстояний между внутривидовым и межвидовым уровнями, можно объяснить эти данные реализацией в эволюции определенной модели видообразования. В частности, данные по *p*-расстояниям позволяют сделать вывод, что среди представителей отряда камбалообразные преобладает географическая модель видообразования (Dobzhansky, 1955; Ayala et al., 1974; Bush, 1975; Templeton, 1981; Mayr, 1982; King, 1993; Harrison, 1998).

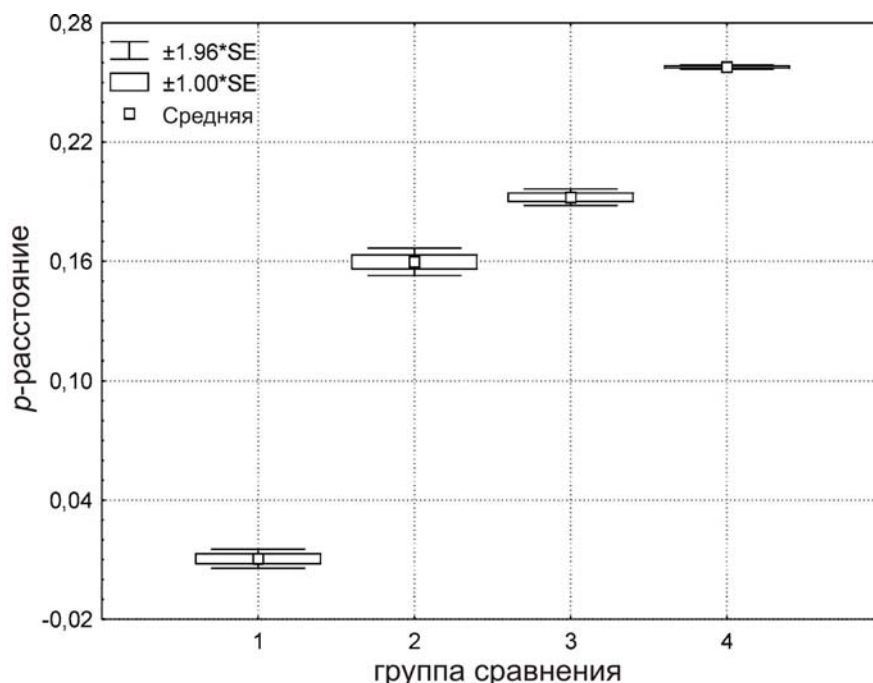


Рис 3. График результатов однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA), показывающий различие средних *p*-расстояний на четырех уровнях дифференциации камбалообразных (Pleuronectiformes) для последовательностей гена *Cyt-b*. Группы сравнения (ось X): (1) внутривидовая, для особей одного вида, (2) внутривидовая, для особей одного рода, (3) внутрисемейственная, для особей, принадлежащих к одному семейству и (4) внутриотрядная, для особей, принадлежащих к одному отряду. Средние *p*-расстояния (ось Y) даны в долях.

Основной пункт предпринимаемого в настоящей работе молекулярно-филогенетического исследования камбалообразных рыб – это монофилия семейств. В настоящее время основная информация о филогении семейств зоологическая (Cooper, Chaplau, 1998; Norman, 2006; Froese, Pauly, 2010). Однако есть исследования на этом уровне и по молекулярно-филогенетическим данным (Berendzen, Dimmick, 2002; Pardo et al., 2005).

Монофилия представленных в данном исследовании семейств (рис. 4) была поддержана, как уже отмечалось, результатами по различным молекулярным маркерам, в частности, по *12S* и *16S* рРНК (Berendzen, Dimmick, 2002; Azevedo et al., 2008) и по *16S* рРНК (Pardo et al., 2005) среди которых Soleidae, Scorptalmidae и Pleuronectidae. Исключение составляет Paralichthyidae, подразделенное на две группы, одна из которых с высокой вероятностью связана с Pleuronectidae (Pardo et al., 2005).

Согласно проведенной ревизии (Cooper, Chapleau, 1998), как отмечалось при обсуждении данных по *Co-1*, признается, что сем. Pleuronectidae – монофилетичная группа определенная десятью синапоморфиями. Данные секвенирования *Cyt-b* и реконструкция молекулярно-филогенетических деревьев четырьмя методами (MP, NJ, BA, ML) (рис. 4), подтверждают монофилию семейства, а также согласуются с предшествующими молекулярными исследованиями о его филогенетическом единстве (Berendzen, Dimmick, 2002; Pardo et al., 2005; Kartavtsev et al., 2007, 2008; Шарина, Картавцев, 2010).

Как показано на рис. 5, последовательности *Hippoglossoides robustus* и *H. elassodon* объединены в парафилетичный кластер, что в согласии данными по *Co-1* позволяет считать синонимами эти два таксона и именовать вид по приоритету описания как *Hippoglossoides elassodon* (Jordan, Gilbert, 1880). Таким образом, синонимия этих таксонов согласуется как с морфологическими (Винников, 2003) и генетико-биохимическими (Коваль, Богданов, 1982), так и с молекулярно-филогенетическими данными как минимум по фрагментам двух генов (Kartavtsev et al., 2007, 2008) и по полным последовательностям *Cyt-b*. Последнее подтверждается филогенетическим анализом полных последовательностей *Co-1*, представленным ранее (глава 3). Средние внутривидовые *p*-расстояния для таксонов *Hippoglossus* составили $0,84 \pm 0,105\%$ и не изменялись между последовательностями этих видов. Кластеризация родов и видов на представленном генном дереве *Cyt-b* согласуется с морфо-анатомическим исследованием Купера и Чаплау (Cooper, Chapleau, 1998).

Виды рода *Pseudopleuronectes* (*P. yokohamae*, *P. obscurus* и *P. herzensteini*) формируют монофилетичную ветвь, показывая принадлежность этих видов к одному роду. Это согласуется, как отмечалось, с морфо-анатомическими реконструкциями (Cooper, Chapleau, 1998), исследованиями сейсмодатированной системы (Воронина, Евсеенко, 2001; Винников, 2007), сравнением электрофоретических спектров белков (Коваль, Богданов, 1982), а также с результатами сравнительного изучения морфологии икринок, эмбрионального и

постэмбрионального развития личинок и предличинок дальневосточных камбал (Перцева-Остроумова, 1961).

Под Limanda. Виды этого рода формируют полифилетичные кластеры. Вид *L. punctatissima* формирует кластер с видами родов *Platichthys* и *Pleuronectes*. Виды *L. sakchalinensis* и *L. limanda* кластеризуются вместе и присоединяются к кластеру *Hippoglossoides*. То же обнаружено и в представленном ранее исследовании по *Co-1* (рис. 2). Монофилия и взаимоотношения *Limanda* оказались не разрешенными и в анализе Купера и Чаплау (Cooper, Chapleau, 1998) по причине гомоплазии морфологических признаков, наблюдаемой в шести видах рода *Limanda*. Виды *Limanda limanda* и *L. sakchalinensis* в исследовании этих авторов образуют монофилетичную группу.

Одно из важных свойств деревьев, построенных по гену *Cyt-b*, – это четкие отличия между различными видами одного рода для всех пяти семейств. Эти данные очень надежны и поддерживаются топологией дерева, которая формирует ближайшие внутривидовые кластеры с очень маленькими средними внутривидовыми величинами *p*-расстояний и незначительными величинами бутстреп поддержки. Эта особенность дерева показывает, что некоторые особи одного вида имеют почти идентичные последовательности.

Таким образом, представленные данные позволяют говорить о том, что диагностика видов по гену *Cyt-b*, как и по *Co-1*, является высокоэффективной в силу низкой внутривидовой и высокой межвидовой изменчивости этого маркера. Эта особенность используется в программе штрихкодирования видов на основе ДНК (<http://www.boldsystems.org/views/login.php>; <http://www.barcoding.si.edu/>; <http://ibol.org/>; <http://www.fishbol.org/>; <http://www.imb.dvo.ru/misc/barcoding/index.htm>).

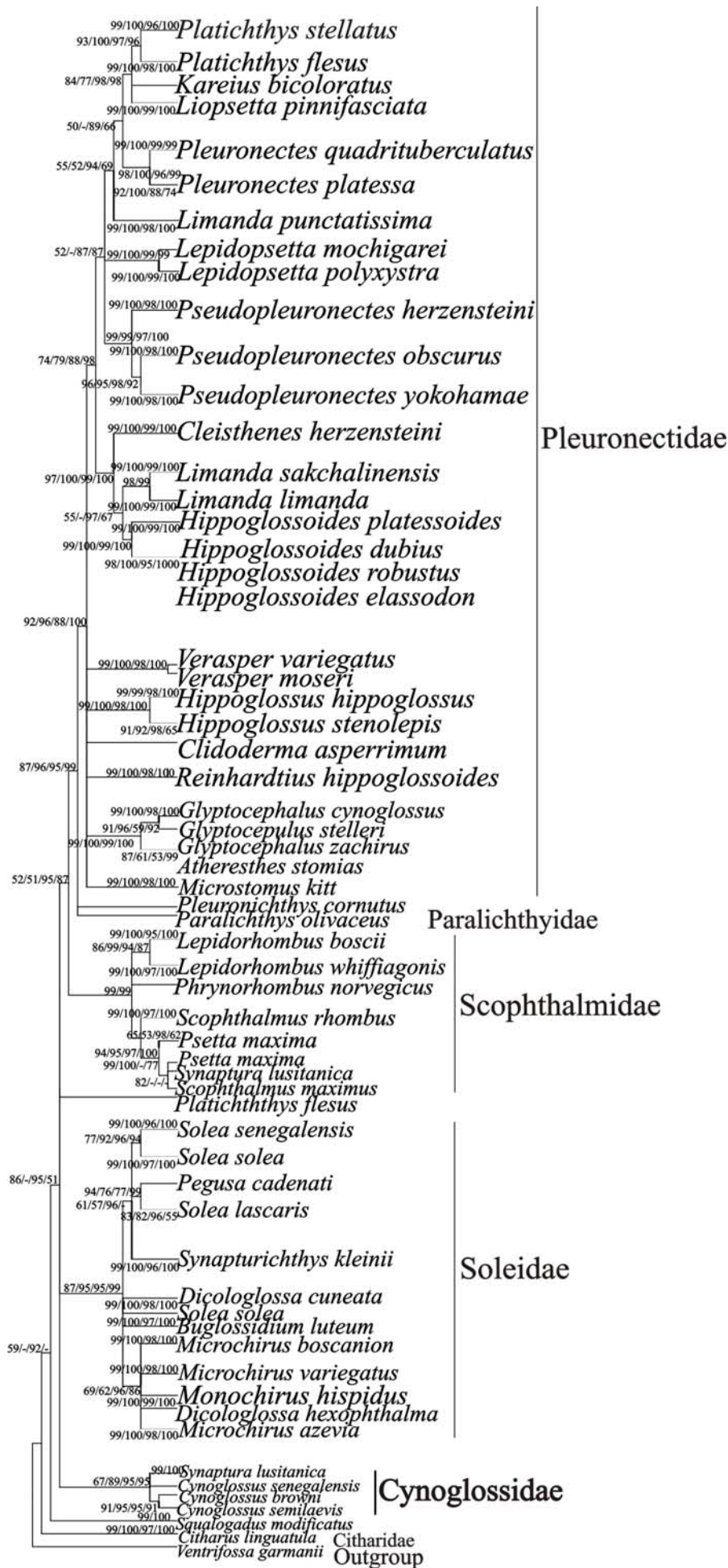


Рис. 4. Схематизация филогенетических отношений по генному дереву, построенному на основе последовательностей гена *Cyt-b*. В узлах показана бутстреп-поддержка для MP, NJ (n=1000 реплик), BA (10⁶ генераций) и ML (n=500 реплик) методов реконструкции деревьев (MP/NJ/BA/ML). Деревья укоренены по двум внешним таксонам: трескообразные (Gadiformes).

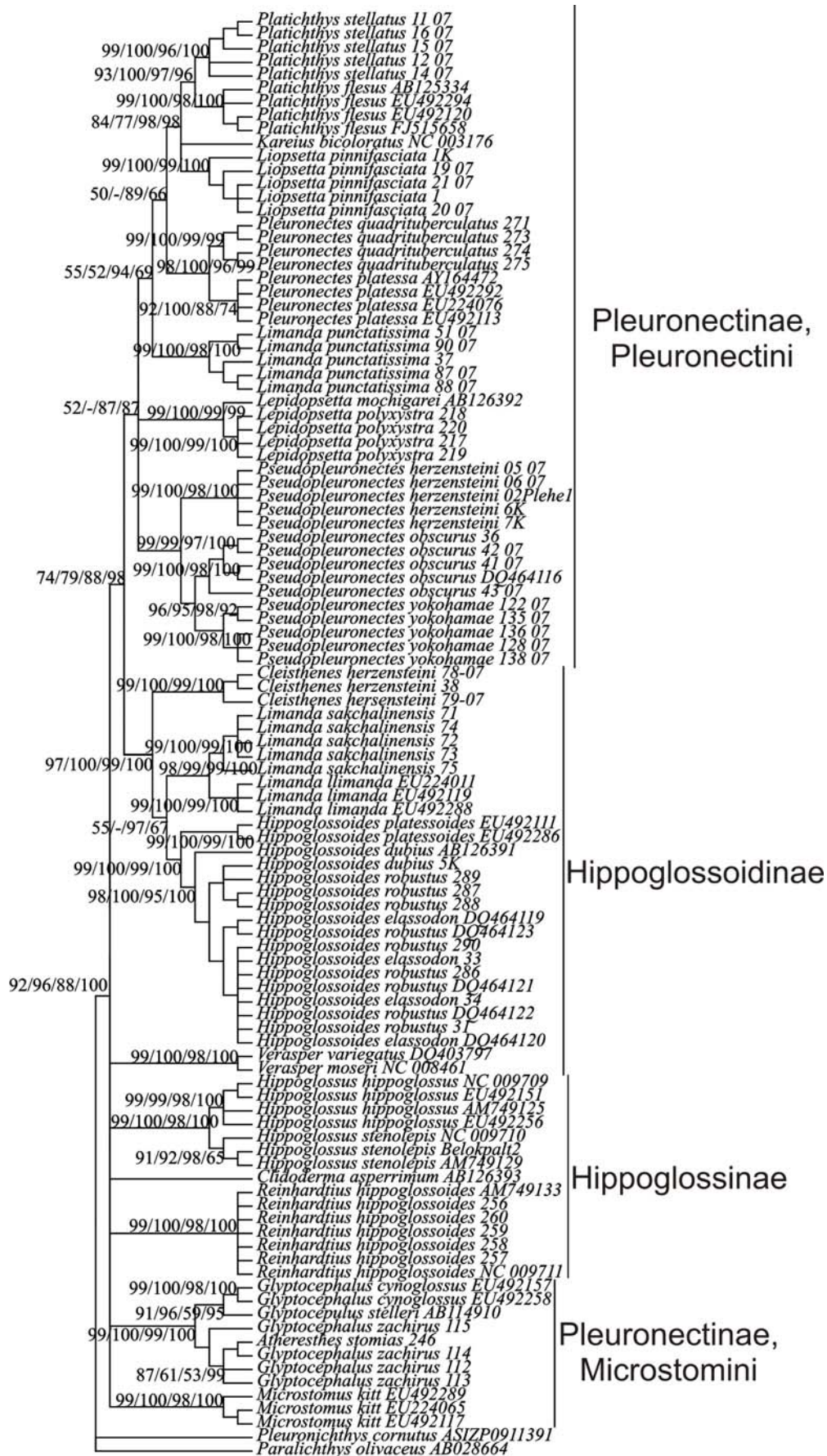


Рис. 5. Фрагмент МР-дерева, построенного на основе последовательности гена *Cyt-b* и показывающего филогенетические взаимосвязи отдельно для сем. Pleuronectidae. В узлах приведена бутстреп поддержка для МР, NJ (n=1000 реплик), ВА (10⁶ генераций) и ML (n=500 реплик) методов реконструкции деревьев (МР/НJ/ВА/ML).

Глава 5. МОЛЕКУЛЯРНО-ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ КАМБАЛООБРАЗНЫХ РЫБ, ВЫПОЛНЕННОЕ НА ОСНОВЕ ОБЪЕДИНЕННЫХ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ ГЕНОВ *Co-1* И *Cyt-b*

Для филогенетических целей последовательности генов *Co-1* и *Cyt-b* были объединены. Анализ нуклеотидного состава для объединенных последовательностей не выполнялся, так как по результатам исследования отдельных генов уже было показано смещение соотношения пуринов и пиримидинов от пропорции 50%:50%.

p-расстояния, оцененные в этом случае на трех различных уровнях иерархии, составили: (1) на внутривидовом – $0,87 \pm 0,08\%$, (2) внутривидовом – $8,89 \pm 0,36\%$ и (3) внутрисемейственном – $11,58 \pm 0,06\%$. Значения *p*-расстояний показывают возрастание уровня дивергенции с увеличением ранга таксона.

Проведенный однофакторный дисперсионный анализ показал, что средние расстояния в трех проанализированных группах для объединенных последовательностей генов *Co-1* и *Cyt-b* существенно различаются, как и по отдельным генам. Соответственно и объединение данных по двум генам дает статистически значимое увеличение *p*-расстояний в иерархии групп сравнения. Однако категоризированное представление средних значений по двум генам по отдельности и по группам сравнения более правомочно и оно показывает, что с увеличением ранга таксона (группы) имеется увеличение дивергенции для обоих генов – *Co-1* и *Cyt-b* (Картавцев, Ли, 2006).

Таким образом, эти данные подтверждают высказанное ранее предположение о преобладании среди представителей отряда камбалообразных географической модели видообразования в соответствии с биологической концепцией вида (Dobzhansky, 1955; Ayala et al., 1974; Bush, 1975; Templeton, 1981; Mayr, 1982; King, 1993; Harrison, 1998).

Как отмечалось, сем. Pleuronectidae – одно из самых больших семейств камбал. Это семейство было формально разделено на подсемейства (Chapleau, 1993; Azevedo et al., 2008). Несмотря на формальность в разделении на подсемейства, в представленном анализе некоторые из них формируют весьма устойчивые ветви. Самую крупную ветвь на представленных деревьях по трем наборам данных формирует подсемейство Pleuronectinae (рис. 6). Это подсемейство подразделяется на четыре трибы, две из которых включены в анализ (Microstomini с родами *Pleuronichthys*, *Microstomus* и *Glyptocephalus*, в данный анализ включен только род *Glyptocephalus*). В трибу Pleuronectini входит пять родов (Cooper, Chapleau, 1998). В молекулярно-филогенетический анализ были включены четыре рода: *Limanda* (*L. punctatissima*), *Platichthys* (*P. bicoloratus*, *P. flesus*, *P. stellatus*), *Pleuronectes* (*P. pinnifasciatus*, *P. quadrituberculatus*), *Pseudopleuronectes* (*P. herzensteini*, *P. obscurus*, *P. yokohamae*). Род *Lepidopsetta* (*L. mochigarei* по трем наборам данных и *L. polyxistra* по *Cyt-b*) также оказался включенным в трибу Pleuronectini, тогда как в исследовании Купера и Чаплау (Cooper, Chapleau, 1998) этот род рассматривался исключительно в составе трибы Microstomini.

Вид *Limanda sakhalinensis* по трем наборам данных и *L. limanda* (по гену *Cyt-b*) оказались включенными в ветвь подсемейства Hippoglossoidinae. Согласно представленным деревьям подсемейство Pleuronectinae может считаться монофилетичным, если исключить из

него трибу Microstomini.

В подсемейство Hippoglossoidinae включены два из трех родов *Cleisthenes* (*C. herzensteini*) и *Hippoglossoides* (*H. dubius*, *H. elassodon*, *H. robustus*).

Подсемейство Hippoglossinae содержит все пять родов, которые описаны для этого подсемейства (Cooper, Chapleau, 1998): *Reinhardtius* (*R. hippoglossoides*), *Hippoglossus* (*H. hippoglossus*, *H. stenolepis*), *Verasper* (*V. moseri*, *V. variegatus*), *Clidoderma* (*C. asperrimum*). Несмотря на то, что ветви для этого подсемейства на *Cyt-b* дереве оказались не разрешенными, этот кластер поддерживается *Co-1* и объединенными последовательностями.

Полученные молекулярно-филогенетические данные поддерживают монофилию большинства родов сем. Pleuronectidae. Однако филогения или последовательность возникновения родов внутри семейства, и особенно внутри подсемейства Pleuronectini, несмотря на хорошие статистические поддержки ветвей, остаются не вполне ясными, так как топологии деревьев для этого подсемейства по ряду позиций отличаются в трех группах проанализированных данных: по *Co-1*, *Cyt-b* и по совокупным данным для этих двух генов. Причин данной несогласованности может быть три – это (1) различная информационная емкость маркеров, (2) случайная сортировка филетических линий, обусловленная неодинаковым составом представителей (последовательностей), входивших в построенные деревья и (3) топологические и статистические ошибки, связанные с конструированием деревьев и точностью подбора модели нуклеотидных замен. Все же, более предпочтительными являются совместные данные, так как являются наиболее репрезентативными и консесусными и, соответственно, дерево, построенное по двум генам, является более надежным.

Род *Pseudopleuronectes* в представленном анализе формирует монофилетичную ветвь, что согласуется с данными по гену *Cyt-b*, а также с другими исследованиями (Коваль, Богданов, 1982; Cooper, Chapleau, 1998; Воронина, Евсеенко, 2001; Винников, 2007). Однако кластеризация видов внутри ветви *Pseudopleuronectes* отличается по генам *Co-1*, *Cyt-b* и совместно по двум генам. Таким образом, требуется также дальнейшее исследование взаимоотношений видов внутри рода *Pseudopleuronectes*.

Род *Limanda*. В данном анализе представленный род также формирует полифилетичный кластер, как уже было показано для генов *Co-1* и *Cyt-b*, что может служить свидетельством о необходимости ревизии этого таксона.

Как следует из данных, представленных на рис. 2, 4-6, виды камбал внутри отдельных родов четко отличаются генетически. Недостаток четких диагностических морфологических признаков мог создать номинальные таксоны, которые не различимы генетически. На представленном дереве виды *Hippoglossoides robustus*, *H. elassodon* и *H. dubius* формируют смешанный кластер. *P*-расстояния между этими видами составили $1,06 \pm 0,11\%$, расстояние между видами *H. robustus* и *H. elassodon* составило $1,06 \pm 0,11\%$, расстояние между последовательностями вида *H. robustus* – $1,06 \pm 0,11\%$, расстояние между последовательностями *H. elassodon* – $1,5 \pm 0,3\%$. Известно, что два первых вида достаточно сложно различать морфологически и, по-видимому, эти таксоны следует рассматривать как синонимы (Винников,

2006, Kartavtsev et al., 2007). Это предположение согласуется и с морфологическими данными (Ivankov et al., 2002; Kartavtsev et al., 2002; Vinnikov, 2003), и по первоописанию предпочтение следует отдать видовому названию *H. elassodon* (Jordan, Gilbert, 1880), как было сформулировано ранее.

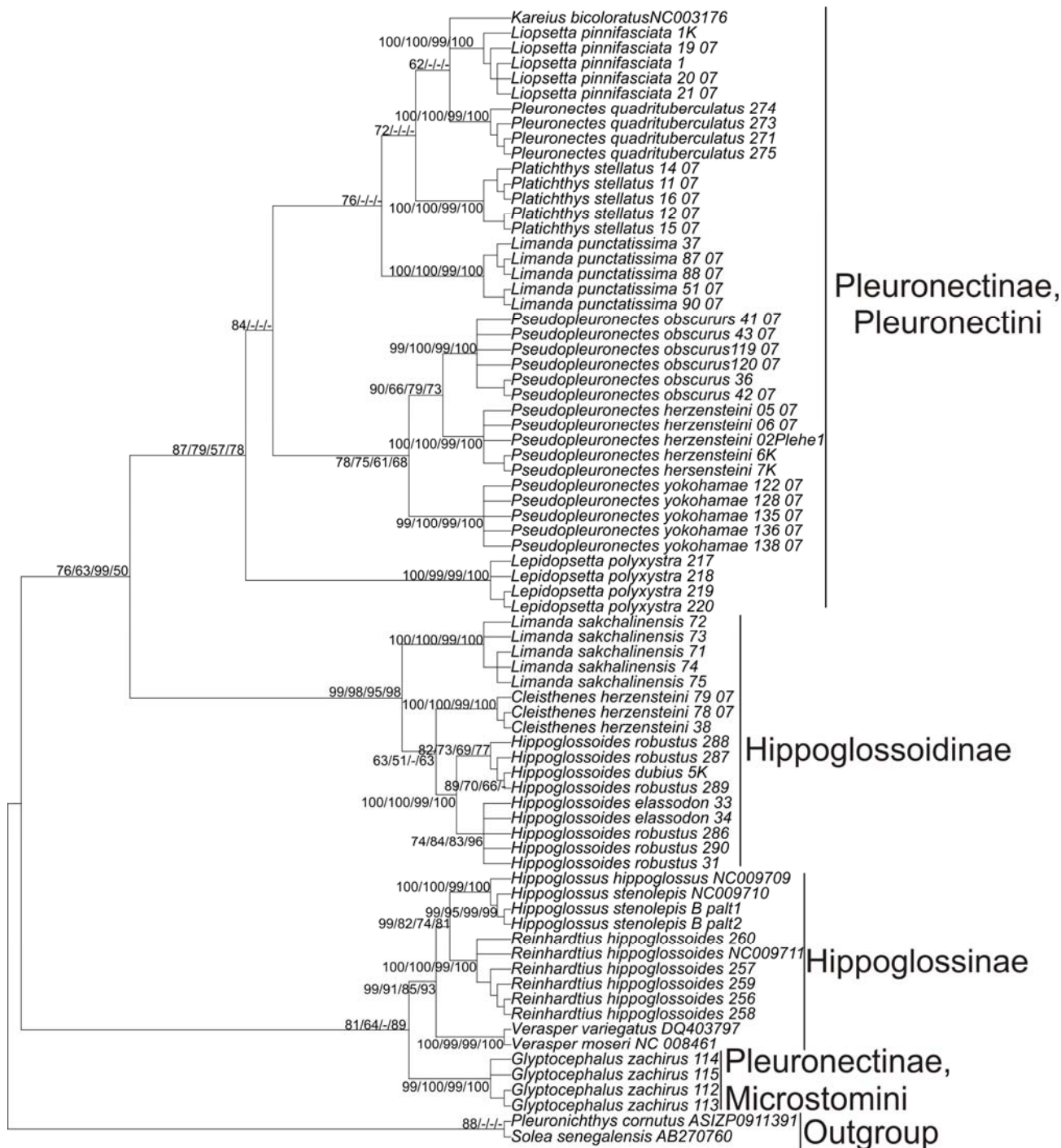


Рис. 6. Укорененное консенсусное (50%) ВА-дерево, показывающее филогенетические взаимосвязи на основе объединенных последовательностей генов *Co-1* и *Cyt-b* для сем. Pleuronectidae. Цифрами показана вероятность повторяемости узлов в 10^6 генераций для ВА или их бутстреп поддержка в 1000 реплик, соответственно для ML, MP и NJ методов реконструкции деревьев (последовательность статистической поддержки: ВА/ML/MP/NJ).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В отличие от любых морфологических признаков, которые специфичны для каждой группы организмов, молекулярные признаки обладают универсальностью (есть у всех или у подавляющего большинства организмов и присутствуют на всех стадиях жизненного цикла). Основное преимущество молекулярных методов изучения изменчивости заключается в том, что они генерируют огромные наборы дискретных признаков, причем не только тех, которые находятся под давлением отбора, но и селективно нейтральных (Банникова, 2004).

На топологию получаемых филогенетических деревьев значительное влияние оказывает выбор молекулярного маркера (Абрамсон, 2007). Для данного исследования было выбрано два митохондриальных гена – это ген *Co-1*, который широко используется в программе ДНК-штрихкодирования рыб (Hebert et al., 2003, 2005; Ward, 2005; Kartavtsev et al., 2008), и ген *Cyt-b*, который активно используется для оценки филогении рыб на внутри- и межродовом уровне, а также на уровне различных семейств и более крупных таксонов (Шедько, 2002; Банникова, 2004; Абрамсон, 2007, 2009; Kartavtsev et al., 2008).

Последовательности этих двух генов были включены в анализ, как по отдельности, так и объединены для повышения достоверности полученных топологий (Банникова, 2004).

Анализ нуклеотидного состава, выполненный для генов *Co-1* и *Cyt-b*, показал отклонение от пропорции 1:1:1:1 и отклонение в соотношении (Т+С):(А+Г), что хорошо описано в литературе для многих белок-кодирующих генов (Kim et al., 2004). В представленном исследовании это отклонение хорошо документировано статистически.

Оценка *p*-расстояний для различных этапов эволюционной истории показала увеличение нуклеотидного разнообразия с возрастанием ранга таксона по данным для нуклеотидных последовательностей генов *Co-1* и *Cyt-b*. Выявляются также различия между самими генами в степени дивергенции на четырех проанализированных уровнях, хотя суммарные средние расстояния по двум генам статистически значимо не отличаются. Таким образом, полученные данные согласуются с многочисленными литературными данными о разной скорости эволюции этих и других генов, их различных участков и неоднородности темпов эволюции (Li, 1990; Картавцев, Ли, 2006; Абрамсон, 2009).

Известно, что таксоны высшего ранга существуют дольше, чем таксоны более низкого ранга (Simpson, 1961; Nei, 1987). Таксономисты за редким исключением согласны с тем, что высшие таксоны (более или менее крупные группировки видов) представляют собой результат эволюционной дивергенции (изменений в ходе филогенеза) (Майр, 1971). Таким образом, учитывая оценки между внутривидовым и межвидовым уровнями, можно объяснить эти данные, как характеризующие определенную модель видообразования. В частности, данные по *p*-расстояниям позволяют сделать вывод, что среди представителей отряда камбалообразные преобладает географическая модель видообразования с накоплением случайных генетических изменений в течение длительного периода времени формирования подвидов, а затем видов и дальнейшей независимой эволюцией линий (Dobzhansky, 1955; Ayala et al., 1974; Bush, 1975; Templeton, 1981; Мауг, 1982; King, 1993; Harrison, 1998).

Один из центральных постулатов филогеографии состоит в том, что внутривидовые монофилетические группировки (ветви), разделенные значительными генетическими расстояниями, как правило, возникают в результате длительных внешних (биогеографических)

преград свободному потоку генов между популяциями (Avice et al., 1987). Ряд таких факторов, как подразделение популяций вида географическими преградами, расширение ареала и расселение, оказывают непосредственное влияние на характер внутривидовой генетической изменчивости (Абрамсон, 2007). Генетические различия приобретаются постепенно, в сформированных изолированных популяциях или их группах. В дальнейшем процесс дивергенции продолжается, диверсифицируются полувиды, близнецовые виды, роды и т.д. Таким образом, чем больше времени прошло с момента изоляции, тем большие генетические расстояния приобретаются между соответствующими таксонами (Картавец, Ли, 2006). Представленные сравнительные данные по первичным последовательностям генов *Co-I*, *Cyt-b* и белковым маркерам позволяют твердо говорить о реализации этого процесса до уровня семейства (Картавец, Ли, 2006) и даже отряда (Kartavtsev et al., 2009).

Одно из наиболее серьезных возражений против использования генетической дивергенции для определения видовых границ у разных таксонов состоит в том, что длительная изоляция близкородственных групп, индикатором которой служит величина дивергенции или *p*-расстояния, сама по себе не является обязательным условием (а только предпосылкой) образования новых видов (Ferguson, 2002).

Анализ филогенетических отношений выполнен на основании генных деревьев. Представленные деревья показали четыре принципиальных свойства: (1) обособленное положение таксонов внешней группы; (2) разделение на кластеры, включающие отдельные семейства Pleuronectiformes; (3) наличие кластеров, которые представляют различные роды и (4) существование кластеров, объединяющих особей одного вида в пределах одного рода.

В качестве внешней группы для исследуемых камбалообразных использовали представителей отряда трескообразные (Gadiformes). Это связано с тем, что сестринская группа для Pleuronectiformes остается не выясненной, а их происхождение от Perciformes подвергается сомнению. Трескообразные показывают хорошее разрешение на построенных деревьях, формируя обособленный кластер.

Все деревья, построенные по трем различным наборам данных (гены *Co-I*, *Cyt-b* и объединенные последовательности), показывают, что семейства, представленные в работе, формируют монофилетичные ветви. Однако достоверно можно говорить только о монофилетичности сем. Pleuronectidae, что хорошо поддерживается данными по генам *Co-I*, *Cyt-b*, *12S* и *16S* рРНК и морфологическим исследованием филогении (Cooper, Chapleau, 1998).

Все представители сем. Pleuronectidae формируют монофилетичные ветви. Полученные молекулярно-филогенетические данные поддерживают монофилию большинства родов сем. Pleuronectidae. Однако филогения представителей родов внутри семейства, особенно внутри подсемейства Pleuronectini остается неясной и требует дальнейшего исследования. Представленные в исследовании данные показывают, что последовательности генов *Co-I* и *Cyt-b* подходят для дискриминации видов, что реализуется в программе штрихкодирования видов на основе ДНК.

В дальнейшем необходим анализ новых видов и больших геномных участков. Это даст лучшее понимание взаимоотношений среди различных таксонов камбал.

ВЫВОДЫ

1. На основании представленных данных по первичным последовательностям нуклеотидов двух отдельных генов *Co-1*, *Cyt-b*, а также по объединенным данным для этих генов сем. Pleuronectidae следует считать монофилетичным. Монофилетичными являются и три других представленных в исследовании семейства: Scopthalmidae, Soleidae и Synoglossidae, за исключением семейств Paralichthyidae и Citharidae, которые были описаны ранее как полифилетичные.
2. Молекулярно-филогенетические данные, полученные по первичным последовательностям нуклеотидов генов *Co-1* и *Cyt-b*, показывают, что подсемейства Hippoglossoidinae и Hippoglossinae являются монофилетичными, подсемейство Pleuronectinae также можно считать монофилетичным, если исключить из него трибу Microstomini и рассматривать род *Lepidopsetta* в составе трибы Pleuronectini. Таксономический статус *Limanda sakhalinensis* и *L. limanda* остается не вполне ясным. Можно предложить ревизию этого таксона с приданием ему родового ранга.
3. Таксоны *Hippoglossoides robustus* и *H. elassodon* являются синонимами с предпочтением видовому названию *H. elassodon*. Положение *H. dubius* требует уточнения.
4. Идентификация видов по индивидуальным последовательностям генов *Co-1* и *Cyt-b* является высокоэффективной в силу низкой внутривидовой и высокой межвидовой изменчивости этих маркеров и может служить основой штрихкодирования видов (barcoding).
5. Значения *p*-расстояний показывают возрастание уровня дивергенции с увеличением ранга таксона. Это позволяет сделать вывод, что среди представителей отряда камбалообразные преобладает географическая модель видообразования с накоплением случайных генетических изменений в течение длительного периода времени формирования подвидов, а затем видов и дальнейшей независимой эволюцией филетических линий.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи, опубликованные в журналах из списка, рекомендованного ВАК:

1. Kartavtsev Y.Ph., Park T.-J., Vinnikov K.A., Ivankov V.N., Sharina S.N., Lee J.-S. Cytochrome *b* (*Cyt-b*) gene sequence analysis in six flatfish species (Teleostei, Pleuronectidae), with phylogenetic and taxonomic insights // *Marine Biology*. 2007. Vol. 152. P. 757–773.
2. Kartavtsev Y.P., Park T.-J., Lee J.-S., Vinnikov K. A., Ivankov V.N., Sharina S.N., Ponomarev A.S. Phylogenetic inferences introduced on cytochrome *b* gene sequences data for six flatfish species (Teleostei, Pleuronectidae) and species synonymy between representatives of genera *Pseudopleuronectes* and *Hippoglossoides* from Far Eastern seas // *Генетика*. 2008. Т. 44, № 4. С. 524–531.
3. Kartavtsev Y.P., Sharina S.N., Goto T., Balanov A.A. and Hanzawa N. Sequence diversity at cytochrome oxidase 1 (*Co-I*) gene among sculpins (Scorpaeniformes, Cottidae) and some other Scorpionfish of Russia Far East with phylogenetic and taxonomic insights // *Genes and Genomics*. 2009. Vol. 31, № 2. P. 183–197.
4. Шарина С. Н., Картавец Ю. Ф. Филогенетический анализ камбал (Teleostei, Pleuronectiformes) основанный на исследовании нуклеотидных последовательностей гена цитохромоксидазы 1 (*Co-I*) // *Генетика*. 2010. Т. 46, № 3. С. 401–407.

Статьи в других журналах:

1. Kartavtsev Y.P., Sharina S.N., Goto T., Chichvarkhin A.Y., Balanov A.A., Vinnikov K.A., Ivankov V.N., Hanzawa N. Cytochrome oxidase 1 gene sequence analysis in six flatfish species (Teleostei, Pleuronectidae) of Russia Far East with inferences in phylogeny and taxonomy // *Mitochondrial DNA*. 2008. Vol. 19, № 6. P. 479–489.
2. Kartavtsev Y.P., Sharina S.N., Goto T., Rutenko O.A., Zemnukhov V.V., Semenchenko A.A., Pitruk D.L., Hanzawa N. Molecular phylogenetics of pricklebacks and other percoid fishes from the Sea of Japan // *Aquatic Biology*. 2009. Vol. 8. P. 95–103.

Светлана Николаевна ШАРИНА

**МОЛЕКУЛЯРНО-ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ
КАМБАЛООБРАЗНЫХ РЫБ (PISCES, PLEURONECTIFORMES)
ДАЛЬНЕВОСТОЧНЫХ МОРЕЙ РОССИИ ПО НУКЛЕОТИДНЫМ
ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЯМ ГЕНОВ
ЦИТОХРОМА *b* И ЦИТОХРОМОКСИДАЗЫ 1**

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук