

На правах рукописи

ТУРАНОВ

Сергей Викторович

**ШТРИХКОДИРОВАНИЕ ВИДОВ И МОЛЕКУЛЯРНАЯ
ФИЛОГЕНЕТИКА РЫБ СЕМЕЙСТВА СТИХЕЕВЫЕ (PERCIFORMES,
STICHAEIDAE) ДАЛЬНЕВОСТОЧНЫХ МОРЕЙ РОССИИ**

03.02.07 – генетика

Автореферат диссертации на соискание учёной степени
кандидата биологических наук

Владивосток – 2013

Работа выполнена в лаборатории молекулярной систематики Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт биологии моря им. А.В. Жирмунского Дальневосточного отделения Российской академии наук

Научный руководитель:

Доктор биологических наук, профессор **Картавец Юрий Фёдорович**

Официальные оппоненты:

Брыков Владимир Алексеевич, доктор биологических наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биологии моря им. А.В. Жирмунского Дальневосточного отделения Российской академии наук, заведующий лабораторией генетики

Радченко Ольга Аркадьевна, кандидат биологических наук, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биологических проблем Севера Дальневосточного отделения Российской академии наук, и.о. директора института

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

Защита состоится 20 декабря 2013 г. в 12 часов на заседании диссертационного совета Д 005.008.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институт биологии моря им. А.В. Жирмунского Дальневосточного отделения Российской академии наук по адресу: 690041, г. Владивосток, ул. Пальчевского, д. 17.

Факс: (423)2310-900, e-mail: inmarbio@mail.primorye.ru

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

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт биологии моря им. А.В. Жирмунского Дальневосточного отделения Российской академии наук (690041, г. Владивосток, ул. Пальчевского, д. 17).

Автореферат разослан «19» ноября 2013 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук

Вашенко

М.А. Вашенко

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы. Семейство (сем.) стихеевые (Zoarcoidei: Stichaeidae) объединяет в своём составе донных, преимущественно прибрежных рыб, населяющих шельфовую зону северной части Тихого и Атлантического океанов, а также арктические воды (Mecklenburg, Sheiko, 2004; Nelson, 2006). Не представляя существенной промысловой ценности (Фадеев, 2005), стихеевые рыбы, тем не менее, полностью компенсируют этот недостаток как объект пристального внимания таксономистов (Anderson, 1994; Mecklenburg, Sheiko, 2004; Радченко и др., 2009), генетиков (Kartavtsev et al., 2009; Туранов и др., 2012), популяционных биологов (Hickerson, Cunningham, 2005), экологов (Barton, 1985) и физиологов (Пушин, Кондрашев, 2003). Но наибольшая заинтересованность к этой группе наблюдается именно со стороны систематиков как молекулярно-генетического, так и классического направлений (Stepien, 1997; Anderson, 1994; Назаркин, 2000; Mecklenburg, Sheiko, 2004; Nelson, 2006; Радченко и др., 2009; Kartavtsev et al., 2009; Туранов и др., 2012; Kwun, Kim, 2013). Этот интерес вызван тем, что представители семейства характеризуются высоким разнообразием признаков, специфические черты которых настолько изменчивы, что не могут однозначно характеризовать группу как систематическое целое (Макушок, 1958). Лишь одна особенность всех его представителей – наличие длинного спинного плавника, полностью (кроме родов *Dictyosoma*, *Cebidichthys* и *Eulophias*) состоящего из колючих лучей – даёт этой группе оригинальное название "Pricklebacks". Положение семейства в подотряде Zoarcoidei, а также естественное происхождение самой группы в его современном составе являются предметом неумолкающих дискуссий и далеки от завершения. При учёте того факта, что в подотряде Zoarcoidei за последние 10 лет было описано 44 новых вида (из них 4 – в сем. стихеевые) (Eschmeyer, Fong, 2013), возникает необходимость применения надёжной и высокопроизводительной методики для учёта биологического разнообразия на видовом уровне. Такой методикой является штрихкодирование, точнее ДНК-штрихкодирование. Созданное с целью обеспечения однозначной идентификации видовой принадлежности живых организмов при помощи молекулярно-генетических методов (Hebert et al., 2003a,b; Ratnasingham, Hebert, 2007), ДНК-штрихкодирование позволило узнать много нового о биоразнообразии на видовом уровне (Ward, 2009). Также оно способствовало усовершенствованию самой методики идентификации неизвестных особей на основе цифровых библиотек последовательностей ДНК (Ratnasingham, Hebert, 2013). Ихтиофауна территории дальневосточных морей России с позиций ДНК-штрихкодирования до сих пор остаётся мало исследованной.

Степень разработанности темы исследования. Со времени последней (и единственной) обстоятельной ревизии стихеевых (Макушок, 1958) до настоящих дней состав семейства претерпел серьёзные изменения. При этом модернизация системы шла в направлении повышения статуса входящих в него подсемейств (подсем.) до ранга самостоятельных семейств (Назаркин, 2000; Радченко, 2009), а также выведения из его состава некоторых таксонов (Радченко, 2009; Черешнев и др., 2013; Kwun, Kim, 2013). Монофилетическое происхождение семейства стихеевых рыб в связи с этим не раз

подвергалось комплексной проверке (Радченко, 2009; Kartavtsev et al., 2009; Туранов и др., 2012; Kwun, Kim, 2013), но прийти к консенсусу специалистам в данной области так и не удалось. Опыт предыдущих лет выявил также, что отношения внутри семейства, а также положение стихеевых в отряде *Zoarcoidei* могут быть рассмотрены только с привлечением максимально возможной таксономической выборки из подотряда. Все проведённые ранее исследования, за небольшим исключением (Kartavtsev et al., 2009; Черешнев и др., 2011; Туранов и др., 2012), затрагивали преимущественно таксоны высокого ранга. В то же время видовой уровень биологического разнообразия с применением методов ДНК-штрихкодирования, в этой группе остаётся до сих пор практически не изученным.

Цель и задачи исследования. Целью данной работы является исследование возможности идентификации представителей стихеевых и других бельдюговидных рыб дальневосточных морей с помощью методик ДНК-штрихкодирования, а также изучение филогенетических отношений представителей семейства стихеевые внутри группы и в системе подотряда *Zoarcoidei* на основе нуклеотидных последовательностей митохондриальных генов *Co-1* и *CytB*.

Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

1. Секвенировать нуклеотидные последовательности короткого 5'-участка гена *Co-1*, а также полные последовательности генов *Co-1* и *CytB* представителей бельдюговидных рыб.
2. Сформировать цифровую библиотеку ДНК-штрихкодов со всей необходимой информацией и поместить её в международной базе данных BOLD.
3. Провести анализ внутри- и межвидовой изменчивости короткого 5'-участка гена *Co-1* и определить приемлемость его использования для идентификации видовой принадлежности стихеевых и других бельдюговидных рыб дальневосточных морей.
4. Провести реконструкцию филогении стихеевых и других бельдюговидных рыб с использованием изменчивости неполных последовательностей 5'-участка гена *Co-1*, а также полных одиночных и объединённых нуклеотидных последовательностей генов *Co-1* и *CytB*.

Научная новизна работы. Впервые на основе оригинальной выборки представителей бельдюговидных рыб дальневосточных морей была обоснована надёжность использования ДНК-штрихкодов (ген *Co-1*) в целях идентификации известных видов, а также для обнаружения криптического биоразнообразия, сконцентрированного на видовом уровне. Выявлены случаи несоответствия морфологических и генетических маркеров видового уровня. С использованием полных последовательностей митохондриальных генов *Co-1* и *CytB* продемонстрирована высокая филогенетическая неоднородность стихеевых рыб, а также превалирование в этой таксономической группе географической модели видообразования.

Теоретическая и практическая значимость работы. Результаты, полученные в ходе настоящего исследования, могут быть полезны для понимания особенностей эволюции митохондриальных белок-кодирующих генов на разных уровнях таксономической иерархии

рыб дальневосточных морей. Некоторые аспекты частной молекулярной систематики стихеевых рыб отражают сложную эволюционную историю группы, давая, таким образом, стимул для более глубоких популяционно-генетических и филогеографических работ в будущем. Подготовлена библиотека ДНК-штрихкодов (barcodinglife.com; проект “FERU”), которая является уникальной, и в будущем поможет специалистам различных направлений без труда идентифицировать видовую принадлежность бельдюговидных рыб дальневосточных морей с помощью молекулярно-генетических методик.

Положения, выносимые на защиту.

1. ДНК-штрихкод *Co-1* является надёжным инструментом для идентификации видовой принадлежности, а также обнаружения криптического биоразнообразия стихеевых и других бельдюговидных рыб дальневосточных морей.

2. Семейство стихеевые в его общепринятом составе не является естественной группой. Каждое подсемейство в его составе заслуживает статуса самостоятельного семейства.

Вклад автора. Автор работы принимал активное участие в сборе материала (отлове рыб) в ходе экспедиций НИС «Профессор Гагаринский» в 2011 г., а также НИС «Академик Опарин» в 2012 г. Кроме того, сбор материала проводился автором на акватории залива (зал.) Восток (вблизи Морской биологической станции «Восток», зал. Петра Великого, Японское море) с 2009 по 2013 гг. Экспериментальная часть работы, подготовка библиотеки ДНК-штрихкодов, а также анализ нуклеотидных последовательностей выполнены большей частью лично автором.

Апробация результатов работы. Результаты работы представлены на годовых конференциях ИБМ ДВО РАН (Владивосток, 2011 – 2013), отраслевой научно-технической конференции «П.О.И.С.К.-2009» (Владивосток, 2009), на международном симпозиуме «Modern Achievements in Population, Evolutionary, and Ecological Genetics» (Владивосток – МБС «Восток», 2009, 2011, 2013), 50-й юбилейной Международной научной студенческой конференции «Студент и научно-технический прогресс» (Новосибирск, 2012), международной конференции «Fish Barcode of Life World Conference» (Korea. Yeosu, 2012).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 9 работ. Из них 1 статья опубликована в рецензируемом журнале из списка ВАК.

Объём и структура работы. Диссертация включает 160 страниц машинописного текста. Состоит из введения, семи глав, заключения, выводов и списка использованной литературы, а также приложения. В работе использовано 20 рисунков и 17 таблиц. Список литературы включает 149 наименований, из которых 103 на иностранных языках.

Благодарности. Считаю необходимым выразить признательность своему научному руководителю – Ю.Ф. Картавцеву за привлечение к интереснейшей научной теме и оказанное автору доверие в её разработке, а также всестороннюю помощь и поддержку в ходе подготовки настоящей работы. Искренне благодарю С.Н. Шарину, а также коллективы лаборатории Генетики и Молекулярной систематики за помощь в формировании навыков экспериментальной работы. Первичные данные не могли быть получены без высокого

профессионализма А.Д. Кухлевского и Д.М. Атопкина. За постоянную помощь и консультации в области частной таксономии стихеевых рыб бесконечно благодарен В.В.Земнухову, а также сотрудникам лаборатории Ихтиологии ИБМ ДВО РАН А.А.Баланову и П.А. Савельеву. Неценима помощь В.В. Земнухова, А.А. Баланова, И.И. Глебова, В.В.Липинского, Е.Г. Рейзмана при формировании локальной коллекции рыб. Автор благодарит коллектив Лаборатории геномики морских организмов (KIOST, Республика Корея) Тагым Чон, Михэ Канн, Кире Чон и заведующего этой лабораторией профессора Юн-Хо Ли за предоставленную возможность работать в комфортных условиях и получение качественных данных. Автор бесконечно признателен родным и близким за неоценимое терпение и поддержку.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

ГЛАВА 1. СЕМЕЙСТВО СТИХЕЕВЫЕ И ЕГО ПОЛОЖЕНИЕ В СИСТЕМЕ ПОДОТРЯДА ZOARCOIDEI

В главе описаны основные этапы развития представлений о системе стихеевых рыб со времени обстоятельной ревизии Макушка (Макушок, 1958) до настоящих дней, а также представлена информация о современном положении и таксономическом составе семейства. Наиболее интенсивно филогенетические отношения в семействе стали рассматривать с появлением молекулярно-генетических методик. Основным результатом по итогам проведённых исследований можно считать обнаружение полифилетичности семейства стихеевых, что повлекло за собой признание отсутствия естественного положения данной группы в системе подотряда Zoarcoidei (Радченко и др., 2009а, 2010а; Радченко и др., 2012б; Туранов и др., 2012; Kwun, Kim, 2013). Из первоначального состава семейства в установленном Макушком объёме были выведены с признанием самостоятельного статуса таксоны Neozoarcinae (Радченко и др., 2009а; Радченко и др., 2012б; Kwun, Kim, 2013), Xiphisteridae и Cebidichthyidae (Черешнев и др., 2012; Черешнев и др., 2013), а также Eulophiidae (Радченко и др., 2012б; Kwun, Kim, 2013). Предположение о самостоятельном статусе всех подсемейств, входящих в состав семейства Stichaeidae (Назаркин, 2000), подтверждено с использованием генетических расстояний (Радченко и др., 2009а), но требует проверки с привлечением оригинальных данных. В то же время, имеется противоположная точка зрения, согласно которой стихеевые – монофилетическая группа (Kartavtsev et al., 2009). Все перечисленные достижения базировались на рассмотрении филогении таксонов высокого ранга (от рода и выше), тогда как видовой уровень биологического разнообразия не привлекался к рассмотрению ни в семействе Stichaeidae ни в подотряде Zoarcoidei. В настоящей работе это реализовано с помощью методик ДНК-штрихкодирования.

ГЛАВА 2. ДНК-ШТРИХКОДИРОВАНИЕ КАК НАДЁЖНЫЙ МЕТОД ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ И ИЗУЧЕНИЯ БИОЛОГИЧЕСКОГО РАЗНООБРАЗИЯ РЫБ

В разделе приводятся сведения о направлении ДНК-штрихкодирования, его основных методологических проблемах, а также базовой стратегии работы в этом направлении. Дальневосточные моря России благодаря сложному рельефу с богатой геологической

историей шельфа, наличию множества заливов и широтному градиенту температур обеспечивают один из крупнейших центров происхождения холодноводной ихтиофауны (Линдберг, 1972; Шмидт, 1950; Briggs, 2003). Множество описанных в последнее время видов в подотряде Zoarcoidei (Eschmeyer, 2013) может свидетельствовать о потенциальном недоучёте биологического разнообразия. Проверка данного предположения осуществима при помощи методов ДНК-штрихкодирования, сосредоточенных на изучении разнообразия живых организмов с применением средств молекулярной генетики и биоинформатики (Hebert et al., 2003 a,b). Наиболее важной задачей направления является поиск участков генома, особенности изменчивости которых позволяют эффективно и в короткий срок идентифицировать вид на качественном уровне (графический штрихкод) или по значениям генетических расстояний. Несмотря на имеющиеся недостатки митохондриальной ДНК как филогенетического маркера (предковый полиморфизм, псевдогены, интрогрессия) главным источником ошибок в ДНК-штрихкодировании рыб является изначально неверное определение видовой принадлежности ваучерных экземпляров (Becker et al., 2011). Ихтиофауна смежных с дальневосточными морями России акваторий северной части Тихого океана (Wang et al., 2012; Zhang, 2011; Kim et al., 2012; Zhang, Hanner, 2011; Mecklenburg et al., 2011; Steinke et al., 2009) уже исследована с применением методик ДНК-штрихкодирования. С российской стороны данная область ограничена работами с частичным применением методик направления (Kartavtsev et al., 2009; Шарина, Картавцев, 2010; Батищева и др., 2011; Туранов и др., 2012; Пустовойт, Юсупов, 2012). Осложняет ситуацию наличие диаметрально противоположных взглядов на данное направление в России (Шнеер, 2009; Гречко, 2013), что говорит о необходимости разъяснения его базовых принципов. Стратегия в ДНК-штрихкодировании сводится к нескольким основным составляющим: таксономически максимально возможная выборка для определённого района исследования; создание библиотеки ДНК-штрихкодов (ДНК-ШК) с привлечением исчерпывающих данных о месте поимки экземпляра, таксономических данных, представление его фотографий, а также последовательностей целевого участка генома, который был выбран как наиболее подходящий для исследуемой таксономической группы (для рыб – *Co-1*) (Ivanova et al., 2007; Becker et al., 2011); анализ изменчивости нуклеотидных последовательностей на разных таксономических уровнях, с концентрацией внимания на уровнях вид – род (проверяется соотношение внутривидовой изменчивости между особями одного вида и межвидовая изменчивость между особями разных видов в составе одного рода); построение филогенетического NJ-дерева (визуализация генетических расстояний), отражающего монофилию либо полифилию видового таксона относительно изменчивости выбранного маркера; интерпретация данных и обоснование приемлемости использования выбранного молекулярного ДНК-ШК для идентификации принадлежности вида к одному таксону на основе составленной библиотеки.

ГЛАВА 3. БЕЛОК-КОДИРУЮЩИЕ ГЕНЫ *Co-1* И *CytB* МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ ДНК КАК ПОДХОДЯЩИЙ ИНСТРУМЕНТ ДЛЯ РЕКОНСТРУКЦИИ ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКИХ СВЯЗЕЙ

Не являясь принципиальным движителем эволюции, мтДНК опосредованно сопровождает эволюционную историю в популяциях организмов и помогает проследить генеалогию видовых линий (Castro et al., 1998). Большое количество копий мтДНК в клетке, устойчивость к структурным перестройкам, редкая встречаемость дупликаций и рекомбинаций, а также отсутствие интронов делают митохондриальную ДНК надёжным филогенетическим инструментом (Gissi et al., 2008). Большая в сравнении с ядерным геномом скорость накопления мутаций (Brown et al., 1979) позволяет продуцировать филогенетический сигнал, способный проследить даже эволюционную историю популяций на протяжении коротких отрезков времени. Клональная наследуемость митохондриального генома в отличие от ядерного приводит к уменьшенной эффективной численности популяции, что, в свою очередь, ведёт к меньшему ожидаемому времени коалесценции и большей вероятности, что митохондриальное генное дерево в итоге будет соответствовать видовому дереву (Moore, 1995). Недостатки мтДНК как филогенетического маркера подробно освещены в литературе (Sorenson, Quinn, 1998; Zhang, Hewitt, 1996; Bensasson et al., 2001; Galtier et al., 2009), и в большинстве случаев могут быть обнаружены не ранее стадии анализа данных. Продукты митохондриальных генов *Co-1* и *CytB* участвуют в переносе электронов и являются частью комплексов, способствующих поддержанию трансмембранного протонного градиента для синтеза АТФ в клетке. Важность выполняемой функции указывает на консервативность последовательностей этих генов. Оправданность использования их в филогенетических реконструкциях бельдюговидных рыб подтверждена во многих работах (Радченко и др., 2009а; Kartavtsev et al., 2009; Туранов и др., 2012; Черешнев и др., 2013; Kwun, Kim, 2013).

ГЛАВА 4. ХАРАКТЕРИСТИКА ВЫБОРКИ, ХОД РАБОТЫ И МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

4.1 Сбор материала и получение нуклеотидных последовательностей

Основной материал диссертации скомпонован в три раздела: ДНК-штрихкодирование, филогенетические реконструкции по неполным последовательностям 5'-участка гена *Co-1* и филогенетический анализ полных последовательностей генов *Co-1* и *CytB* (Таблица 1). Под полными последовательностями в настоящей работе принято понимать 1340 п.о. (пар оснований) гена *Co-1* и 941 п.о. гена *CytB*.

Материал был собран из траловых уловов в Беринговом и Охотском морях в ходе экспедиций на научно-исследовательском судне «ТИНРО» в 2008 и 2011 гг. Часть материала в Охотском море собрана в ходе рейсов НИС «Профессор Гагаринский» в 2011 г. и НИС «Академик Опарин» в 2012 г. В Японском море отлов рыб проводился в 2009 - 2012 гг. с помощью жаберных сетей, малькового невода и ловушек, большей частью на территории

Таблица 1. Таксономическое богатство выборки и объём проанализированного материала для 3 частей работы

ДНК- штрихкодирование	186 последовательностей <i>Co-1</i> (600 п.о.)			Полностью оригинальные
	41 вид			
	27 родов			
	5 семейств			
Филогения на основе неполных последовательснотей 5'-участка гена <i>Co1</i>	95 последовательностей <i>Co-1</i> (524 п.о.)			В их числе 25 из GenBank NCBI
	36 видов			
	30 родов			
	5 семейств			
Филогения на основе полных последовательностей <i>Co-1</i> и <i>CytB</i>	184 <i>Co-1</i> (1340 п.о.)	205 <i>CytB</i> (941 п.о.)	169 объединённых (2281 п.о.)	В их числе 14 из GenBank
	53 вида			
	34 рода			
	10 семейств			
	3 отряда			

МБС «Восток». Видовая принадлежность рыб оценивалась с использованием определителей по ихтиофауне дальневосточных морей (Таранец, 1937; Линдберг, Красюкова, 1975). Выделение геномной ДНК из зафиксированной в 96% этиловом спирте мышечной ткани проводили с помощью хлороформ-фенольного метода (Маниатис и др., 1984) с небольшими модификациями. Амплификация участков митохондриальной ДНК, принадлежащих последовательностям генов *Co-1* и *CytB*, проводилась с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) при использовании групп-специфичных и универсальных праймеров (Таблица 2).

В состав реакционной смеси для ПЦР, объёмом 10 мкл, входили следующие компоненты: 6.4 мкл деионизированной H_2O , 0.5 мкл 10 mM смеси дезоксинуклеотидтрифосфатов (dNTPs), 1 мкл 10 × ПЦР буфера (Evrogen), 0.4 мкл 50 mM $MgCl_2$, 0.3 мкл 10 mM раствора прямого и обратного праймеров (или 0.6 мкл смеси для коктейля праймеров), 0.1 мкл Taq-полимеразы (Evrogen), а также 1 мкл раствора геномной ДНК. Температурный алгоритм ПЦР включал предварительный нагрев при 94°C – 2 мин., затем 35 циклов по схеме: денатурация при 94°C – 30 сек., отжиг при 52°C – 40 сек., элонгация при 72°C – 1 мин.; заключительная элонгация выполнялась в течение 10 мин. Проверка результатов амплификации фрагментов мтДНК была проведена с помощью электрофореза ампликонов в 1% агарозном геле (Helicon) с последующей обработкой бромистым этидием и экспонированием геля в трансиллюминаторе под проходящим ультрафиолетовым светом. Успешно амплифицированные продукты использовали для циклосеквенирования, с применением специального набора (BigDye Terminator v3.1 Cycle

Таблица 2. Праймеры, использованные для получения последовательностей мтДНК бельдюговидных рыб

Название праймера	Последовательность праймера в направлении 5'→ 3'	Источник
5' - участок гена <i>Co-1</i> (~650 п.о.)		
FishF1	TCAACCAACCACAAAGACATTGGCAC	(Ward et al., 2005)
FishF2	TCGACTAATCATAAAGATATCGGCAC	(Ward et al., 2005)
FishR1	TAGACTTCTGGGTGGCCAAAGAATCA	(Ward et al., 2005)
FishR2	ACTTCAGGGTGACCGAAGAATCAGAA	(Ward et al., 2005)
VF2_t1	TGTAAAACGACGGCCAGTCAACCAACCACAAAGACA TTGGCAC	(Ivanova et al., 2007)
FishF2_t1	TGTAAAACGACGGCCAGTCGACTAATCATAAAGATA TCGGCAC	(Ivanova et al., 2007)
FishR2_t1	CAGGAAACAGCTATGACACTTCAGGGTGACCGAAGA ATCAGAA	(Ivanova et al., 2007)
FR1d_t1	CAGGAAACAGCTATGACACCTCAGGGTGTCCGAARA AYCARAA	(Ivanova et al., 2007)
Ген <i>Co-1</i> (~1500 п.о.)		
FishF1	TCAACCAACCACAAAGACATTGGCAC	(Ward et al., 2005)
FishF2	TCGACTAATCATAAAGATATCGGCAC	(Ward et al., 2005)
H7480-Ser	ATG TGG YTG GCT TGA AA	(Miya, Nishida, 1999)
Ген <i>CytB</i> (~1100 п.о.)		
B5	CAATGGCAAGCCTACGAAAA	(Радченко и др., 2009)
B6	AGCTACTAGTGCATGACCATC	(Радченко и др., 2009)

Sequencing Kit; Applied Biosystems Inc.) и последующим секвенированием в прямом и обратном направлении на базе секвенаторов ABI Prism DNA sequencer в ИБМ ДВО РАН и ДВФУ (Дальневосточный Федеральный Университет). Часть экспериментальной работы выполнена на базе лаборатории Молекулярной генетики морских организмов (KIOST, Республика Корея) с секвенированием в компаниях Macrogen и Solgent. Создание консенсусных последовательностей проводили с использованием программы ChromasPro 1.34. Выравнивание наборов последовательностей осуществляли в программном пакете MEGA 5 (Tamura et al., 2011) с помощью алгоритма Muscle (Edgar, 2004). Для проверки

корректности рамки считывания 5'-участка неполной последовательности гена *Co-1* при выравнивании использовали последовательность *Lycodes plearis* из работы (Steinke et al., 2009) При проверке рамки считывания гена *CytB*, а также полного *Co-1* использовали фрагменты последовательности митохондриального генома *Lycodes toyamensis* (Miya et al., 2003).

4.2 Методика и ход работы при ДНК-штрихкодировании

Последовательности ДНК-ШК вместе с их хроматограммами и фотографиями экземпляров размещены в BOLD (Ratnasingham, Hebert, 2007) на странице проекта “FERU”, а также в GenBank NCBI (Geer et al., 2010). Анализ и визуализацию результатов изменчивости нуклеотидных последовательностей проводили как на филогенетическом дистрибутиве BOLD, так и с использованием локальных пакетов программ: MEGA 5 и R (R Development Core Team). Филогенетические деревья были построены при помощи алгоритма ближайшего соседства (NJ) (Saitou, Nei, 1987) на основе генетических расстояний, которые рассчитывали с использованием двухпараметрической модели Кимуры (K2P) (Kimura, 1980), а также некорректированных генетических расстояний (*p*-расстояния) (Nei, Kumar, 2000). В основе аргументации в целях унифицирования использованы генетические расстояния K2P. Инструмент для построения диаграмм (McGill et al., 1978), интегрированный в программный пакет R, использовали для отображения изменчивости в рамках таксономических уровней: «вид» – внутривидовые генетические расстояния, «род» – межвидовые расстояния в пределах одного рода, «семейство» – межвидовые расстояния последовательностей, принадлежащих разным родам в пределах одного семейства. Диаграмма распределения значений K2P-расстояний (Рисунок 1) отображает медиану (центральный стержень), межквартильный диапазон (разброс) – расстояние между нижним и верхним квартилями, который образует «ящик» диаграммы, а также «усы» – значения, удалённые на 1.5 межквартильных диапазона от нижнего и верхнего квартилей, соответственно. Точки, лежащие вне «усов», рассматриваются как, «выбросы», и отображаются на графике в виде маленьких кружков отдельно (Шипунов и др., 2012).

4.3 Методика и ход работы при реконструкции филогенетических отношений на основе генов *Co-1* и *CytB*

Анализ методом максимальной парсимонии (MP), сводится к поиску топологии дерева (или группы деревьев), требующего наименьшего количества эволюционных преобразований между любыми 2 последовательностями в наборе данных (Nei, Kumar, 2000; Swofford, Sullivan, 2009). Метод MP является альтернативой по отношению к другим, традиционно используемым в молекулярно-филогенетических работах, поскольку не требует знания эволюционных моделей нуклеотидных замен. Для поиска наилучшей топологии был выполнен эвристический метод, начинавшийся с 10 стартовых случайных деревьев.

Остальные методы требуют определения строгой гипотезы об эволюции нуклеотидных последовательностей в виде модели. Модель эволюции – это совокупность предположений об особенностях эволюционных изменений, которые позволили некой предковой последовательности эволюционировать в набор анализируемых

последовательностей (Nei, Kumar, 2000; Felsenstein, 2004; Posada, 2009). Поиск наиболее приемлемой модели был осуществлён в программе jModelTest 2 (Darriba et al., 2012) путём расчета значений максимального правдоподобия для 88 моделей, из которых при помощи информационного критерия Акаике (AIC; Akaike, 1974) были выбраны наилучшие (Таблица 3).

Схема эвристического поиска ML-дерева (максимум правдоподобия) в общих чертах повторяет таковую в МР-анализе. Детали изложены в тексте диссертации.

Таблица 3. Параметры моделей, выбранных при поиске в jModelTest 2 согласно информационному критерию Акаике (AIC)

Набор данных	Наиболее подходящая модель эволюции согласно AIC	Доля неизменных сайтов	α -параметр γ -распределения
5'-участок <i>Co-1</i> (524 п.о.)	GTR+I+G	0.56	0.9
5'-участок <i>Co-1</i> (1340 п.о.)	TIM2+I+G	0.58	1.091
<i>CytB</i> (941 п.о.)	TIM1+I+G	0.542	1.116

В основе байесовского метода (Bayesian Inference или Bayesian Analysis, BI) – байесовская теорема, позволяющая по известному факту события вычислить вероятность того, что оно было вызвано определённой причиной. Суть байесовского анализа сводится к последовательному нахождению априорных вероятностей эволюционной модели и критерия правдоподобия из пространства вероятностей, а затем и апостериорной вероятности для гипотезы (модели) в анализе, и тем самым изменению знаний о гипотезе на основе имеющихся данных. Для расчета параметров, которые принимает гипотеза, формируется частичная выборка параметров из распределения апостериорной вероятности с помощью метода Монте-Карло с цепями Маркова (Ronquist et al, 2009). Подробности BI-подхода также приведены в тексте диссертации.

Для достижения конвергенции в пике пространства апостериорных вероятностей деревьев и параметров модели было запущено 2 одновременных пробегов с генерацией 1000000 поколений. В анализе было задано 4 цепи Маркова: 1 «холодная» и 3 «горячих». Запись в файл значений апостериорных вероятностей параметров и топологий деревьев производилась каждые 100 поколений. Среднее стандартное отклонение частот расхождения логарифмов правдоподобия в конце итераций или пробегов (runs, ранов) для *Co-1* достигло 0.011, указывая на достижения равновесия в пике пространства апостериорной вероятности. Значения того же показателя для *CytB* – 0.012725, для объединённого набора данных – 0.011616. Значение PSRF (Potential Scale Reduction Factor) было близко к 1 (от 1.000 до 1.001). Значение EES (Estimated Sample Size) лежало в пределах от 135 до 1397. Показатели дают информацию о качестве выборки параметров в ходе пробегов (PSRF), а также о

её достаточности (EES). Для *CytB* значение PSRF варьировал от 1.000 до 1.005, EES – от 118 до 1658. Для объединённого набора данных PSRF от 1.000 до 1.006, EES – от 133 до 1630. При анализе короткого участка *Co-1* среднее стандартное отклонение достигло 0.01302. PSRF варьировал от 1.000 до 1.003, EES – от 121 до 1537. На 25% первых поколений приходился «прожиг». Из остального массива (всего 15002 дерева из 2 пробегов) были сформированы консенсусные деревья. При этом узлы деревьев, значения апостериорной вероятности которых были менее 0.5, на стадии формирования консенсусного дерева подвергались коллапсированию.

Алгоритм связывания ближайшего соседа (NJ) находит единственно верное дерево на основе матрицы генетических расстояний (Saitou, Nei, 1987). При этом в отличие от всех предыдущих способов необходимо найти кратчайшее дерево с длинами ветвей, значения которых согласуются со значениями попарных расстояний в матрице (Saitou, Nei, 1987). Как наиболее подходящая модель, которую можно задать в программном пакете MEGA 5 при построении дистанционных деревьев, была выбрана модель Tamura-Nei (Таблица 3). Для оценки устойчивости топологии полученных деревьев использовался бутстреп-тест (Felsenstein, 1985). Количество реплик бутстрепа: 500 – для MP и ML, 1000 – для NJ. В случае, если оценка бутстрепа определённого узла была менее 50 %, узел на дереве коллапсировался. Визуализация деревьев была выполнена в программах MEGA 5 (Tamura et al., 2011) и FigTree v 1.4.0 (FigTree).

ГЛАВА 5. ДНК-ШТРИХКОДИРОВАНИЕ СТИХЕЕВЫХ И ДРУГИХ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ БЕЛЬДЮГОВИДНЫХ РЫБ ДАЛЬНЕВОСТОЧНЫХ МОРЕЙ РОССИИ

Среднее значение внутривидовой изменчивости для бельдюговидных рыб по гену *Co-1* составило одинаковую величину в шкале K2P и *p*-расстояния – 0.34 % (Таблица 4), что примерно в 20 раз меньше среднего значения генетического расстояния между особями разных видов в пределах одного рода (6.76 %), тогда как изменчивость в пределах семейства для особей из разных родов составила в среднем 12.51 %, что примерно в 37 раз выше её внутривидового значения, в целом отражая ступенчатое увеличение изменчивости с повышением уровня таксономической иерархии.

Выбросы значений внутривидовой изменчивости (от 1.24 до 6.11 %) сформированы последовательностями *Stichaeus ochriamkini*, *Bathymaster signatus*, *Leptoclinus maculatus*, *Opisthocentrus ocellatus*, а также *Lumpenus sagitta* (Рисунок 1).

В большинстве случаев (34 вида из 41, 82.9 %) значения внутривидовых и межвидовых генетических расстояний не перекрываются между собой. Вместе с монофилией видовых кластеров на филогенетическом дереве это подтверждает способность стандартизированного участка последовательности гена *Co-1* как ДНК-штрихкода однозначно идентифицировать видовую принадлежность вышеуказанных видов.

Таблица 4. Генетические расстояния (K2P и *p*-расстояния, %) в пределах видов, родов и семейств.

Сравниваемые группы	Количество сравнений	Минимум	Нижний квартиль	Медиана
Вид	466	0 / 0	0 / 0	0.15 / 0.15
Род	558	0.46 / 0.46	4.14 / 3.99	5.29 / 5.07
Семейство	7032	6.47 / 6.14	11.59 / 10.6	12.89 / 11.66
Сравниваемые группы	Средняя	Верхний квартиль	Максимум	Стандартная ошибка
Вид	0.34 / 0.34	0.46 / 0.46	6.11 / 5.88	0.001 / 0.001
Род	6.76 / 6.30	8.19 / 7.66	14.18 / 12.73	0.007 / 0.006
Семейство	12.51 / 11.33	13.82 / 12.42	16.97 / 14.85	0 / 0

Примечание. K2P и *p*-расстояния даны через косую черту.

Все значения внутривидовой изменчивости «успешных» в отношении ДНК-штрихкодирования видов, укладываются в условный порог, приблизительно равный 2 % (Рисунок 1).

Данное пороговое значение принято для возможности идентификации видовой принадлежности: неизвестный экземпляр, показывающий значение дивергенции относительно известного более чем в 2 %, весьма вероятно, принадлежит новому виду (Ward, 2009). Оставшиеся 7 видов (17.1 %) проявляют устойчивое отклонение от данного значения либо в сторону увеличения внутривидовой изменчивости – *L. sagitta* (2.02 – 6.11 %), либо в сторону уменьшения межвидовой дивергенции (1.75 – 0.46 %). К последним относятся *S.grigorjewi*, *S. nozawae*, *B. zestum*, *B. brunneum*, *Zoarcis elongatus*, *Z. andriashevi*. Однако, филогенетическое дерево показывает неопределённость в форме поли- и парафилии только для таксонов *Lumpenus* и *Bothrocara*, соответственно.

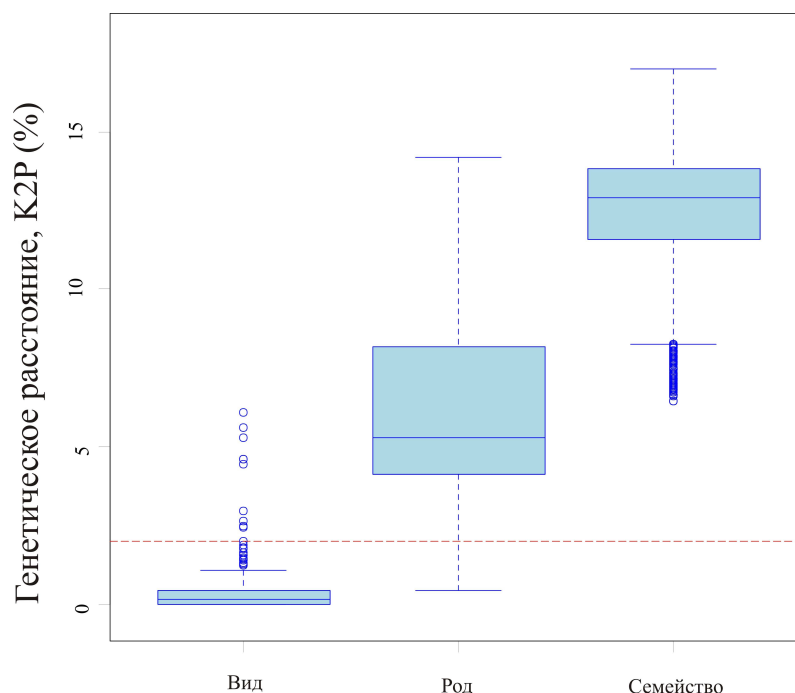


Рисунок 1. Диаграмма распределения значений генетических расстояний K2P бельдюговидных рыб. Для категории «Вид» дана величина внутривидовой изменчивости, для категории «Род» - значение межвидовой дивергенции, для категории «Семейство» – значения межвидовой дивергенции между особями разных родов в пределах одного семейства. Прерывистой горизонтальной линией указан условный универсальный 2%-ный порог разграничения внутри- и межвидовой изменчивости (Ward, 2009).

Из 6 видов, чьи значения межвидовой дивергенции меньше 2 %, *Z. elongatus*, *Z. andriashevi*, *B. zestum* и *B. brunneum* могут быть идентифицированы с помощью *Co-1* ввиду наличия «Barcoding gap». Значения межвидовых генетических расстояний *S. grigorjewi* и *S. pozawae* перекрываются, что отрицает возможность использования выбранного гена для их идентификации.

ГЛАВА 6. МОЛЕКУЛЯРНО-ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ НЕКОТОРЫХ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ БЕЛЬДЮГОВИДНЫХ РЫБ (PERCIFORMES, ZOARCOIDEI) ДАЛЬНЕВОСТОЧНЫХ МОРЕЙ, ОСНОВАННОЕ НА НЕПОЛНОЙ НУКЛЕОТИДНОЙ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ МИТОХОНДРИАЛЬНОГО ГЕНА ЦИТОХРОМОКСИДАЗЫ 1 (CO-1)

Топология деревьев для уровней иерархии выше родового, как правило, не была полностью разрешенной (Рисунок 2). Наиболее хорошо поддержаны и обособлены только ветви сем. Zoarcidae и подсем. Opisthocentrinae (Stichaeidae). Это позволяет говорить о недостаточной информационной ёмкости использованных последовательностей длиной 524 п.о. для разрешения взаимоотношений большинства таксономических групп рангом выше рода. Так, в данной топологии неопределённым остаётся положение Stichaeidae и Bathymasteridae. Обособление групп родов *Xiphister* и *Cebidichthys* + *Esselenichthys* может

служить подтверждением для выведения из состава стихеевых рыб самостоятельных таксонов и Cebidichthyidae (Черешнев и др., 2012; Черешнев и др., 2013).

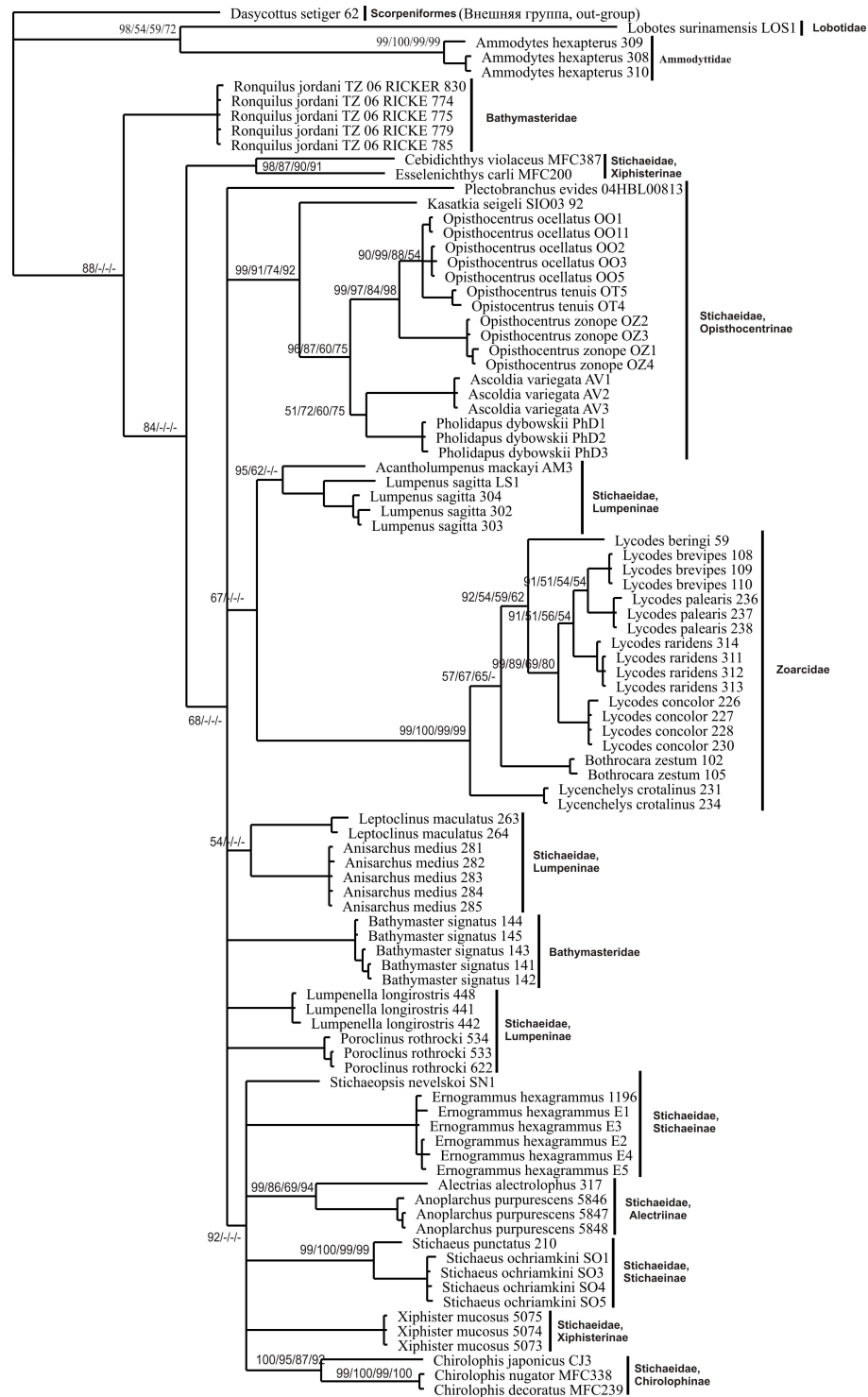


Рисунок 2. Укоренённое консенсусное дерево, показывающее филогенетические взаимоотношения бельдюговидных рыб, основанные на данных 95 последовательностей нуклеотидов гена *Co-1*. Поддержка показана для узлов, разрешающихся в более 50 % реплик бутстрепа (ML, MP, NJ) или имеющих апостериорную вероятность более 50 % (BI). Рядом с узлами показана их статистическая поддержка в порядке: BI, NJ, MP, ML. Прочерк здесь и далее обозначает отсутствие поддержки в том или ином алгоритме. (По: Туранов и др., 2012).

Однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA) изменчивости p -расстояний последовательностей нуклеотидов внутри групп и между группами сравнения (Рисунок 3) выявил значимые различия средних значений в четырех группах: $F = 1075.5$; d.f. = 3; 4192; $P < 0.0001$.

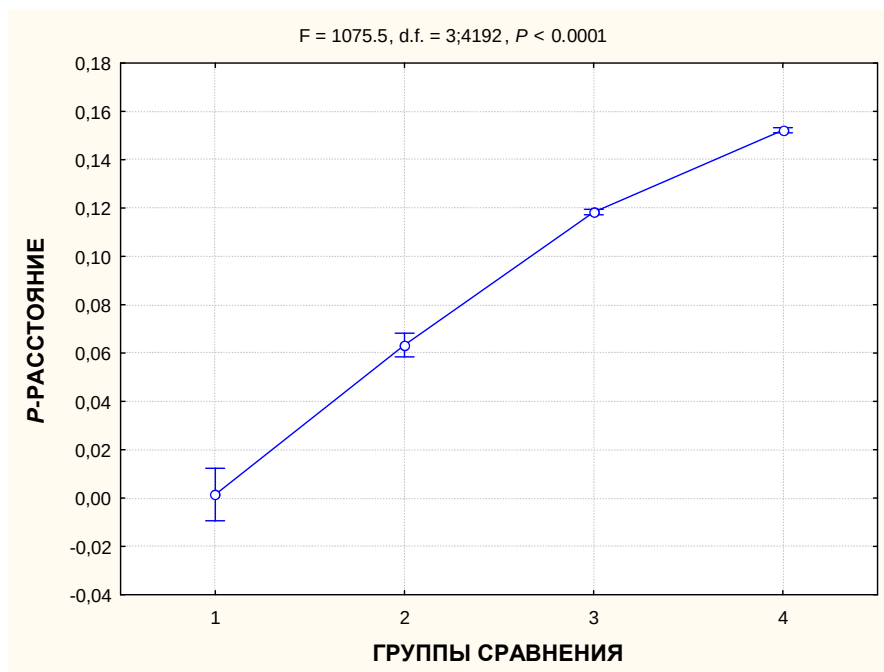


Рисунок 3. Результаты однофакторного дисперсионного анализа оценок p -расстояния для 4 различных уровней иерархии рыб исследованных нуклеотидных последовательностей гена *Co-1*.

Значения p -расстояний, увеличивающиеся с возрастанием таксономического уровня (Рисунок 3), позволяют предполагать преобладание географической модели видообразования, и филогенетической эволюции в целом в исследованных таксонах окунеобразных рыб, как и в других группах (Avisé, 2001; Kartavtsev et al., 2009).

ГЛАВА 7. ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКИЕ ОТНОШЕНИЯ СТИХЕЕВЫХ И ДРУГИХ БЕЛЬДЮГОВИДНЫХ РЫБ (PERCIFORMES, ZOARCOIDEI) ПО ДАННЫМ ИЗМЕНЧИВОСТИ ПОЛНЫХ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ МИТОХОНДРИАЛЬНЫХ ГЕНОВ *CO-1* И *CYTb*

Полного разрешения топологии эволюционных линий подотряда Zoarcoidei не удалось добиться ни в одном методе построения деревьев как при отдельном анализе генов *Co-1* (1340 п.о.) и *Cytb* (941 п.о.), так и при обработке объединённых данных (2281 п.о.). Однако это не препятствует интерпретации результатов анализа для достоверно разрешенных узлов.

Семейство Bathymasteridae, как и предполагалось ранее (Stevenson, Matarese, 2005; Mecklenburg, 2003; Imamura, Yabe, 2002; Anderson, 1994; Радченко и др., 2009), согласно

полученным данным является наиболее древним в подотряде. Род *Bathymaster* является монофилетической группой, где *B. derjugini* это наиболее молодой таксон, а *B. signatus* – наиболее древний (Рисунок 4).

Подтверждается монофилетическое происхождение семейства Zoarcidae. Схема филогении подсем. Lycodinae, в которой род *Lycenchelys* и *Petroschmidtia* (*Lycodes toyamensis*) выступают предковыми, а *Bothrocara* + *Lycodes* – продвинутыми узлами и в целом соответствует схеме, представленной ранее в молекулярно-генетических построениях (Радченко и др., 2012a). Однако эта схема противоречит данным кладистического анализа морфологических признаков (Anderson, 1994).

Подсемейство Lycodinae является наиболее молодым в семействе Zoarcidae, что не противоречит представленным ранее филогенетическим реконструкциям (Anderson, 1994; Радченко и др., 2009б; Радченко и др., 2012б). Однако предковое положение подсемейства Zoarcinae, которое выявлено по нашим данным, не соответствует предложенной ранее схеме, согласно которой предковым является Gymnelinae.

Семейства Neozoarcidae, Eulophiidae и Anarhichadidae являются самостоятельными группами и равноудалены как от бельдюговых (Zoarcidae), так и от стихеевых (Stichaeidae) рыб. Stichaeidae в филогенетических реконструкциях по разным генам никогда не формирует монофилетическую группу (исключение, см. Kartavtsev et al., 2009), являясь наиболее неоднородным в подотряде как генетически (Радченко и др., 2009а; Туранов и др., 2012) так и морфологически (Макушок, 1958).

Наиболее хорошо обособленной группой в составе семейства выступает подсем. Lumpeninae с примерным направлением филогении люмпеновых от предковой формы к наиболее современной: *L. maculatus* → *X. longipterus* → *A. medius* → *L. longirostris* → *Lumpenus* → *A. mackayi*. Эта схема принципиально отличается от предлагаемой ранее на основе морфологии (Макушок, 1958), а также молекулярно-филогенетических методов (Радченко, 2009а), где род *Lumpenus* (совместно с *Leptoclinus* и *Anisarchus* по Макушку) занимает предковое положение, тогда как *Lumpenella* наряду с *Acantholumpenus* – наиболее продвинутые таксоны. Монофилетическое положение принимают подсемейства Chirolophinae и Aletriinae. Напротив, Stichaeinae разделено на 2 группы с устойчивым обособлением таксонов *S. ochriamkini* и *S. punctatus*, причём отличия от остальных представителей подсемейства достигают 14 % (по отношению к *Ernogrammus*). Обособление сем. Pholidae с представителями подсем. Opisthocentrinae не поддаётся разумному объяснению, хотя и встречается при построении филогении подотряда (Kwun, Kim, 2013). В подсем. Opisthocentrinae подтверждается предковое положение рода *Kasatkia*, а также самостоятельность рода *Pholidapus*.

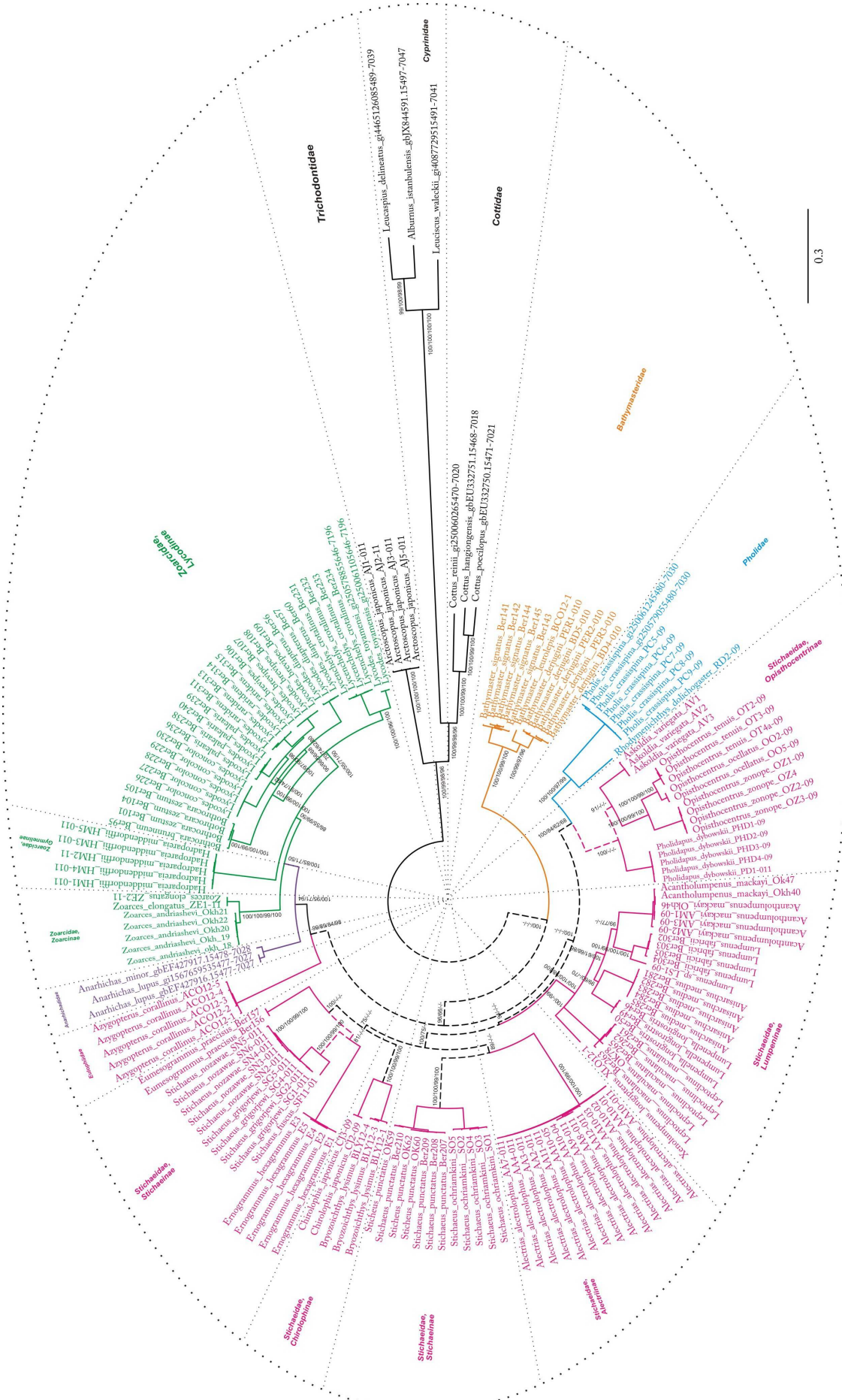


Рисунок 4. Подпись к рисунку см. на следующей странице.

Рисунок 4. Укоренённое консенсусное дерево, показывающее филогенетические взаимоотношения бельдюговидных рыб, основанные на данных 169 объединённых последовательностей нуклеотидов генов *Co-1* и *CytB*. Поддержка показана для узлов, разрешающихся в более 50 % реплик бутстрепа (ML, MP, NJ) или имеющих апостериорную вероятность более 50 % (BI). Рядом с узлами показана их статистическая поддержка в порядке: BI, ML, MP, NJ. Пунктиром отмечены узлы и ветви, надёжно поддержанные только в байесовской топологии.

Подтверждается раннее предположение о том, что каждое подсемейство в составе сем. Stichaeidae (Stichaeinae, Chirolophinae, Alectriinae, Opisthocentrinae и Lumpeninae) заслуживает статуса самостоятельного семейства, так как в сравнении с расстояниями между подсемействами сем. Zoarcidae стихеевые рыбы намного более разобщены (Таблица 5, Таблица 6).

Таблица 5. Матрица попарных *p*-расстояний между семействами подотряда Zoarcoidei, а также подсемействами Stichaeidae

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	Zoarcidae										
2	Pholidae	15.6									
3	Anarhiadidae	10.6	14.7								
4	Lumpeninae	13.3	13.8	12.2							
5	Alectriinae	14.3	14.1	13.7	12.9						
6	Opisthocentrinae	14.3	13.3	13.6	12.3	13.7					
7	Azygopterinae	12	15.4	12.6	13.2	13.9	14.9				
8	Bathymasteridae	14.9	14.1	13.7	13.3	13.1	12.8	14.7			
9	Chirolophinae	14.5	14.9	13.2	12.3	11.9	13.8	13.6	13.4		
10	Stichaeinae	14.2	14.2	12.6	12.3	11.9	12.6	14.4	13.3	12.2	
11	Neozoarcidae	12.1	14.6	13.1	13.8	15	14	12.7	16.4	14.9	14.5

Таблица 6. Матрица попарных *p*-расстояний между исследованными представителями подсемейств Zoarcidae

		1	2
1	Lycodinae		
2	Gymnelinae	11	
3	Zoarcinae	10.4	10.6

Заключение

С помощью ДНК-штрихкода *Co-1* могут быть успешно идентифицированы 38 из 41 проанализированных вида бельдюговидных рыб (92.7 %), представленных в работе. Результаты в целом схожи с таковыми, полученными на смежных морских акваториях северной Пацифики (Wang et al., 2012; Zhang, 2011; Kim et al., 2012; Zhang, Hanner, 2011; Mecklenburg et al., 2011; Steinke et al., 2009). Исследования в направлении ДНК-штрихкодирования должны быть обязательным вводным этапом при подготовке таксономических ревизий, потому что инструментарий направления позволяет правильно и удобно организовать подготовку материала к анализу, а также в процессе его выявить возможные таксономические неточности, которые могут негативно сказаться в последующем и повлиять на интерпретацию результатов. В свете полученных данных повышение настоящих подсемейств группы до ранга самостоятельных семейств представляется вполне оправданным. Таким образом, объём Stichaeidae, указанный в литературном обзоре диссертационной работы (глава 1), полностью сохраняется с поправкой на повышение таксономического ранга. Разработка филогении семейства стихеевые, а также всего подотряда Zoarcoidei с учётом полученных данных ещё далека от завершения.

ВЫВОДЫ

1. Эффективность молекулярного ДНК-штрихкода *Co-1* как инструмента для видовой идентификации стихеевых и других бельдюговидных рыб составила 92.7 %. *Co-1* не подходит для определения видовой принадлежности *Stichaeus grigorjewi*, *Stichaeus nozawae*, *Lumpenus sagitta* и *Lumpenus fabricii*.
2. В юго-восточной акватории Японского моря присутствует криптический вид рода *Lumpenus*.
3. Показана полифилетичность семейства Stichaeidae, которая согласуется с полученными ранее данными и предполагает неестественное положение семейства в его современном составе. Подсемейства Stichaeidae заслуживают статуса самостоятельных семейств.
4. Подтверждена самостоятельность таксонов Xiphisteridae, Cebidichthyidae, Neozoarcidae и Eulophiidae, ранее относимых к семейству стихеевые. Neozoarcidae и Eulophiidae обнаруживают наибольшую близость с Zoarcidae.
5. Подтверждено монофилетическое происхождение семейства Zoarcidae.
6. Географическая модель видообразования является превалирующей в системе стихеевых рыб, а также всего подотряда Zoarcoidei.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в журналах, рекомендованных ВАК:

1. **Туранов С.В.**, Картавец Ю.Ф., Земнухов В.В. Молекулярно-филогенетическое исследование некоторых представителей бельдюговидных рыб (Perciformes, Zoarcoidei) дальневосточных морей, основанное на нуклеотидной последовательности митохондриального гена цитохромоксидазы 1 (Co-1) // Генетика. 2012. Т. 48, № 2. С. 235–252.

Работы, опубликованные в материалах всероссийских и международных конференций:

1. Kartavtsev Y.Ph., Sharina S.N., Goto T., Rutenko O.A., Zemnukhov V.V., Semenchenko A.A., **Turanov S.V.**, Hanzawa N. Sequence divergence at cytochrome oxidase 1 (Co-1) gene among pricklebacks (Actinopterygii, Stichaeidae) and some other relatives with inferences in phylogeny and taxonomy // Modern Achievements in Population, Evolutionary, and Ecological Genetics: International Symposium, Vladivostok – Vostok Marine Biological Station, September 6–12, 2009: Program & Abstracts. – Vladivostok, 2009. – P. 27.

2. **Туранов С.В.**, Картавец Ю.Ф. Филогенетика и таксономические отношения у стихеевых рыб (Pisces: Stichaeidae): взгляд на основе молекулярного маркера Co-1 // Отраслевая научно-техническая конференция «П.О.И.С.К.-2009». Владивосток, 14-17 сентября 2009г.: Материалы конференции. – Владивосток: Изд-во ФГОУ ВПО «Дальрыбвтуз», 2009. – С. 102.

3. Kartavtsev Yu.Ph., Sharina S.N., **Turanov S.V.**, Advolodkin A.A. Investigation of scorpionfish and perch-like species of Russia on Co-1 gene sequence data with phylogenetic and taxonomic outcomes // Contribution to the 2nd Moscow International Conference “Molecular Phylogenetics”. Moscow, May 18-21, 2010. – Moscow: Torus Press, 2010. – P. 113.

4. **Turanov S.V.**, Kartavtsev Yu.Ph., Sharina S.N., Zemnukhov V.V., Balanov A.V. Sequencing of perch-like (Perciformes) fish species of Russia on Co-1 gene with phylogenetic and taxonomic purposes // Modern Achievements in Population, Evolutionary, and Ecological Genetics: International Symposium, Vladivostok – Vostok Marine Biological Station, June 19–24, 2011: Program & Abstracts. – Vladivostok, 2011. – P. 48.

5. Картавец Ю.Ф., Шарина С.Н., Батищева Н.М., **Туранов С.В.**, Баланов А.А., Земнухов В.В., Иванков В.Н., Семенченко А.А. ДНК-штрихкодирование, молекулярная филогенетика и эволюция видов рыб дальнего востока РФ // Биологическое разнообразие:

Генофонды и генетическое разнообразие, Москва, 2011: Материалы отчётной конференции – М.: ИОГен, 2011. – С. 75–79.

6. **Turanov S.V.**, Kartavtsev Y.Ph., Zemnukhov V.V., Balanov A.A. Molecular delimitation and phylogeny of perch-like fish species from Russia Far East // Fish Barcode of Life World Conference., Yeosu, Korea, 12-14 June, 2012: Proceedings. – Yeosu, 2012. – P. 35.

7. **Туранов С.В.**, Картавцев Ю.Ф., Шарина С.Н., Земнухов В.В., Баланов А.А. Исследование филогенетических отношений некоторых представителей бельдюгообразных рыб (Perciformes: Zoarcoidei) дальнего востока России с замечаниями по штрихкодированию видов на основе гена CO-1 // 50-ая юбилейная Международная научная студенческая конференция «Студент и научно-технический прогресс». Новосибирск, 13-19 апреля 2012 г.: Материалы конференции. – Новосибирск: Изд-во Новосиб. гос. ун-та, 2012. – С. 211.

8. **Turanov S.V.**, Kartavtsev Yu.Ph., Sharina S.N., Zemnukhov V.V., Balanov A.V. DNA barcoding of Perch-like fishes (Pisces: Perciformes) from far-eastern seas of Russia // Modern Achievements in Population, Evolutionary, and Ecological Genetics: International Symposium, Vladivostok – Vostok Marine Biological Station, September 2–6, 2013: Program & Abstracts. – Vladivostok, 2013. – P. 73.

Туранов Сергей Викторович

ШТРИХКОДИРОВАНИЕ ВИДОВ И МОЛЕКУЛЯРНАЯ ФИЛОГЕНЕТИКА
РЫБ СЕМЕЙСТВА СТИХЕЕВЫЕ (PERCIFORMES, STICHAEIDAE)
ДАЛЬНЕВОСТОЧНЫХ МОРЕЙ РОССИИ

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание учёной степени
кандидата биологических наук

Подписано в печать 15.11.2013г.
Формат 60х84 1/16. Усл. п. л. 3,08. Тираж 100 экз.
Заказ 638
Отпечатано в дирекции публикационной деятельности ДВФУ
690990, г. Владивосток, ул. Пушкинская 10