

**ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКИЕ ОТНОШЕНИЯ КАМБАЛООБРАЗНЫХ
РЫБ СЕМЕЙСТВА *Pleuronectidae* (Ostichthyes: *Pleuronectiformes*)
НА ОСНОВЕ УЧАСТКА ГЕНА *16S* рРНК**

© 2021 г. А. Д. Редин^{1, *}, Ю. Ф. Картавец^{1, **}

¹Национальный научный центр морской биологии им. А.В. Жирмунского
Дальневосточного отделения Российской академии наук, Владивосток, 690041 Россия

*e-mail: shurko92@yandex.ru

**e-mail: yuri.kartavtsev48@hotmail.com

Поступила в редакцию 13.04.2020 г.

После доработки 11.09.2020 г.

Принята к публикации 08.10.2020 г.

На основе неполной нуклеотидной последовательности *16S* рРНК, полных последовательностей *Co-1* и *Cyt-b* исследована систематика и филогения камбал. Проанализированы 62 образца у 14 видов собственных сборов и из коллекций GenBank/BOLD. Реконструировано четыре типа генных деревьев: байесовское (BA), максимального правдоподобия (ML), минимальной эволюции (ME) и ближайшего соседства (NJ). Эти деревья показали сходную топологию. Две отдельных ветви на деревьях поддерживают выделенные ранее подсемейства *Hippoglossoidinae* и *Pleuronectinae* с монофилетическим статусом этих таксонов. Подсемейство *Pleuronectinae* можно считать монофилетическим, при исключении из него трибы *Microstomini*, с переносом рода *Lepidopsetta* в трибу *Pleuronectini*. Были сформированы и независимо исследованы три набора нуклеотидных последовательностей. Один набор включал все полученные последовательности гена *16S* рРНК (291 пн), второй набор включал выборку более длинных последовательностей *16S* рРНК (617 пн), третий набор состоял из последовательностей трех генов: *16S* рРНК, *Co-1* и *Cyt-b* (2926 пн). Все три набора данных дают схожий филогенетический сигнал, который согласуется с традиционными представлениями о таксономии отряда *Pleuronectiformes*; однако второй и третий наборы дают лучшую топологию.

Ключевые слова: *Co-1*, *Cyt-b*, *16S* рРНК, камбалы, молекулярная филогенетика.

DOI: 10.31857/S0016675821030115

Семейство настоящих камбаловых рыб *Pleuronectidae*, которому в статье уделяется основное внимание, является одним из крупнейших в отряде *Pleuronectiformes*, включая 59 номинальных видов правосторонних камбаловых рыб, распространенных в морских водах Северного полушария [1, 2]. В своем анализе Дж. Купер и Ф. Чаплау [1] рассматривали семейство *Pleuronectidae* как монофилетический таксон, основываясь на десяти синапоморфиях по морфологическим признакам. Важный итог, полученный вышеупомянутыми авторами, в целом согласуется с топологией ветвей семейства, установленной в нескольких исследованиях молекулярной филогенетики [3–10]. Согласно [1] это семейство включает подсемейства *Hippoglossinae*, *Eopsettiniae*, *Lyopsettiniae*, *Hippoglossoidinae* и *Pleuronectinae*, которые представлены родами, обычно состоящими из видов с высокой промысловой ценностью (например, виды рода палтусовидных камбал, *Hippoglossoides*). В связи с рыбохозяйственной значимостью этих и других камбал и необходимостью управлять такими ценными воз-

обновляемыми ресурсами весьма важными являются как точная классификация образцов особей видов в пределах родов, так и вся система взаимоотношений между таксонами в этом семействе.

Таксономические исследования *Pleuronectidae* традиционно основывались на морфологических признаках, как следует из приведенного выше абзаца. Однако частое отсутствие четких доказательств гомологии признаков у видов даже на низких таксономических уровнях (внутри рода) делает не всегда убедительными постулируемые таксономическо-филогенетические взаимосвязи многих групп камбаловых рыб, если они обоснованы лишь с помощью морфологии. Существует несколько версий классификации камбал, которые были предложены разными авторами [1, 11–13]. Определенные разногласия также отмечаются в отношении филогенетических взаимоотношений камбал, полученных на основе морфологических и молекулярно-генетических данных [1, 4, 14, 15]. Разработка новых ядерных и митохондриальных

маркеров на основе ДНК позволяет лучше идентифицировать морфологически сходные виды рыб [16], включая многие виды камбаловых. Поэтому актуальным является поиск новых или уже известных, но недостаточно разработанных молекулярных маркеров для реконструкции генных деревьев, а также комбинированных или видовых филогенетических деревьев для камбал семейства Pleuronectidae.

В настоящем исследовании, учитывая вышеизложенное, представлен сравнительный анализ неполных нуклеотидных последовательностей (далее – последовательности) гена *16S* рРНК для 14 видов, относящихся к Pleuronectidae, ранее не использованных в таком объеме для камбал, с целью оценки успешности таксономической идентификации образцов и установления филогенетических и таксономических взаимосвязей в этом семействе камбал. Новизна представленного исследования заключается в том, что систематику данной группы в цитированных выше работах авторов не рассматривали на основе *16S* рРНК. Соответственно, в представленной статье рассмотрели потенциал данного маркера на достаточной выборке образцов для таксономических и эволюционно-генетических исследований камбал Российской Федерации.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В общей сложности проанализировали 62 последовательности *16S* рРНК и дополнительно по 24 последовательности генов *16S* рРНК, *Co-1* и *Cyt-b* для 14 видов, относящихся к семи родам семейства Pleuronectidae. Латинские имена даны в соответствии с классификацией [1]. Пробы (2–5 образцов мышечной ткани, подвергнутой фиксации этанолом, 95%) взяты из имеющейся коллекции Лаборатории молекулярной систематики, а ватчерные экземпляры самих рыб находятся на ответственном хранении в музее ННЦМБ ДВО РАН. Выделение ДНК проводили с помощью коммерческих наборов (“ДНК Экстран-2”, Синтол, Россия).

Фрагмент последовательности гена *16S* рРНК амплифицировали посредством полимеразной цепной реакции (ПЦР) с помощью праймеров 16Sbr-N и 16Sar-L. Реакцию ПЦР проводили в объеме 25 мкл раствора, содержащего: дистиллированную деионизированную воду – 17.8 мкл; dNTP (ЗАО “Евроген”, Москва, Россия) – 0.5 мкл; 5× Buffer (Eurogen) – 5 мкл; праймеры в концентрации 10 мкМ/мкл – по 0.3 мкл для каждого; Taq-полимераза – 0.1 мкл. Использовали следующую тепловую программу: денатурирование при 93°C в течение 1 мин, отжиг при 55°C в течение 1 мин и элонгация при 72°C в течение 1 мин для

33 циклов. Для определения локализации и порядка расположения нуклеотидов в последовательностях продукты ПЦР (ДНК-образцы) подвергали циклическому секвенированию с помощью набора для секвенирования циклов BrightDye Terminator по следующей программе: денатурирование при 96°C – 10 с, отжиг при 45°C – 10 с, элонгация при 60°C – 2 мин.

Двунаправленные последовательности цепей ДНК генов *16S* рРНК были получены для каждого ДНК-образца. Эти последовательности затем объединяли вместе для получения консенсусных последовательностей каждого образца. Данная процедура выполнена с использованием программного пакета Geneious, Free Trial [17].

Так как длина полученных последовательностей варьировала довольно значительно, в диапазоне от 355 пар нуклеотидов (пн) до 642 пн, то для более точного дальнейшего анализа составили два набора последовательностей. Один набор представлял собой все полученные последовательности, а другой включал только наиболее длинные последовательности. Соответственно преобразованию данных набор 1 содержал 62, а набор 2 – 27 последовательностей. После проведения процедуры выравнивания и удаления гэпов (инделов) длина последовательностей двух наборов составила 291 и 617 пн соответственно.

Выравнивание последовательностей для всех таксонов было выполнено с использованием программного пакета (ПП) MEGA-X (<http://megasoftware.net/>) [18] на основе модуля ClustalW [19], как интегрированного продукта MEGA. Штрафы за открытие пропусков и за удлинение пропусков были установлены размером 15.0 и 5.0 соответственно (для других настроек программы выравнивания использовали параметры по умолчанию). После первого этапа выравнивания большие пробелы были удалены вручную, и окончательное выравнивание на втором этапе выполнено с уменьшенными уровнями штрафов (5.0 и 0.5 для двух опций соответственно). Все пробелы были затем снова удалены вручную.

Для увеличения информационной емкости кроме гена *16S* рРНК в анализ включены последовательности генов *Co-1* и *Cyt-b*, ранее использованные в анализе [10]; в совокупности эти данные составили третий набор последовательностей, включающий всего 24 образца длиной 2926 пн.

Для дальнейшего анализа последовательностей и построения генных деревьев подобрали оптимальную модель замены нуклеотидов для полученного набора последовательностей. Лучшая модель эволюции, которая соответствовала

полученным данным, оценена посредством специального модуля программы MEGA. Для набора гена *16S* рРНК с короткими последовательностями (291 пн) наилучшей моделью оказалась K2P + G (двухпараметрическая модель М. Кимуры с гамма-распределением замен) [20], для набора этого гена с длинными последовательностями (617 пн) лучшей была модель JC + G (модель Джукса–Кантора с гамма-распределением замен) [21], для набора последовательностей трех генов наилучшей моделью оказалась HKY + G (модель Хасегава–Кишино–Яно с гамма-распределением замен) [22].

Генные деревья были построены посредством четырех методов реконструкции: на основе байесовского анализа (BA), максимального правдоподобия (ML), ближайшего соседства (NJ) и минимальной эволюции (ME). Они были выполнены в MrBayes 3.2.7 (<http://nbsweden.github.io/MrBayes/download.html>) [23, 24] и MEGA-X [18]. Моделирование процесса реконструкции деревьев в BA проводили в течение одного миллиона поколений n ($n = 10^6$). Три другие реконструкции ML, NJ, ME проводили с повторностями равными $k = 1000$ копий бутстрепа (бутстреп-поддержки).

В качестве внешней группы при укоренении деревьев выбрали ветвь *Platichthys stellatus*, представитель которой по данным для полного митогенома (мтДНК) ранее был отнесен к внешней ветви в семействе Pleuronectidae [10]. Филогенетические деревья визуализировали и редактировали при необходимости с помощью программного обеспечения FigTree [25] и MEGA-X [18].

Все полученные последовательности по гену *16S* рРНК были зарегистрированы в GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>); часть не опубликованных ранее последовательностей *Co-1* и *Cyt-b* также включена в статью (табл. 1).

Статистический анализ нуклеотидного состава выполнен с использованием ПП MEGA-X. Дополнительно с помощью программного пакета Statistica 6 [29] провели однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA) нуклеотидного состава отдельно по каждому гену.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Анализ строили, базируясь на последовательностях трех представленных ранее наборов данных. Полная длина участка гена *16S* рРНК (полноразмерные последовательности “от праймера до праймера”) составляет 596–631 пн. Номера полноразмерных участков гена *16S* рРНК следующие: MN888911, MN888895, MN888908, MN888877, MN888901, MN888894, MN888893, MN888892, MN888917, MN888916, MN888915, MN888903,

MN888924, MN888918, MN888912, MN888904, MN888905, MN888868, MN888873, MN888898, MN888899, MN888902, MN888927, MN888909, MN888907, MN888884, MN888883, MN888876.

Однако не все полученные последовательности достигли полного размера. Разница в длине последовательностей обусловлена некачественным секвенированием некоторых образцов, что привело к большему “обрезанию” участков рядом с праймерами при формировании консенсусных последовательностей. Эти погрешности секвенирования возможны в связи с тем, что часть образцов тканей хранились до анализа несколько лет. Однако короткие фрагменты не обязательно плохие для оценки изменчивости в близких таксонах и сопоставления степени их сходства-различия для реконструкции генного дерева. В связи с этим для анализа материал разбили на две группы, включающие длинные (1) и короткие (2) последовательности гена. В соответствии с изложенными подходами (в разделе “Материалы и методы”) построено четыре типа деревьев: BA, ML, NJ и ME.

Анализ всех последовательностей *16S* рРНК

На рис. 1 показано укорененное ML-дерево, полученное на основе набора последовательностей гена *16S* рРНК длиной 291 пн. Поддержки на деревьях указаны в следующем порядке: BA/ME/NJ/ML.

Ветвь с образцами *Limanda sakhalinensis* вошла в состав подсемейства Hippoglossoidinae, образуя отдельную, топологически неразрешенную ветвь (узел) вместе с *Cleisthenes pinetorum* подсемейства Hippoglossoidinae. Отдельная, также неразрешенная ветвь сформирована представителями трех номинальных видов палтусовидных камбал рода *Hippoglossoides*. *Lepidopsetta mochigarei*, представитель трибы Microstomini, имеет для всех пяти соответствующих ветвей на дереве неразрешенную топологию. Отдельный узел на древе формируют представители тихоокеанского белокорого палтуса *Hippoglossus stenolepis* из подсемейства Hippoglossinae.

Анализ более длинных последовательностей *16S* рРНК

На рис. 2 представлено укорененное NJ-дерево, полученное на основе набора последовательностей гена *16S* рРНК длиной 617 пн. Ветвь *Limanda sakhalinensis* включена в подсемейство Hippoglossoidinae, располагаясь в одном кластере с *Cleisthenes pinetorum*. Последовательности, представляющие подсемейство Hippoglossinae, образуют отдельный узел.

Таблица 1. Список видов и присвоенные им номера в геномном банке

Видовое название с лабораторным номером	Номер доступа в NCBI		
	<i>16S</i>	<i>Co-I</i>	<i>Cyt-b</i>
<i>Pseudopleuronectes herzensteini 7k</i>	MN888867	KF386364	KF445172
<i>Pseudopleuronectes herzensteini 05-07</i>	MN888868	KF386361	KF445169
<i>Pseudopleuronectes herzensteini 6k</i>	MN888869	KF386363	KF445171
<i>Pseudopleuronectes schrenki 119-07</i>	MN888870		
<i>Liopsetta pinnifasciata 90-07</i>	MN888871		
<i>Liopsetta pinnifasciata 40-07</i>	MN888872		
<i>Liopsetta pinnifasciata 39-07(2)</i>	MN888873		
<i>Liopsetta pinnifasciata 39-07</i>	MN888874		
<i>Liopsetta pinnifasciata 21-07</i>	MN888875		
<i>Liopsetta pinnifasciata 20-07</i>	MN888876	KF386379	KF445186
<i>Liopsetta pinnifasciata 2</i>	MN888877		
<i>Liopsetta pinnifasciata 19-07</i>	MN888878	KF386378	KF445185
<i>Liopsetta pinnifasciata 13</i>	MN888879	KF386377	KF445184
<i>Pseudopleuronectes yokohamae 46</i>	MN888880	KF386355	KF445163
<i>Pseudopleuronectes yokohamae 45</i>	MN888881	KF386354	KF445162
<i>Pseudopleuronectes obscurus 42-07</i>	MN888882		
<i>Pseudopleuronectes obscurus 36</i>	MN888883		
<i>Pseudopleuronectes yokohamae 09-07</i>	MN888884	KF386353	KF445161
<i>Pseudopleuronectes obscurus 08-08(08-07)</i>	MN888885		
<i>Limanda punctatissima 89-07</i>	MN888886		
<i>Limanda punctatissima 86-07</i>	MN888887	KF386388	KF445195
<i>Limanda punctatissima 58-07</i>	MN888888		
<i>Limanda punctatissima 50-07</i>	MN888889		
<i>Limanda punctatissima 37</i>	MN888890	KF386386	KF445193
<i>Lepidopsetta mochigarei LMO12-5</i>	MN888891		
<i>Lepidopsetta mochigarei LMO12-4</i>	MN888892		
<i>Lepidopsetta mochigarei LMO12-3</i>	MN888893		
<i>Lepidopsetta mochigarei LMO12-2</i>	MN888894		
<i>Lepidopsetta mochigarei LMO12-1</i>	MN888895		
<i>Platichthys stellatus 11-07</i>	MN888896		
<i>Platichthys stellatus 4k</i>	MN888897	KF386371	KF445178
<i>Platichthys stellatus PS6-011</i>	MN888898		
<i>Platichthys stellatus PS5-011</i>	MN888899		
<i>Platichthys stellatus PS4-011</i>	MN888900		
<i>Platichthys stellatus Ps3-011</i>	MN888901		
<i>Platichthys stellatus Ps2-011</i>	MN888902		
<i>Platichthys stellatus 18-07</i>	MN888903	KF386375	KF445182
<i>Platichthys stellatus 16-07</i>	MN888904		
<i>Platichthys stellatus 15-07</i>	MN888905		
<i>Liopsetta pinnifasciata PG1-011</i>	MN888906		
<i>Liopsetta pinnifasciata Pc2-011</i>	MN888907		
<i>Liopsetta pinnifasciata Pc1-011</i>	MN888908		
<i>Liopsetta pinnifasciata 2k</i>	MN888909	KF386376	KF445183
<i>Limanda sakhalinensis 72(2012)</i>	MN888910	KF386382	KF445189

Таблица 1. Окончание

Видовое название с лабораторным номером	Номер доступа в NCBI		
	<i>16S</i>	<i>Co-I</i>	<i>Cyt-b</i>
<i>Limanda sakhalinensis</i> 71(2012)	MN888911	KF386381	KF445188
<i>Limanda sakhalinensis</i> 69(2012)	MN888912		
<i>Limanda sakhalinensis</i> 68(2012)	MN888913		
<i>Hippoglossus stenolepis</i> HST12-4	MN888914		
<i>Hippoglossus stenolepis</i> HST12-3	MN888915		
<i>Hippoglossus stenolepis</i> HST12-2	MN888916		
<i>Hippoglossus stenolepis</i> HST12-1	MN888917		
<i>Hippoglossoides robustus</i> 289	MN888918	KF386414	KF445220
<i>Hippoglossoides robustus</i> 288	MN888919	KF386413	KF445219
<i>Hippoglossoides robustus</i> 286	MN888920	KF386411	KF445217
<i>Hippoglossoides elassodon</i> 35	MN888921		
<i>Hippoglossoides elassodon</i> 34	MN888922	KF386418	KF445223
<i>Hippoglossoides elassodon</i> 33	MN888923	KF386417	KF445222
<i>Hippoglossoides robustus</i> 31	MN888924	KF386410	KF445216
<i>Hippoglossoides dubius</i> 5k	MN888925		
<i>Cleisthenes pinetorum</i> 79-07	MN888926	KF386409	KF445215
<i>Cleisthenes pinetorum</i> 78-07	MN888927	KF386408	KF445214

Lepidopsetta mochigarei, как и ранее по короткому фрагменту, формирует неразрешенный узел, но топологически входит в трибу Microstomini.

Анализ реконструкции генных деревьев по объединенным последовательностям трех генов

Для данного анализа были сопоставлены выровненные последовательности участка гена *16S* рРНК, а также генов *Co-I* и *Cyt-b*. Последовательности были конкатенированы в MEGA-X и затем подвергнуты дальнейшему анализу. Согласно полученным данным ветвь *Limanda sakhalinensis* включена в подсемейство Hippoglossoidinae (рис. 3). Ветвь *Cleisthenes pinetorum* также включена в подсемейство Hippoglossoidinae (рис. 3).

Нуклеотидный состав

Соотношение пиримидинов (Т, С) и пуринов (А, G) в генах *16S* рРНК, *Co-I* и *Cyt-b* отклонялись от соотношения 50 : 50 (Приложение, рис. 4). В последовательностях *16S* рРНК нет больших различий в соотношении пиримидинов (Т, С) и пуринов (А, G), но можно наблюдать общую гетерогенность состава нуклеотидов с преобладанием С- и А-нуклеотидов (рис. 4,а). В случае *Co-I* и *Cyt-b* наблюдается статистически значимое отклонение в соотношении пиримидинов к пуринам с преобладанием пиримидинов (рис. 4,б, в).

ANOVA по каждому гену обнаружил, что различия для четырех нуклеотидов статистически значимые: для *16S* рРНК – $F = 2147.9$, d.f. = 3; 92, $P < 0.0001$; для *Co-I* – $F = 3673.3$, d.f. = 3; 92, $P < 0.0001$; для *Cyt-b* – $F = 4320.7$, d.f. = 3; 92, $P < 0.0001$. Доля (Т + С) : (А + G) для *16S* рРНК, *Co-I* и *Cyt-b* составила 45.4 : 54.6, 56.5 : 43.5 и 61.1 : 38.9% соответственно.

ОБСУЖДЕНИЕ

Как отмечено во введении, крупнейшим подсемейством в семействе является Pleuronectinae. Это подсемейство представлено двумя трибами – Microstomini и Pleuronectini. Согласно полученным данным по *16S* рРНК они не образуют монофилетические ветви (см. рис. 1, 2). Таким образом, систематика на уровне подсемейств нуждается в дальнейшем уточнении. Например для большего информационного сигнала необходимо увеличить число как ядерных, так и митохондриальных маркеров при исследовании. Это поможет уменьшить число неразрешенных топологически узлов полученных деревьев.

Как отмечалось, Дж. Купер и Ф. Чаплау [1] в своей ревизии этого семейства на основе традиционных признаков морфологии обосновали, что Pleuronectidae представляет монофилетическую группу. Монофилия камбаловых, установленная

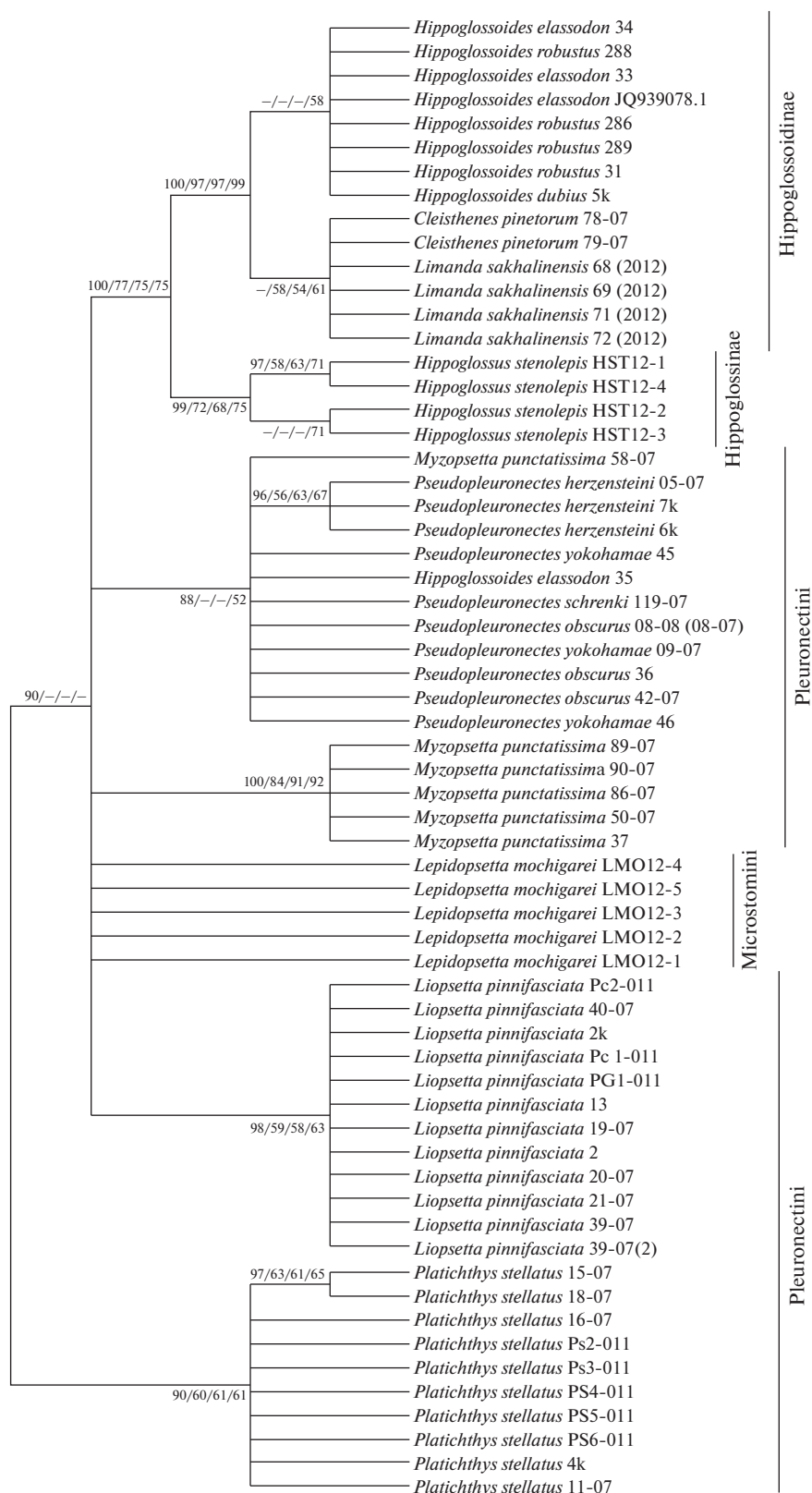


Рис. 1. Укорененное генное дерево, показывающее филогенетические взаимосвязи на основе 62 коротких нуклеотидных последовательностей участка *16S* рРНК. Топология представлена на основе ML-реконструкции. В узлах даны значения поддержки для четырех способов реконструкции деревьев в порядке: ВА/МЕ/НЖ/МЛ. Для ВА-дерева показаны апостериорные вероятности (%), $n = 10^6$ поколений), а для трех других реконструкций даны бутстреп-поддержки ($k = 1000$ реплик).

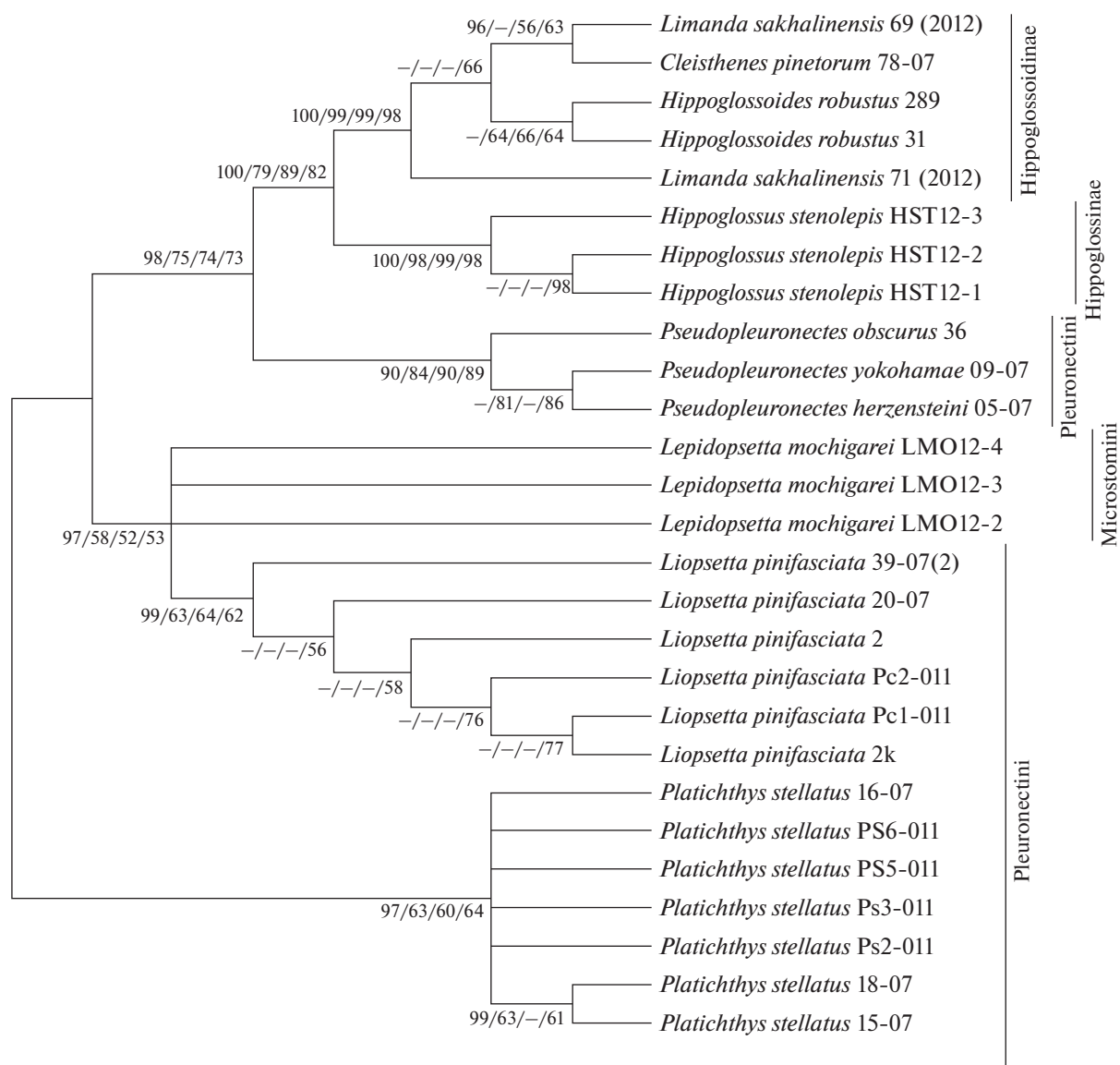


Рис. 2. Топология укорененного NJ-дерева, показывающая филогенетические взаимоотношения на основании данных для 27 последовательностей участка гена 16S рРНК. В узлах даны значения поддержек для ВА-дерева ($n = 10^6$ поколений) и трех других реконструкций в общем порядке: ВА/МЕ/ML/NJ ($k = 1000$ реплик бутстрепа для трех последних методов реконструкции).

на основе классического подхода, соответствует во многих случаях молекулярно-филогенетическим реконструкциям в исследованиях этого семейства по таким маркерам как 12S рРНК, 16S рРНК, а также по генам *Co-1* и *Cyt-b* [4–6, 8, 9] и полному митогеному [10].

В подсемейство Hippoglossoidinae в наиболее представительном в работе материале вошли два из трех родов *Cleisthenes* (*C. pinetorum*) и *Hippoglossoides* (*H. dubius* Schmidt, 1904, *H. elassodon* Jordan & Gilbert, 1180, *H. robustus* Gill & Townsend, 1897) (рис. 3). Виды рода *Hippoglossoides* образуют сме-

шанный кластер на ВА-дереве (рис. 3). На основании чего можно предположить, что два таксона *H. elassodon* и *H. robustus* являются синонимами одного вида. Синонимия *H. elassodon* и *H. robustus* уже предлагалась ранее на основании морфологических и молекулярно-филогенетических данных [4, 27–31]. По принципу старшинства можно принять валидным таксон видового ранга *H. elassodon* Jordan & Gilbert, 1180, а *H. robustus* Gill & Townsend, 1897 считать младшим синонимом этого вида. Предложение о сведении в синонимию *H. elassodon* и *H. robustus* уже сделано ранее, как

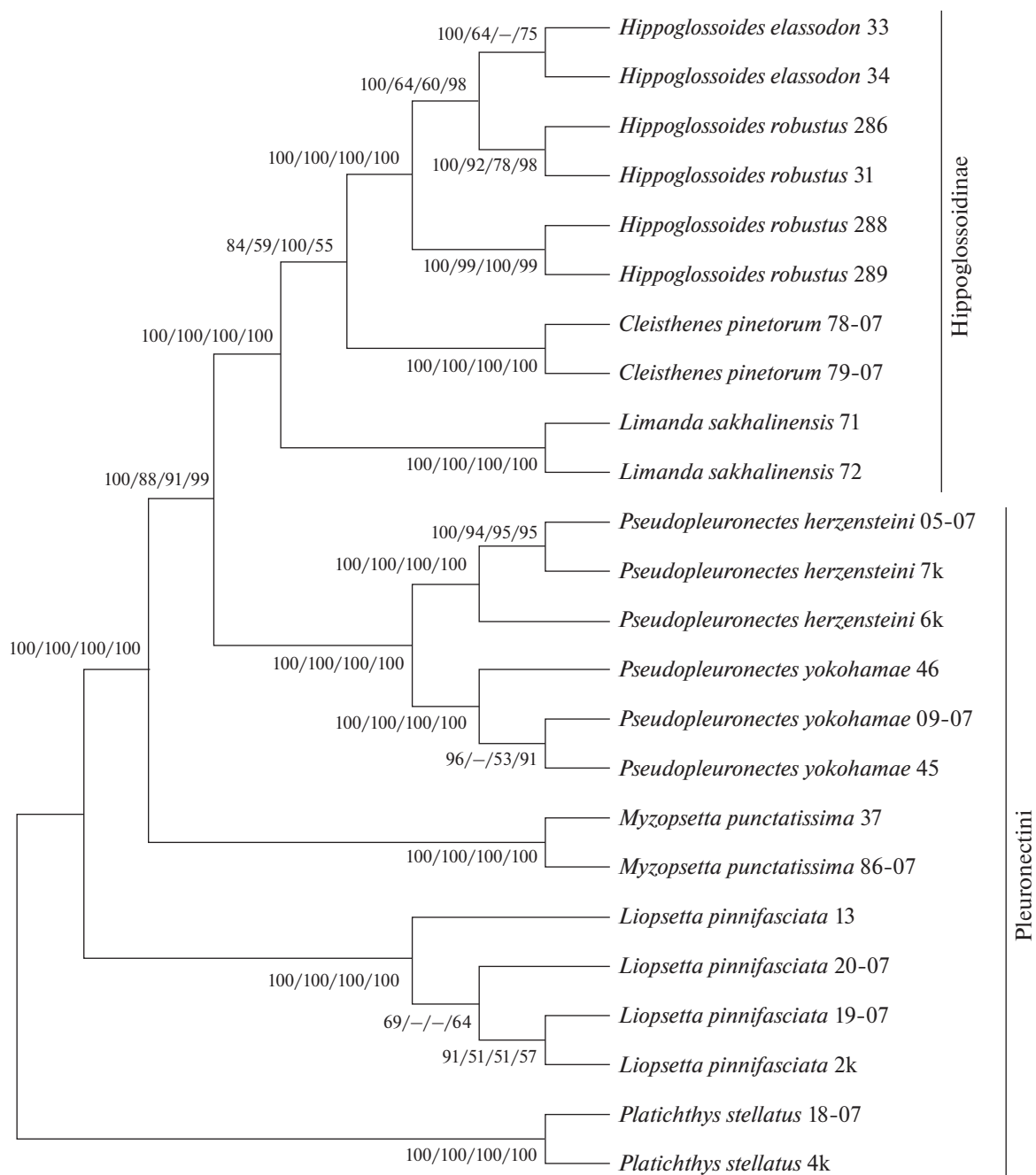


Рис. 3. Укорененное ML-дерево, показывающее филогенетические взаимоотношения на основании данных для 24 конкатенированных последовательностей участка гена *16S* рРНК, *Co-1* и *Cyt-b*. В узлах даны значения поддержек для ВА-дерева ($n = 10^6$ поколений) и для трех других реконструкций в общем порядке: ВА/NJ/ME/ML ($k = 1000$ реплик бутстрепа для трех последних методов реконструкции).

отмечено выше. Однако К.А. Винников с соавт. [31] в своем двустороннем анализе (морфология + генетика) предлагают вновь ввести синонимиию. Но синонимия так и не введена. В базах данных эти два таксона до сих пор фигурируют как самостоятельные виды. Одна из задач представленной статьи — заострить этот вопрос, с тем чтобы в специальной публикации наконец разрешить этот казус.

Отдельного обсуждения заслуживают данные для рода *Limanda*. Последовательности вида *Limanda sakhalinensis* оказались, как отмечено в результатах и представлено на рис. 1–3, включены в ветвь подсемейства Hippoglossoidinae. В сравнительном анатомическом исследовании Дж. Купера и Ф. Чаплау [1] монофилия этого рода не была подтверждена. В нашем же исследовании, как и в

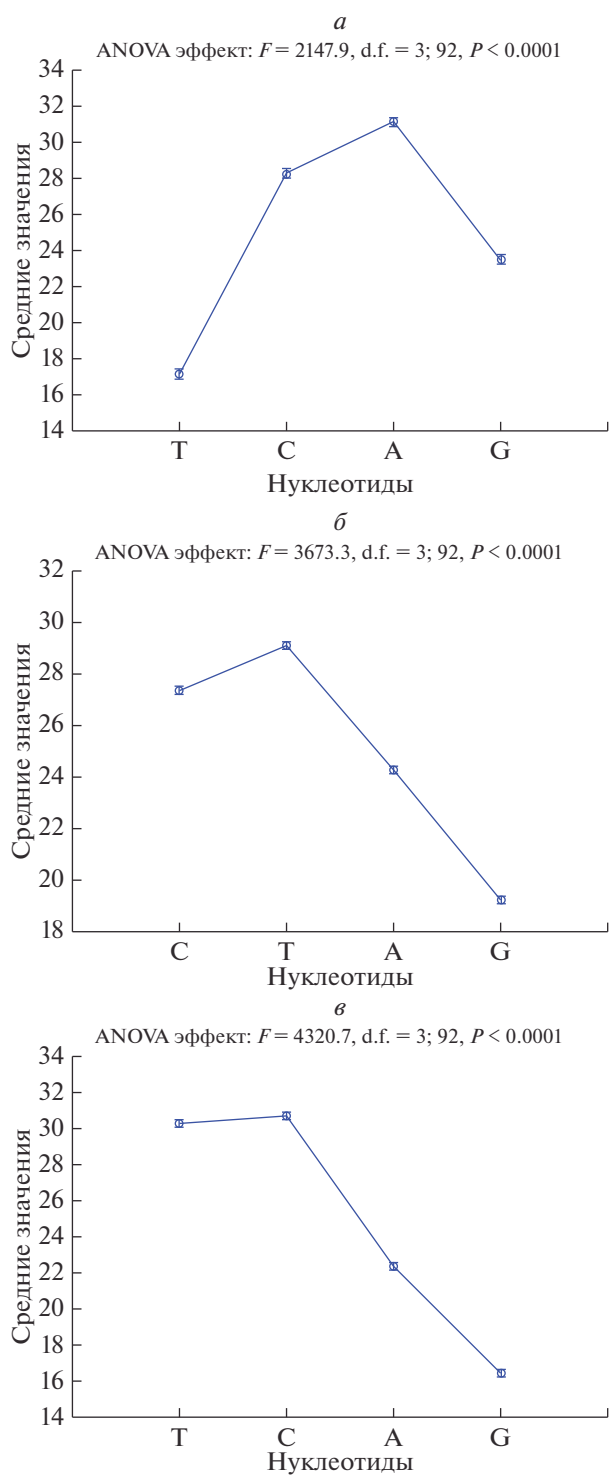


Рис. 4. Средние значения состава (%) четырех нуклеотидов в 24 исследованных последовательностях генов *16S* рРНК (*а*), *Co-1* (*б*) и *Cyt-b* (*в*). По результатам однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA). Вертикальные линии отмечают 95%-ный доверительный интервал.

предыдущих молекулярно-филогенетических исследованиях [4, 5, 10], *Limanda sakhalinensis* Hubbs, 1915 оказалась включена в подсемейство Hippoglossoidinae. Учитывая все эти данные, вполне уместно рекомендовать пересмотреть позицию *Limanda sakhalinensis* Hubbs, 1915, переместив ее в род *Hippoglossoides* с именем *Hippoglossoides* (*Limanda*) *sakhalinensis* в составе подсемейства Hippoglossoidinae. Соответственно, необходима ревизия морфологии и видовых признаков, а также диагностических ключей, что предполагается выполнить в самостоятельной работе.

Род *Lepidopsetta* (*L. mochigarei*) оказался включенным в трибу Pleuronectini, подсемейства Pleuronectinae, тогда как в работе [1] этот род рассматривался исключительно в составе трибы Microstomini подсемейства Pleuronectinae. В молекулярно-филогенетических исследованиях на основе *Co-1* и *Cyt-b* [4, 5, 10] род *Lepidopsetta* рассматривался в трибе Pleuronectini. Таким образом, род *Lepidopsetta* предпочтительнее рассматривать в составе трибы Pleuronectini. Однако этот вопрос, учитывая слабый топологический сигнал для данной ветви по маркеру *16S* рРНК в работе, требует дальнейшего уточнения с использованием большего числа генов.

Смещение в соотношении (Т + С) : (А + Т) хорошо описано в литературе для многих белок-кодирующих генов [4, 32]. Представленный анализ (рис. 4, Приложение) показывает, что смещение для генов *Co-1* и *Cyt-b* в соотношении пуринов к пиримидинам значительно отличается от смещения для гена *16S* рРНК. Очевидно, что обнаруженное смещение нуклеотидного состава для изученных в работе структурных генов отражает гидрофобные свойства кодируемых ими белков [33]. Выяснение причины неоднородности нуклеотидного состава в последовательностях *16S* рРНК требует дальнейшего исследования.

Исследование финансово поддержано грантом РФФИ 15-29-02456-офи по направлению исследования генетических основ биоразнообразия, а также Дальневосточным отделением РАН – грант ДВ № 18-4-040 по тематике “Комплексное исследование биоразнообразия рыб и беспозвоночных животных на основе ДНК-штрих кодирования, разработки и поддержки баз данных и биобанкинга”.

Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены.

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

Нуклеотидный состав для генов *16S* рРНК, *Co-1* и *Cyt-b* в 24 последовательностях камбалообразных рыб

Вид/Средние значения	Нуклеотиды, все позиции (% от общего числа)				
	Т	С	А	Г	суммарно (пн)
<i>16S</i> рРНК					
<i>Cleisthenes pinetorum</i> 78-07	16.8	28.9	29.9	24.4	291
<i>Cleisthenes pinetorum</i> 79-07	16.8	28.9	29.9	24.4	291
<i>Hippoglossoides elassodon</i> 33	16.8	28.9	30.2	24.1	291
<i>Hippoglossoides elassodon</i> 34	16.8	28.9	29.9	24.4	291
<i>Hippoglossoides robustus</i> 286	16.8	28.9	30.2	24.1	291
<i>Hippoglossoides robustus</i> 288	17.2	28.5	30.2	24.1	291
<i>Hippoglossoides robustus</i> 289	16.8	28.9	30.2	24.1	291
<i>Hippoglossoides robustus</i> 31	16.8	28.9	30.2	24.1	291
<i>Limanda sakhalinensis</i> 71	16.8	28.9	29.9	24.4	291
<i>Limanda sakhalinensis</i> 72	16.8	28.9	29.9	24.4	291
<i>Liopsetta pinnifasciata</i> 13	17.5	27.8	31.6	23.0	291
<i>Liopsetta pinnifasciata</i> 19-07	17.5	27.8	31.6	23.0	291
<i>Liopsetta pinnifasciata</i> 20-07	17.5	27.8	31.6	23.0	291
<i>Liopsetta pinnifasciata</i> 2k	17.5	27.8	31.6	23.0	291
<i>Myzopsetta punctatissima</i> 37	17.2	27.5	32.3	23.0	291
<i>Myzopsetta punctatissima</i> 86-07	17.2	27.5	32.3	23.0	291
<i>Platichthys stellatus</i> 18-07	17.2	27.8	31.3	23.7	291
<i>Platichthys stellatus</i> 4k	17.2	27.8	31.6	23.4	291
<i>Pseudopleuronectes herzensteini</i> 05-07	17.5	27.8	32.0	22.7	291
<i>Pseudopleuronectes herzensteini</i> 6k	17.5	27.8	32.0	22.7	291
<i>Pseudopleuronectes herzensteini</i> 7k	17.5	27.8	32.0	22.7	291
<i>Pseudopleuronectes obscurus</i> 09-07	17.2	28.2	32.0	22.7	291
<i>Pseudopleuronectes obscurus</i> 45	16.8	28.2	32.0	23.0	291
<i>Pseudopleuronectes obscurus</i> 46	17.2	28.2	32.0	22.7	291
Среднее значение	17.14 ± 0.13	28.26 ± 0.13	31.1 ± 0.13	23.5 ± 0.13	–
<i>Co-1</i>					
<i>Cleisthenes pinetorum</i> 78-07	29.4	27.5	23.6	19.5	1540
<i>Cleisthenes pinetorum</i> 79-07	29.4	27.3	23.7	19.5	1540
<i>Hippoglossoides elassodon</i> 33	29.3	27.6	24.0	19.2	1540
<i>Hippoglossoides elassodon</i> 34	29.1	27.6	24.0	19.4	1540
<i>Hippoglossoides robustus</i> 286	29.0	27.8	24.0	19.2	1540
<i>Hippoglossoides robustus</i> 288	29.2	27.5	24.0	19.3	1540
<i>Hippoglossoides robustus</i> 289	29.2	27.4	24.1	19.3	1540
<i>Hippoglossoides robustus</i> 31	29.0	27.8	24.0	19.2	1540
<i>Limanda sakhalinensis</i> 71	28.8	27.1	24.4	19.7	1540
<i>Limanda sakhalinensis</i> 72	28.6	27.3	24.4	19.7	1540
<i>Liopsetta pinnifasciata</i> 13	29.4	27.0	24.8	18.8	1540
<i>Liopsetta pinnifasciata</i> 19-07	29.4	27.0	24.8	18.8	1540
<i>Liopsetta pinnifasciata</i> 20-07	29.4	27.0	24.8	18.8	1540
<i>Liopsetta pinnifasciata</i> 2K	29.4	27.0	24.8	18.8	1540
<i>Myzopsetta punctatissima</i> 37	28.8	27.2	24.7	19.2	1540
<i>Myzopsetta punctatissima</i> 86-07	28.8	27.2	24.7	19.2	1540

Приложение. Продолжение

Вид/Средние значения	Нуклеотиды, все позиции (% от общего числа)				
	T	C	A	G	суммарно (пн)
<i>Platichthys stellatus</i> 18-07	29.0	27.2	24.8	19.0	1540
<i>Platichthys stellatus</i> 4K	28.8	27.3	24.8	19.0	1540
<i>Pseudopleuronectes herzensteini</i> 05-07	28.8	28.0	23.7	19.5	1540
<i>Pseudopleuronectes herzensteini</i> 6K	28.7	28.0	23.7	19.6	1540
<i>Pseudopleuronectes herzensteini</i> 7K	28.7	28.0	23.6	19.7	1540
<i>Pseudopleuronectes obscurus</i> 09-07	29.3	26.9	24.5	19.2	1540
<i>Pseudopleuronectes obscurus</i> 45	29.3	27.0	24.5	19.2	1540
<i>Pseudopleuronectes obscurus</i> 46	29.4	27.1	24.5	19.1	1540
Среднее значение	29.09 ± 0.07	27.38 ± 0.07	24.29 ± 0.07	19.25 ± 0.07	—
Cyt-b					
<i>Cleisthenes pinetorum</i> 78-07	30.8	30.9	22.5	15.9	1095
<i>Cleisthenes pinetorum</i> 79-07	30.8	30.8	22.6	15.8	1095
<i>Hippoglossoides elassodon</i> 33	30.3	31.2	22.2	16.3	1095
<i>Hippoglossoides elassodon</i> 34	30.3	31.2	22.2	16.3	1095
<i>Hippoglossoides robustus</i> 286	30.3	31.3	22.2	16.2	1095
<i>Hippoglossoides robustus</i> 288	30.6	31.1	22.1	16.3	1095
<i>Hippoglossoides robustus</i> 289	30.6	31.1	22.2	16.2	1095
<i>Hippoglossoides robustus</i> 31	30.4	31.3	22.1	16.2	1095
<i>Limanda sakhalinensis</i> 71	30.8	30.1	23.4	15.7	1095
<i>Limanda sakhalinensis</i> 72	30.8	30.2	23.3	15.7	1095
<i>Liopsetta pinnifasciata</i> 13	29.9	30.9	22.9	16.3	1095
<i>Liopsetta pinnifasciata</i> 19-07	29.7	31.0	22.9	16.4	1095
<i>Liopsetta pinnifasciata</i> 20-07	29.5	31.3	23.1	16.1	1095
<i>Liopsetta pinnifasciata</i> 2K	29.8	30.9	23.0	16.3	1095
<i>Myzopsetta punctatissima</i> 37	30.8	29.8	22.0	17.4	1095
<i>Myzopsetta punctatissima</i> 86-07	30.8	29.9	22.1	17.3	1095
<i>Platichthys stellatus</i> 18-07	30.0	30.6	22.6	16.7	1095
<i>Platichthys stellatus</i> 4K	29.8	30.8	22.9	16.5	1095
<i>Pseudopleuronectes herzensteini</i> 05-07	29.9	31.4	21.4	17.4	1095
<i>Pseudopleuronectes herzensteini</i> 6K	30.0	31.0	21.6	17.4	1095
<i>Pseudopleuronectes herzensteini</i> 7K	30.0	31.2	21.4	17.4	1095
<i>Pseudopleuronectes obscurus</i> 09-07	30.5	30.1	22.6	16.7	1095
<i>Pseudopleuronectes obscurus</i> 45	30.4	30.3	22.2	17.1	1095
<i>Pseudopleuronectes obscurus</i> 46	30.4	30.1	22.6	16.9	1095
Среднее значение	30.29 ± 0.1	30.77 ± 0.1	22.42 ± 0.1	16.52 ± 0.1	—

Примечание. Средние значения приведены со стандартной ошибкой.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Cooper J.A., Chapleau F. Monophyly and intrarelationships of the family Pleuronectidae (Pleuronectiformes), with a revised classification // Fishery Bull. 1998. V. 96. № 4. P. 686–726.
2. Keast A., Chapleau F. A phylogenetic reassessment of the monophyletic status of the family Soleidae, with comments on the suborder Soleoidei (Pisces; Pleuronectiformes) // Canad. J. Zool. 1988. V. 66. № 12. P. 2797–2810.
<https://doi.org/10.1139/z88-408>
3. Berendzen P.B., Dimmick W.W. Phylogenetic relationships of Pleuronectiformes based on molecular evidence // Copeia. 2002. V. 3. P. 642–52.
[https://doi.org/10.1643/0045-8511\(2002\)002\[0642:PROPBO\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1643/0045-8511(2002)002[0642:PROPBO]2.0.CO;2)

4. *Kartavtsev Y.P., Park T.-J., Vinnikov K.A. et al.* Cytochrome b (Cyt-b) gene sequence analysis in six flatfish species (Teleostei, Pleuronectidae), with phylogenetic and taxonomic insights // *Marine Biol.* 2007. V. 152. № 4. P. 757–773.
<https://doi.org/10.1007/s00227-007-0726-9>
5. *Kartavtsev Y.P., Sharina S.N., Goto T. et al.* Cytochrome oxidase 1 gene sequence analysis in six flatfish species (Teleostei, Pleuronectidae) of Far East Russia with inferences in phylogeny and taxonomy // *Mitochondrial DNA.* 2008. V. 19. P. 479–489.
<https://doi.org/10.1080/19401730802570934>
6. *Pardo B.G., Machordom A., Foresti F. et al.* Phylogenetic analysis of flatfish (order Pleuronectiformes) based on mitochondrial 16S rDNA sequences // *Scientia Marina.* 2005. V. 69. № 4. P. 531–543.
7. *Шарина С.Н., Картавцев Ю.Ф.* Филогенетический анализ камбал (Teleostei, Pleuronectiformes), основанный на исследовании нуклеотидных последовательностей гена цитохромоксидазы 1 (Co-1) // *Генетика.* 2010. Т. 46. № 3. С. 401–407.
8. *Betancur R.R., Munroe T.A., Ortí G. et al.* Addressing gene tree discordance and non-stationarity to resolve a multi-locus phylogeny of the Flatfishes (Teleostei: Pleuronectiformes) // *Syst. Biol.* 2013. V. 62. P. 763–785.
<https://doi.org/10.1093/sysbio/syt039>
9. *Betancur R.R., Ortí G.* Molecular evidence for the monophyly of flatfishes (Carangimorpharia, Pleuronectiformes) // *Mol. Phylogenet. and Evol.* 2014. V. 73. P. 18–22.
<https://doi.org/10.1016/j.ympev.2014.01.006>
10. *Kartavtsev Y.Ph., Sharina S.N., Saitoh K. et al.* Phylogenetic relationships of Russian Far Eastern Flatfish (Pleuronectiformes, Pleuronectidae) based on two mitochondrial gene sequences, *Co-1* and *Cyt-b*, with inferences in order phylogeny using complete mitogenome data // *Mitochondrial DNA.* 2014. V. 27. № 1. P. 667–678.
<https://doi.org/10.3109/19401736.2014.913139>
11. *Norman I.R.* A systematic monograph of the flatfishes (Heterosomata). Volume I. Psettodidae, Bothidae, Pleuronectidae. London: British Museum, 1934. 459 p.
12. *Sakamoto K.* Interrelationships of the family Pleuronectidae (Pisces: Pleuronectiformes) // *Memoirs of the Fac. of Fisheries, Hokkaido University.* 1984. V. 31. P. 95–215.
13. *Lindberg G.U., Fedorov V.V.* Fishes of Japan Sea and nearby parts of Okhotsk and Yellow seas. Part 6. Teleostomi. Osteichthyes. Actinopterygii. XXXI. Pleuronectiformes. Sankt-Petersburg Univ. Press. Sankt-Petersburg. 1993. 272 p.
14. *Chapleau F.* Pleuronectiform relationships: A cladistic reassessment // *Bull. of Marine Sci.* 1993. V. 52. № 1. P. 516–540.
15. *Vernau O., Moreau C., Catzeflis F.M., Renaud F.* Phylogeny of flatfishes (Pleuronectiformes): Comparisons and contradictions of molecular and morpho-anatomical data // *J. Fish Biol.* 1994. V. 45. № 4. P. 685–696.
<https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.1994.tb00934.x>
16. *Keith P., Lord C., Lorion J. et al.* Phylogeny and biogeography of Sicydiinae (Teleostei: Gobiidae) inferred from mitochondrial and nuclear genes // *Marine Biol.* 2011. V. 158. P. 311–326.
<https://doi.org/10.1007/s00227-010-1560-z>
17. *Kearse M., Moir R., Wilson A. et al.* Geneious Basic: An integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data // *Bioinformatics.* 2012. V. 28. № 12. P. 1647–1649.
<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts199>
18. *Tamura K., Peterson D., Peterson N. et al.* MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods // *Mol. Biol. and Evol.* 2011. V. 28. № 10. P. 2731–2739.
<https://doi.org/10.1093/molbev/msr121>
19. *Thompson J.D., Higgins D.G., Gibson T.J.* CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice // *Nucl. Ac. Res.* 1994. V. 22. № 22. P. 4673–4680.
<https://doi.org/10.1093/nar/22.22.4673>
20. *Kimura M.* A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences // *J. Mol. Evol.* 1980. V. 16. P. 111–120.
<https://doi.org/10.1007/bf01731581>
21. *Jukes T.H., Cantor C.R.* Evolution of protein molecules // *Mammalian Protein Metabolism.* Volume III. N. Y.: Academic Press, 1969. P. 21–132.
<https://doi.org/10.1016/B978-1-4832-3211-9.50009-7>
22. *Hasegawa M., Kishino H., Yano T.* Dating of the human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA // *J. Mol. Evol.* 1985. V. 22. P. 160–174.
<https://doi.org/10.1007/bf02101694>
23. *Huelsenbeck J.P., Ronquist F.* MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees // *Bioinformatics.* 2001. V. 17. № 8. P. 754–755.
<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/17.8.754>
24. *Ronquist F., Huelsenbeck J.P.* MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models // *Bioinformatics.* 2003. V. 19. № 12. P. 1572–1574.
<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btg180>
25. <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>
26. StatSoft, Inc. (1999). STATISTICA for Windows [Computer program manual]. Tulsa, OK: StatSoft, Inc. Available from: http://statsoft.ru/products/STATISTICA_Base/.
27. *Ivankov V.N., Vinnikov K.A., Borisovets E.E., Kartavtsev Y.P.* Taxonomic relations between *Pseudopleuronectes yokohamae* and *P. schrenki* // Abstract of Conference for Educated Students, Science and Education Centre. Vladivostok: Far Eastern University Press, 2002. P. 69–70.
28. *Картавцев Ю.Ф., Свиридов В.В., Ханзава Н., Сасаки Т.* Генетическая дивергенция видов дальневосточных краснопёрок рода *Tribolodon* (Pisces, Cyprinidae) и близких таксонов // *Генетика.* 2002. Т. 38. № 11. С. 1–14.
29. *Винников К.А.* О таксономическом статусе камбал *Hippoglossoides elassodon* и *H. robustus* (морфометрический анализ) // VI Региональная конференция по актуальным проблемам экологии, морской биологии и биотехнологии студентов, аспирантов,

- молодых преподавателей и сотрудников вузов и научных организаций Дальнего Востока России. Тезисы докладов. Владивосток: Изд-во Дальневосточного университета, 2003. С. 25–26.
30. Винников К.А., Иванков В.Н., Путрук Д.Л. Таксономический статус японской лиманды *Pseudopleuronectes yokohamae* и лиманды Шренка *P. schrenki* (Pleuronectidae, по: Соопер, Чаплеу, 1998) // Вопр. ихтиологии. 2006. Т. 46. № 3. С. 316–325.
31. Vinnikov K.A., Thomson R.C., Munroe T.A. Revised classification of the righteye flounders (Teleostei: Pleuronectidae) based on multilocus phylogeny with complete taxon sampling // Mol. Phylogenet. and Evol. 2018. V. 125. P. 147–162. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2018.03.014>
32. Kim I.C., Kweon H.S., Kim Y.J. et al. The complete mitochondrial genome of the javeline goby *Acanthogobius hasta* (Perciformes, Gobiidae) and phylogenetic considerations // Gene. 2004 V. 336. № 2. P. 147–153. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2004.04.009>
33. Naylor G.J., Collins T.M., Brown W.M. Hydrophobicity and phylogeny // Nature. 1995. V. 373. № 6515. P. 565–566. <https://doi.org/10.1038/373565b0>

Phylogenetic Relationships of Flounders from the Family Pleuronectidae (Ostichties: Pleuronectiformes) Based on 16S rRNA Gene

A. D. Redin^{a,*} and Yu. Ph. Kartavtsev^{a,**}

^aZhirmunsky National Scientific Center of Marine Biology Far East Branch of the Russian Academy of Sciences, Vladivostok, 690041 Russia

*e-mail: shurko92@yandex.ru

**e-mail: yuri.kartavtsev48@hotmail.com

The systematics and phylogeny of flatfish is investigated on the incomplete nucleotide sequence of 16S rRNA and the complete *Co-1* and *Cyt-b* sequences. In total 62 specimens of 14 species of our own collections were submitted to the GenBank/BOLD repositories and studied. Four types of gene trees were reconstructed: Bayesian (BA), maximum likelihood (ML), minimum evolution (ME), and neighbor joining (NJ). These trees showed basically similar topology. Two separate branches on the trees support the previously identified subfamilies Hippoglossoidinae and Pleuronectinae with the monophyletic status of these taxa. The subfamily Pleuronectinae can be considered monophyletic, if the tribe Microstomini is excluded from it and genus *Lepidopsetta* is moved into the tribe Pleuronectini. Three sets of nucleotide sequences were formed and independently studied. One set included all the obtained 16S rRNA gene sequences (291 bp), the second set included a sample of longer 16S rRNA sequences (617 bp), the third set consisted of three gene sequences: 16S rRNA, *Co-1* and *Cyt-b* (2926 bp). All three data sets gave similar phylogenetic signal, which consistent with the traditional concept of the taxonomy of the Pleuronectiformes order; however, the second and third sets provided better resolution of topology.

Keywords: *Co-1*, *Cyt-b*, 16S rRNA, flatfish, molecular phylogenetics.