

УДК 576.312:597.58

МОЛЕКУЛЯРНО-ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ НЕКОТОРЫХ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ БЕЛЬДЮГОВИДНЫХ РЫБ (*Perciformes, Zoarcoidei*) ДАЛЬНЕВОСТОЧНЫХ МОРЁЙ, ОСНОВАННОЕ НА НУКЛЕОТИДНОЙ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ МИТОХОНДРИАЛЬНОГО ГЕНА ЦИТОХРОМОКСИДАЗЫ 1 (*Co-1*)

© 2012 г. С. В. Туранов, Ю. Ф. Картавцев, В. В. Земнухов

Учреждение Российской академии наук Институт биологии моря им. А. В. Жирмунского
Дальневосточного отделения РАН, Владивосток 690041

e-mail: yuri.kartavtsev48@hotmail.com

Поступила в редакцию 24.05.2011 г.

Проанализировано 95 нуклеотидных последовательностей фрагмента гена *Co-1* длиной около 650 пар нуклеотидов, представляющих окунеобразных и скорпенообразных (внешняя группа) рыб. Генные деревья, построенные на основании четырех алгоритмов (BA, NJ, MP, ML), оказались сходными по топологии разрешенных ветвей. Хотя основной акцент сделан на видовом и родовом уровнях, значимый филогенетический сигнал получен и для более высоких таксономических категорий. В частности, подтверждена монофилия семейства *Zoarcidae* и подсемейства *Opisthocentrinae* (*Stichaeidae*). Доли различающихся нуклеотидов в сравниваемых последовательностях (*p*-расстояния) достоверно увеличиваются по мере возрастания таксономической иерархии. Значения *p*-расстояний для четырех уровней иерархии составили (%): (1) внутривидовой – 0.15 ± 0.06 ; (2) внутриродовой – 6.33 ± 0.37 ; (3) внутрисемейственный – 11.83 ± 0.06 ; (4) внутриотрядный – 15.22 ± 0.05 . Различие между уровнями 1–2 по изученным фрагментам гена *Co-1* составляет основу практически безошибочной идентификации представителей видов по данному своеобразному молекулярному штрихкоду.

Молекулярно-филогенетический анализ таксонов на уровне вид – семейство в настоящее время чаще всего выполняют используя нуклеотидные последовательности (далее – последовательности) генов субъединицы 1 цитохромоксидазы с (цитохромоксидаза 1, *Co-1*) и цитохрома *b* (*Cyt-b*) митохондриального генома [1, 2]. При исследовании таксонов более высокого ранга анализ этих генов может давать неадекватные результаты вследствие насыщения мутациями из-за повторных замен нуклеотидов или эффекта гомоплазии. Тем не менее последовательности данных генов оказались весьма полезными при идентификации видов и реконструкции филогенетических отношений в самых разных таксонах [3–5], в том числе рыб, вплоть до уровня отряда [1, 4, 6, 7]. Кроме того, величины генетического расстояния (*p*-расстояния) позволяют судить о таксономическом положении особей, поскольку достаточно хорошо характеризуют определенный уровень и значительно увеличиваются от нижнего иерархического или таксономического уровня к более высокому, т.е. с возрастанием иерархии или ранга таксона [1, 2, 4–7].

В настоящее время в таксономии рыб имеется множество спорных вопросов, связанных, в частности, с отрядом окунеобразных (*Perciformes*).

Отряд включает около 6000 видов и является одним из наиболее крупных среди рыб [8]. Исследование филогенетии является наиболее актуальной проблемой для такой многочисленной группы. Таксономическое положение многих семейств в подотрядах остается неясным. Более того, и семейства и подотряды не могут быть однозначно признаны монофилетическими, что является требованием современной систематики [9]. В частности, особый интерес у авторов вызывает семейство стихеевые (*Stichaeidae*), которое относится к подотряду бельдюговидных рыб (*Zoarcoidei*) и насчитывает на данный момент 80 видов, объединяющихся в 6 подсемейств и 38 родов [10–12]. Много нерешенных таксономических вопросов имеется также на родовом и видовом уровнях в других подотрядах и семействах, и наличие монофилии во многих этих таксонах остается неопределенным [8].

Молекулярно-филогенетический анализ стихеевых рыб уже выполнялся в нескольких работах [7, 13, 14]. В работе Степьена [13] при рассмотрении эволюции бленниид (*Blennioidei*) были исследованы лишь единичные экземпляры семейства, что не дает информации, достаточной для суждения о его филогенетии. Радченко с соавт. [14] проводили исследования на уровне всего подот-

ряда Zoarcoidei. В результатах работы отмечено обособление подсемейств Opisthocentrinae и Chirolophinae, а также Lumpeninae и Stichaeinae. В работе Картавцева с соавт. [7] Opisthocentrinae также объединяются с Chirolophinae, но Stichaeinae выступает как дочерняя ветвь Chirolophinae, что согласуется с традиционной систематикой данной группы [15].

Цель настоящего исследования — проведение молекулярно-филогенетического анализа некоторых представителей бельдюговидных рыб (Zoarcoidei) с использованием данных по последовательностям гена *Co-1*.

В соответствии с поставленной целью можно выделить три основные задачи:

- 1) исследование генетической дивергенции (*p*-расстояний) внутри видов и в возрастающей иерархии сопоставленных таксонов бельдюговидных рыб по гену *Co-1*;

- 2) анализ нуклеотидного состава в последовательностях изученных представителей бельдюговидных рыб;

- 3) выявление особенностей молекулярно-генетической дивергенции и филогенетических отношений в изученных таксонах бельдюговидных рыб, с фокусированием на семействах Stichaeidae и Zoarcidae.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для сравнительного филогенетического анализа было использовано 95 последовательностей гена *Co-1* (табл. 1). В их числе 70 оригинальных последовательностей и 25 из генного банка GenBank, NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) [16]. Всего к анализу было привлечено 36 видов из пяти семейств окунеобразных: Stichaeidae (25 видов), Zoarcidae (7 видов), Bathymasteridae (2 вида), Lobotidae (1 вид) и Ammodytidae (1 вид), а также один представитель отряда скорпенообразных (*Dasyctottus setiger* Bean, 1890). Материал для исследования был собран из траловых уловов в Беринговом море в ходе экспедиции на научно-исследовательском судне “ТИНРО” в 2008 г. В Японском море сбор материала проводили с 2009 по 2010 г. с помощью жаберных сетей, малькового невода и креветочных ловушек (рис. 1). Определение рыб проводили по Линдбергу и Красюковой [17]; представители родов *Pholidapus* и *Opisthocentrus* были определены с помощью ключей из работы Шиогаки [18]. Номенклатура видовых называний представлена по [19]. Мышечная ткань для генетического анализа была взята отдельно у каждого экземпляра и зафиксирована в 96%-ном этиловом спирте. Большинство исследованных экземпляров рыб с соответствующими каталожными (ваучерными) номерами помещены в фиксированном виде в коллекцию Музея Института

биологии моря им. А.В. Жирмунского (ИБМ; куратор — А.А. Баланов), а их цветные фотографии вместе с полной информацией об образцах и генетическими сведениями размещены в базе данных BOLD [20] (<http://www.boldsystems.org/>) глобальной программы iBOL.

ДНК из мышечной ткани была выделена с помощью хлороформ-фенольного метода [21] с небольшими модификациями [7]. Последовательности митохондриального гена *Co-1* длиной примерно в 650 пар нуклеотидов (пн) были амплифицированы посредством полимеразной цепной реакции (ПЦР) с использованием двух праймеров: FishF1-5'-TCAACCAACCACAAAGA-CATTGGCAC-3' и FishR1-5'-TAGACTTCTGG-GTGGCCAAGAACATCA-3' [4]. Реакционная смесь для ПЦР (25 мкл) включала: дистиллированную воду — 17.4 мкл; 10× буфер (TaKaRa, Япония) — 2.5 мкл; смесь dNTP (концентрация каждого трифосфата — 2.5 ммоль) — 2.0 мкл; праймеры (20 пмоль/мкл) — по 1 мкл; *Taq*-полимеразу (5 ед./мкл) — 0.1 мкл; ДНК — 1 мкл. ПЦР проводили на амплификаторах Mastercycler® Eppendorf и My Cycler(tm) Thermal Cycler BIORAD по следующей программе: денатурация 94°C — 5 мин, 94°C — 30 с, отжиг 60°C — 30 с, синтез 72°C — 1 мин для 30 циклов; последний цикл 72°C — 7 мин. Продукты ПЦР подвергали электрофорезу в 1%-ном агарозном геле, окрашивали раствором бромистого этидия и просматривали в проходящем ультрафиолетовом свете. Для определения длины ампликонов использовали 100-пн ДНК-маркер. Наиболее качественные пробы были отобраны для последующих операций и очищены спиртами (96% и 70%) по стандартной методике. Далее было проведено циклосеквенирование. Физическая идентификация нуклеотидных последовательностей выполнена на секвенаторах ABI-3130 (Applied Biosystems, USA) на базе ИБМ и Дальневосточного Федерального университета (Владивосток).

Для каждой особи были получены две антипараллельные последовательности. Формирование консенсусных последовательностей проводили в редакторе ChromasPro [22]. Затем они были размещены в геном банке [16], а также частично в BOLD [20]. Выбор оптимальной модели нуклеотидных замен для последующего построения генетических деревьев был выполнен по программе Modeltest 3.7 [23] с вовлечением в расчеты также пакета PAUP* 4.0 [24]. Модель GTR + I + G была выбрана как оптимальная для используемого набора данных согласно информационному критерию Акайке. Для расчета топологии Байесовского дерева (ВА) использовали программный пакет MrBayes 3.1 [25]. Выравнивание последовательностей проводили в программном пакете (ПП) MEGA 5 [26] с помощью утилиты Clustal-W в два этапа. На первом этапе значение штрафов за от-

Таблица 1. Видовые названия с идентификационными ваучерными номерами и номерами из генного банка с указанием места взятия пробы

№	Видовое название	Идентификационный номер экземпляра	Идентификационный номер в GenBank	Место взятия экземпляра или последовательности
1	<i>Acantholumpenus mackayi</i> (Gilbert, 1896)	AM3	HQ704734	Россия, Японское море
2	<i>Alectrias alectrolophus</i> (Pallas, 1814)	317	FJ932610	Генний банк NCBI
3	<i>Ammodytes hexapterus</i> Pallas, 1814	308	HQ704752	Россия, Берингово море
4	<i>A. hexapterus</i> Pallas, 1814	309	HQ704753	То же
5	<i>A. hexapterus</i> Pallas, 1814	310	HQ704754	»
6	<i>Anisarchus mediuss</i> (Reinhardt, 1837)	281	HQ704777	»
7	<i>A. mediuss</i> (Reinhardt, 1837)	282	HQ704778	»
8	<i>A. mediuss</i> (Reinhardt, 1837)	283	HQ704779	»
9	<i>A. mediuss</i> (Reinhardt, 1837)	284	HQ704780	»
10	<i>A. mediuss</i> (Reinhardt, 1837)	285	HQ704781	»
11	<i>Anoplarchus purpurescens</i> Gill, 1861	5846	FJ164282	Генний банк NCBI
12	<i>A. purpurescens</i> Gill, 1861	5847	FJ164281	То же
13	<i>A. purpurescens</i> Gill, 1861	5848	FJ164280	»
14	<i>Askoldia variegata</i> Pavlenko, 1910	AV1	JF343542	Россия, Татарский пролив
15	<i>A. variegata</i> Pavlenko, 1910	AV2	JF343543	То же
16	<i>A. variegata</i> Pavlenko, 1910	AV3	JF343544	»
17	<i>Bathymaster signatus</i> Cope, 1873	141	HQ704765	Россия, Берингово море
18	<i>B. signatus</i> Cope, 1873	142	HQ704766	То же
19	<i>B. signatus</i> Cope, 1873	143	HQ704767	»
20	<i>B. signatus</i> Cope, 1873	144	HQ704768	»
21	<i>B. signatus</i> Cope, 1873	145	HQ704769	»
22	<i>Bothrocara zestum</i> Jordan & Fowler, 1902	102	HQ704771	»
23	<i>B. zestum</i> Jordan & Fowler, 1902	105	HQ704772	»
24	<i>Cebidichthys violaceus</i> (Girard, 1854)	MFC387	GU440267	Генний банк NCBI
25	<i>Chirolophis decoratus</i> (Jordan & Snyder, 1902)	MFC239	GU440277	То же
26	<i>Chirolophis japonicus</i> Herzenstein, 1890	CJ3	HQ704732	Россия, Японское море
27	<i>Chirolophis nugator</i> (Jordan & Williams, 1895)	MFC338	GU440279	Генний банк NCBI
28	<i>Dasycottus setiger</i> Bean, 1890	62	HQ704756	Россия, Берингово море
29	<i>Ernogrammus hexagrammus</i> (Schlegel, 1845)	1196	FJ932611	Генний банк NCBI
30	<i>E. hexagrammus</i> (Schlegel, 1845)	E1	HQ704722	Россия, Японское море
31	<i>E. hexagrammus</i> (Schlegel, 1845)	E2	HQ704723	То же
32	<i>E. hexagrammus</i> (Schlegel, 1845)	E3	HQ704724	»
33	<i>E. hexagrammus</i> (Schlegel, 1845)	E4	HQ704725	»
34	<i>E. hexagrammus</i> (Schlegel, 1845)	E5	HQ704726	»
35	<i>Eselenichthys carli</i> (Follett & Anderson, 1990)	MFC200	GU440318	Генний банк NCBI
36	<i>Kasatkia seigeli</i> Posner & Lavenberg, 1999	SIO03-92	HQ010045	То же
37	<i>Leptoclinus maculatus</i> (Fries, 1838)	263	HQ704750	Россия, Берингово море
38	<i>L. maculatus</i> (Fries, 1838)	264	HQ704751	То же
39	<i>Lobotes surinamensis</i> (Bloch, 1790)	LOS1	HQ704735	Россия, Японское море
40	<i>Lumpenella longirostris</i> (Evermann & Goldsborough, 1907)	441	FJ164727	Генний банк NCBI
41	<i>L. longirostris</i> (Evermann & Goldsborough, 1907)	442	FJ164730	То же
42	<i>L. longirostris</i> (Evermann & Goldsborough, 1907)	448	FJ164729	»
43	<i>Lumpenus sagitta</i> Wilimovsky, 1956	302	HQ704782	Россия, Берингово море
44	<i>L. sagitta</i> Wilimovsky, 1956	303	HQ704783	То же
45	<i>L. sagitta</i> Wilimovsky, 1956	304	HQ704784	»
46	<i>L. sagitta</i> Wilimovsky, 1956	LS1	HQ704731	Россия, Японское море
47	<i>Lycenchelys crotalinus</i> (Gilbert, 1890)	231	HQ704760	Россия, Берингово море

Таблица 1. Окончание

№	Видовое название	Идентификационный номер экземпляра	Идентификационный номер в GenBank	Место взятия экземпляра или последовательности
48	<i>L. crotalinus</i> (Gilbert, 1890)	234	HQ704761	To же
49	<i>Lycodes brevipes</i> Bean, 1890	108	HQ704757	»
50	<i>L. brevipes</i> Bean, 1890	109	HQ704758	»
51	<i>L. brevipes</i> Bean, 1890	110	HQ704759	»
52	<i>L. concolor</i> Gill & Townsend, 1897	226	HQ704773	»
53	<i>L. concolor</i> Gill & Townsend, 1897	227	HQ704774	»
54	<i>L. concolor</i> Gill & Townsend, 1897	228	HQ704775	»
55	<i>L. concolor</i> Gill & Townsend, 1897	230	HQ704776	»
56	<i>Lycodes beringi</i> Andriashev, 1935	59	HQ704755	»
57	<i>Lycodes palearis</i> Gilbert, 1896	236	HQ704762	»
58	<i>L. palearis</i> Gilbert, 1896	237	HQ704763	»
59	<i>L. palearis</i> Gilbert, 1896	238	HQ704764	»
60	<i>Lycodes raridens</i> Taranetz & Andriashev, 1937	311	HQ704785	»
61	<i>L. raridens</i> Taranetz & Andriashev, 1937	312	HQ704786	»
62	<i>L. raridens</i> Taranetz & Andriashev, 1937	313	HQ704787	»
63	<i>L. raridens</i> Taranetz & Andriashev, 1937	314	HQ704788	»
64	<i>Opisthocentrus ocellatus</i> (Tilesius, 1811)	OO1	HQ704736	Россия, Японское море
65	<i>O. ocellatus</i> (Tilesius, 1811)	OO11	HQ704741	To же
66	<i>O. ocellatus</i> (Tilesius, 1811)	OO2	HQ704737	»
67	<i>O. ocellatus</i> (Tilesius, 1811)	OO3	HQ704738	»
68	<i>O. ocellatus</i> (Tilesius, 1811)	OO5	HQ704740	»
69	<i>Opisthocentrus tenuis</i> Bean & Bean, 1897	OT5	HQ704739	»
70	<i>O. tenuis</i> Bean & Bean, 1897	OT4	EU200481	»
71	<i>Opisthocentrus zonope</i> Jordan & Snyder, 1902	OZ1	HQ704727	»
72	<i>O. zonope</i> Jordan & Snyder, 1902	OZ2	HQ704728	»
73	<i>O. zonope</i> Jordan & Snyder, 1902	OZ3	HQ704729	»
74	<i>O. zonope</i> Jordan & Snyder, 1902	OZ4	HQ704730	»
75	<i>Ph. dybowskii</i> (Steindachner, 1880)	PhD1	HQ704746	»
76	<i>Ph. dybowskii</i> (Steindachner, 1880)	PhD2	HQ704747	»
77	<i>Ph. dybowskii</i> (Steindachner, 1880)	PhD3	HQ704748	»
78	<i>Plectobranchus evides</i> Gilbert, 1890	04HBL008132	FJ165022	Генный банк NCBI
79	<i>Poroclinus rothrocki</i> Bean, 1890	533	FJ165043	To же
80	<i>P. rothrocki</i> Bean, 1890	534	FJ165039	»
81	<i>P. rothrocki</i> Bean, 1890	622	FJ165040	»
82	<i>Ronquilus jordani</i> (Gilbert, 1889)	TZ-06-RICKER-774	FJ165103	»
83	<i>R. jordani</i> (Gilbert, 1889)	TZ-06-RICKER-775	FJ165104	»
84	<i>R. jordani</i> (Gilbert, 1889)	TZ-06-RICKER-779	FJ165105	»
85	<i>R. jordani</i> (Gilbert, 1889)	TZ-06-RICKER-785	FJ165106	»
86	<i>R. jordani</i> (Gilbert, 1889)	TZ-06-RICKER-830	FJ165107	»
87	<i>Stichaeopsis nevelskoi</i> (Schmidt, 1904)	SN1	HQ704733	Россия, Японское море
88	<i>Stichaeus ochriamkini</i> Taranetz, 1935	SO1	HQ704742	To же
89	<i>S. ochriamkini</i> Taranetz, 1935	SO3	HQ704743	»
90	<i>S. ochriamkini</i> Taranetz, 1935	SO4	HQ704744	»
91	<i>S. ochriamkini</i> Taranetz, 1935	SO5	HQ704745	»
92	<i>Stichaeus punctatus</i> (Fabricius, 1780)	210	HQ704770	Россия, Берингово море
93	<i>Xiphister mucosus</i> (Girard, 1858)	5073	FJ165465	Генный банк NCBI
94	<i>X. mucosus</i> (Girard, 1858)	5074	FJ165466	To же
95	<i>X. mucosus</i> (Girard, 1858)	5075	FJ165467	»



Рис. 1. Карта с указанием мест взятия проб. Эллипсами указаны места поимки исследуемых экземпляров рыб в Японском и Беринговом морях.

крытие пропусков было равно 15, штрафов за удаление пропусков – 5 единицам как для попарных, так и для множественных процедур выравнивания. На втором этапе значения штрафов были уменьшены до 5 и 0.5 соответственно. Пробелы после каждого этапа выравнивания были удалены. Расчеты и визуализация деревьев ближайшего соседства (NJ), максимальной парсимонии (MP) и максимального правдоподобия (ML) выполнены в MEGA 5 [26]. В связи с отсутствием в данной программе опции применения модели GTR+I+G для построения NJ-дерева использовали модель нуклеотидных замен, близкую к выбранной ранее – модель Tamura–Nei, с включением гамма-параметра ($G = 0.9$) и доли неизменных сайтов ($I = 0.56$). При построении MP-дерева использован метод поиска стартовых деревьев по принципу обмена ближайшими соседями (CNI, close-neighbor-interchange) при уровне поиска 1. Использована опция случайного добавления стартовых деревьев (10 реплик) при CNI поиске. Для оценки устойчивости топологии деревьев использовался бутстреп-тест: для алгоритмов MP и NJ – 1000, для ML – 500 реплик. На основе этих реплик строили консенсусные деревья с пороговым уровнем – 50%. BA-деревья рассчитаны для 10^6 модельных поколений. Расчетные опции программы BA: MCMCP ngen = 1000000, printfreq = 1000, samplefreq = 1000, nchains = 4, и SUMP

burnin = 100; остальные параметры были заданы как опции по умолчанию. По результатам анализа получено 19652 дерева. На их основе сконструировано 50%-ное консенсусное дерево, включавшее 9851 расчетное дерево.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Общая длина анализируемых последовательностей после процедуры выравнивания составила 524 пн. Топология полученных BA, NJ, MP и ML консенсусных деревьев оказалась принципиально схожей для родового и видового уровней. Различались только значения поддержки в узлах ветвления. Топология деревьев для более высоких иерархических уровней, как правило, не была полностью разрешенной и, соответственно, не являлась схожей в указанных алгоритмах. Однако ветви семейства (сем.) Zoarcidae и подсемейства Opisthocentrinae хорошо поддержаны для всех четырех способов реконструкции деревьев. Для иллюстративных целей за основу взято BA-дерево как наиболее полно разрешенное топологически (рис. 2).

Сконструированные деревья укореняли, где необходимо, к внешнему таксону (out-group), в составе *Dasycottus setiger*. К этому виду присоединяются *Ammodytes hexapterus* и *Lobotes surinamensis*, выделяясь в отдельную ветвь с поддержкой в

разных алгоритмах (98/54/59/72) (рис. 2). Здесь и далее порядок поддержки ветвей или узлов указан для ВА, NJ, MP и ML деревьев, соответственно, в процентах; пропуски обозначают отсутствие поддержки в том или ином алгоритме. Представители *A. hexapterus* и *L. surinamensis* разделяются на две ветви с поддержкой общего узла (поддержка узла – 98/54/59/72).

На уровне семейств четкую монофилетическую ветвь образуют представители сем. Zoarcidae (99/100/99/99). Первыми в полученной топологии отдельную ветвь образуют представители вида *Lycenchelys crotalinus*. Затем от основного дерева ответвляется вид *Bothrocara zestum* (57/67/65/-). Далее идет разделение на две ветви (92/54/59/62), одну из которых формирует единственный представитель *Lycodes beringi*, а другую образуют виды *L. brevipes*, *L. palearis*, *L. raridens* и *L. concolor*. В последней ветви последовательно образуют самостоятельные линии *L. concolor* (99/89/69/80) и *L. raridens* (91/51/56/54), а затем *L. palearis* и *L. brevipes* формируют общую ветвь (91/51/54/54), являясь генетически наиболее схожими при данной топологии в семействе.

Отдельную устойчивую ветвь формируют представители подсемейства Opisthocentrinae сем. Stichaeidae, причем один из представителей подсемейства (*Plectobranchus evides*) является базальным по отношению ко всему подсемейству, выступая как неразрешенная ветвь дерева. Подсемейство представлено пятью родами и семьью видами. Первым от основной ветви отделяется *Kasatkia seigeli* (99/91/74/92). Затем происходит раздвоение ветви на две обособленные группы (96/87/60/75), включающие представителей рода *Opisthocentrus* и виды *Ascoldia variegata* и *Pholidapus dybowskii*, которые в свою очередь разделяются на две видовые ветви (51/72/60/75). Среди представителей рода *Opisthocentrus* первыми отделяются *O. zonope* (99/97/84/98), затем происходит обособление видов *O. ocellatus* и *O. tenuis* с поддержкой (90/99/88/54).

Кроме этого, можно отметить обособление некоторых представителей подсемейств Stichaeinae, Chirolophinae и Xiphisterinae семейства стихеевых в отдельные, топологически неразрешенные ветви. На ВА-дереве отмечено обособление нескольких ветвей надсемейственного уровня, которые не имеют высокой статистической поддержки, а в других подходах вообще не разрешены топологически. Объединяются ветви видов *Alectrias alectrolophus* и *Anoplarchus purpurescens* (99/86/69/94), а также ветви рода *Chirolophis*, с поочередным от-

ветвлением *Ch. japonicus* (100/95/87/92) и *Ch. nugator* с *Ch. decoratus* (99/100/99/100). Остальные ветви представлены одиночными видами: *Stichaeopsis nevelskoi*, *Ernogrammus hexagrammus* и *Xiphister mucosus* без значительных (более 70–80%) поддержек.

В подсемействе Lumpeninae сем. Stichaeidae совместную ветвь образуют виды *Leptoclinus maculatus* и *Anisarchus medius* (54/-/-/-), которые объединяются в одну группу с представителями сем. Zoarcidae. Ветви *Lumpenella longirostris*, *Poroclinus rothrocki*, *Acantholumpenus mackayi* и *Lumpenus sagitta* выступают как неразрешенные.

Семейство Bathymasteridae (*Bathymaster signatus*, *Ronquilus jordani*) не образует обособленной ветви, представляя полифилетическую группу. На дереве имеется несколько неразрешенных ветвей, в частности такими являются остальные представители подсемейства Xiphisterinae сем. Stichaeidae, формируя общий узел с видами *Cebidichthys violaceus* и *Esselenichthys carli* с поддержкой узла (98/87/90/91).

Для оценки дивергенции на различных таксономических уровнях были вычислены средние значения *p*-расстояний из матрицы попарных расстояний (см. Приложение-Таблицу). В ходе этого анализа из треугольной матрицы брали значения, которые затем распределяли на четыре группы в соответствии с рангом таксона; далее для каждой группы вычисляли средние арифметические величины и степень их различия с помощью однофакторного дисперсионного анализа в Statistica 6.0 [27]. Это позволило составить представление о нуклеотидном разнообразии на четырех различных уровнях иерархии: (1) внутривидовом, для особей одного вида; (2) внутриродовом, для особей одного рода; (3) внутрисемейственном, для особей, принадлежащих к одному семейству, и (4) внутриотрядном, для особей, принадлежащих к одному отряду (рис. 3). Средние значения *p*-расстояния для соответствующих таксономических уровней составили: (1) 0.15% ± 0.06; (2) 6.00% ± 0.37; (3) 12.00% ± 0.06; (4) 15.00% ± 0.05 (средняя ± стандартная ошибка).

Однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA) изменчивости *p*-расстояний внутри групп и между группами сравнения выявил значимые различия средних значений в четырех группах: $F = 1075.5$; $d.f. = 3$; 4192; $P < 0.0001$. Приведенные выше средние значения *p*-расстояний с ошибками и дисперсионный анализ показывают, что *p*-расстояния для внутривидовой, внутриродовой, внутрисемейственной и внутриотрядной

Рис. 2. Укорененное консенсусное дерево, показывающее филогенетические взаимоотношения окунеобразных 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% (BA). Рядом с узлами показана их статистическая поддержка в порядке: BA, NJ, MP, ML.

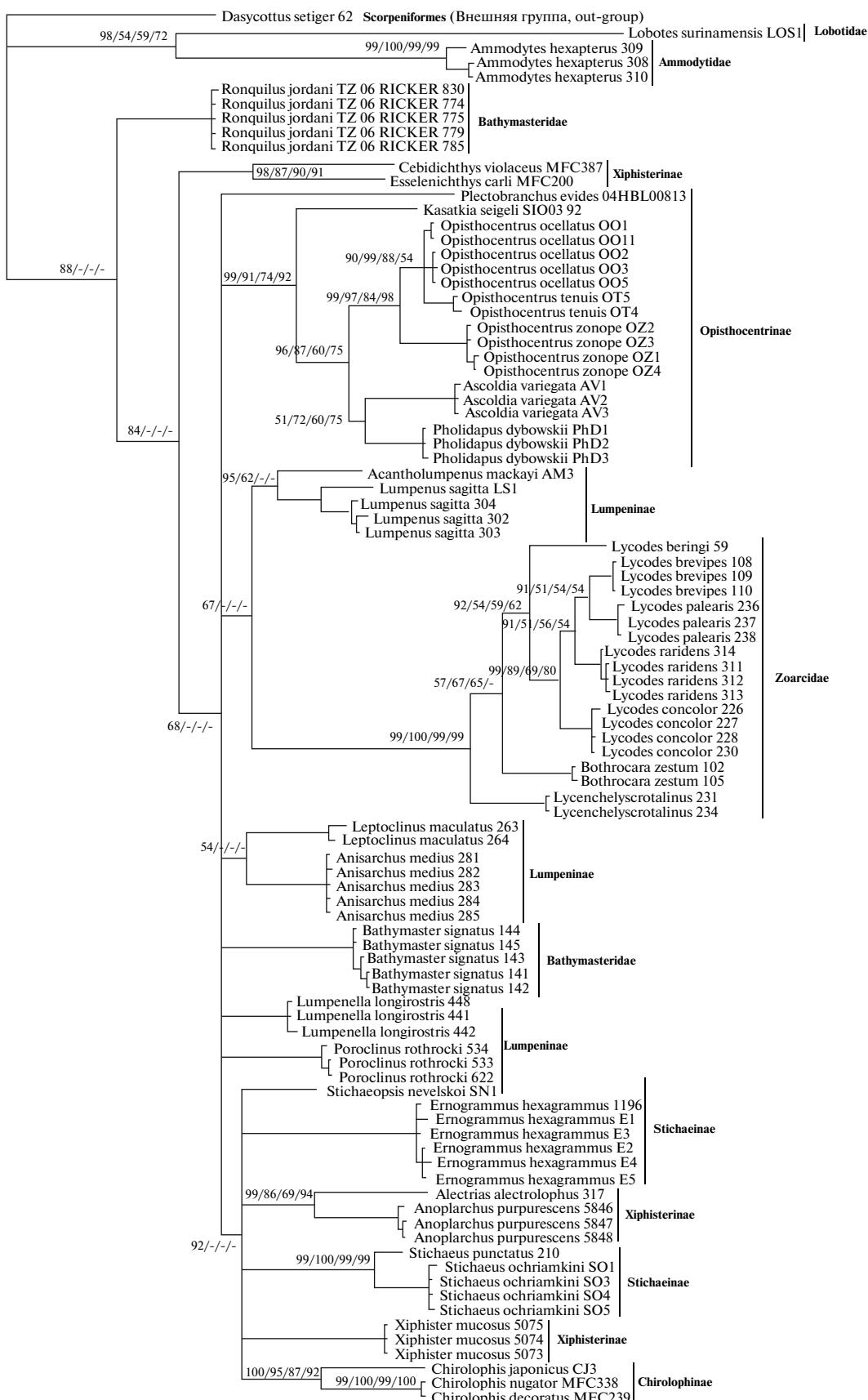


Таблица 2. Средние значения (в %) нуклеотидного состава проанализированных последовательностей гена *Co-1*. (Средняя ± стандартная ошибка.)

Нуклеотиды	T(U)	C	A	G
Данные генного банка	30.5 ± 0.24	27.6 ± 0.24	23.2 ± 0.24	18.7 ± 0.24
Оригинальные данные	29.7 ± 0.14	28.5 ± 0.14	23.0 ± 0.14	18.9 ± 0.14

групп сравнения в рамках подотряда Zoarcoidei различны.

Значения частоты нуклеотидов обнаруживают неоднородность (табл. 2), обусловленную в основном преобладанием пиримидинов как в наших последовательностях *Co-1* (группа I), так и в последовательностях генного банка (группа II) (рис. 4). Двухфакторный дисперсионный анализ (ANOVA) изменчивости пиримидиновых и пуриновых оснований в этих двух группах сравнения обнаружил статистическую значимость различия средних для главного фактора – частот четырех типов нуклеотидов: $F = 5.9635$; $d.f. = 3$; 380; $P = 0.00056$. При этом частоты однотипных нуклеотидов в последовательностях в самих группах I и II не отличаются (рис. 4).

ОБСУЖДЕНИЕ

Топология *Co-1* генных деревьев позволяет говорить о недостаточной информационной емкости использованных последовательностей длиной 524 пн для разрешения всех ветвей и, соответственно, определения взаимоотношений большинства таксономических групп. Как представлено в разделе Результаты, многие ветви высокого

уровня иерархии на молекулярно-филогенетических деревьях не являются топологически разрешенными (рис. 2). В то же время необходимо отметить, что последовательности *Co-1* особей одного и того же вида во всех родах располагаются по отношению друг к другу в самых тесных кластерах, обладая минимальными *p*-расстояниями. Эти расстояния составляют в среднем величину $0.15\% \pm 0.06$ (рис. 3). Тогда как последовательности разных видов одного рода формируют обособленные ветви, с *p*-расстояниями, составляющими в среднем величину $6.00\% \pm 0.37$ (рис. 3). Монофилия анализируемых родов хорошо поддержана во всех четырех алгоритмах реконструкции деревьев (рис. 2). Подобная особенность ветвей дерева и различия *p*-расстояния, более чем на порядок величины, между внутривидовым и межвидовым уровнями составляют основу штрихкодирования видов на основе ДНК. То есть для диагностики видов на уровне родов информационной емкости изученных последовательностей *Co-1* вполне достаточно, что хорошо согласуется с литературными данными [1, 4, 6, 7].

Неплохо поддержана топология дерева *Co-1* и на уровне одного семейства и двух подсемейств. Наиболее надежно подкреплены поддержкой в узлах и образуют монофилетические ветви пред-

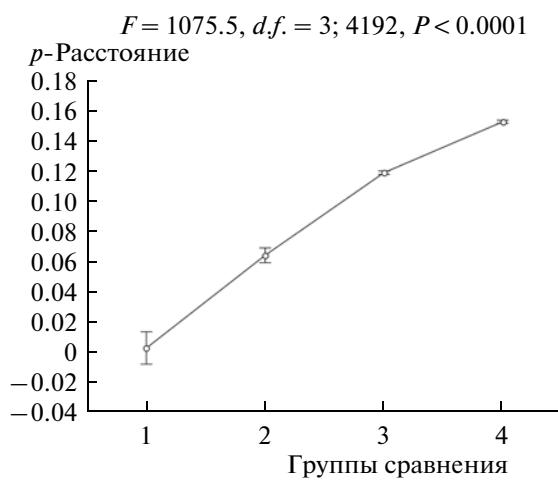


Рис. 3. Результаты однофакторного дисперсионного анализа оценок *p*-расстояния для четырех различных уровней иерархии рыб исследованных нуклеотидных последовательностей гена *Co-1*. Средние значения для каждой группы были получены из треугольной матрицы *p*-расстояний (Приложение-Таблица).

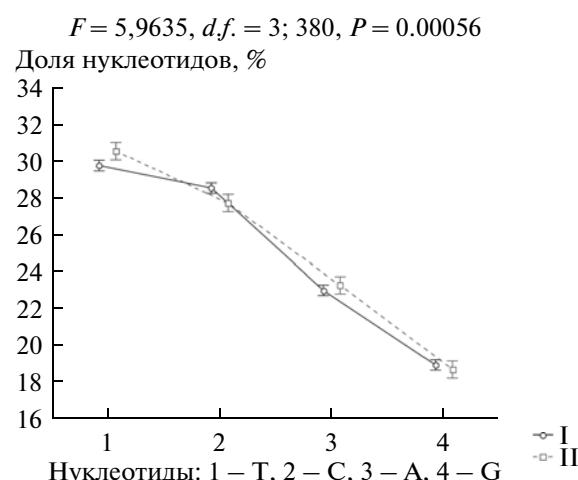


Рис. 4. Результаты двухфакторного дисперсионного анализа по доле нуклеотидов в двух группах сравнения. I группа – последовательности из собственного материала, II – последовательности генного банка.

ставители сем. Zoarcidae и подсемейства *Opisthocephalinae*. При довольно коротких проанализированных последовательностях это может свидетельствовать о том, что данные таксоны в исследуемой группе видов являются наиболее обособленными в эволюционном плане. В подсемействе *Opisthocephalinae* видовые ветви статистически хорошо поддержаны и объединяются в монофилетические роды. Монофилетическое происхождение подсемейства подтверждается с высокой надежностью: 74–99% (см. рис. 2). Сходная топология наблюдалась при сравнении меньшего набора таксонов, включавших лишь роды *Opisthocephalus* и *Pholidapus* и представленных несколько иными по длине последовательностями [7]. Тем не менее на основе изученного фрагмента гена *Co-1* неопределенным в топологии подсемейства остается положение монотипичного рода *Plectobranchus*.

Средние генетические расстояния между родами подсемейства варьируют от 7% (между *Ascoldia* и *Pholidapus*) до 11% (между *Kasatka* и *Opisthocephalus*), тогда как генетические отличия рода *Plectobranchus* от остальных родов подсемейства достигают 15–17%. Это значение даже выше среднего *p*-расстояния внутри подсемейства (12%). Следует отметить, что Гилберт, описавший вид *P. evides*, отмечал его сходство с представителями подсемейства *Lumpeninae* [28]; тихоокеанский подвид пятнистого лептоклина *L. maculatus diaphanocarus* был описан в [29] как вид рода *Plectobranchus*, а Джордан и Эверманн выделяли этот вид в отдельное монотипичное подсемейство [30]. Также возможно, что обособление этого вида от всех остальных представителей подсемейства вызвано отсутствием в нашем исследовании данных для видов рода *Lumpenopsis*, близкого к *Plectobranchus*, который, по мнению Макушка, “сочетает в себе особенности *Lumpeninae* и *Opisthocephalinae*, объединяя их в одно систематическое целое” [15]. Для решения этих вопросов необходимы более репрезентативная выборка, с включением в анализ видов рода *Lumpenopsis*, и безусловно наращивание информационной емкости за счет использования полной последовательности гена *Co-1* (примерно 1500 пн) и включения в анализ других генов.

На основании полученных нами данных можно говорить о том, что род *Pholidapus* выделяется вместе с *Ascoldia* в отдельную хорошо поддержанную ветвь, и этот факт не согласуется с мнением о его статусе как подрода в роде *Opisthocephalus* [31].

Подсемейство *Chirolophinae* также имеет высокую статистическую поддержку. Все три вида, входящие в него, образуют монофилетическую ветвь и принадлежат одному роду (см. рис. 2), что отражает естественное положение этой группы в системе [10]. Однако необходимо отметить весь-

ма низкое значение *p*-расстояния между последовательностями особей *Chirolophis nugator* и *Ch. decoloratus*, равное 0.01. Такая величина расстояния является характерной для внутривидового уровня в пределах исследуемой группы (см. Приложение-Таблицу). Это обстоятельство позволяет сделать вывод о принадлежности данных последовательностей, взятых из GenBank, к одному виду. Данный факт, в свою очередь, дает основания полагать, что при сборе материала видовая идентификация одной из особей была выполнена авторами последовательностей неверно.

Последовательности представителей сем. Zoarcidae не группируются на генных деревьях *Co-1* в соответствии с естественной системой [32], согласно которой самым примитивным в подсемействе *Lycodinae* считается род *Lycodes*. Но выборка видов из подсемейства в нашем случае ограничена, поэтому делать обоснованные выводы о родственных взаимоотношениях внутри этой группы не представляется возможным. Генетические расстояния между родами сем. Zoarcidae варьируют незначительно: от 7% (между *Bothrocara* и *Lycodes*) до 8% (между *Bothrocara* и *Lycenchelys*). Таксономические отношения родов *Bothrocara* и *Lycodes* были рассмотрены в работе Радченко с соавт. [33], но особенности выборки (используются другие виды) не позволяют нам сравнить эти данные с нашими результатами.

Топология полученных генных деревьев не соответствует также общепринятым взглядам на систему Stichaeidae. Подсемейства *Lumpeninae*, *Stichaeinae* и *Xiphisterinae* образуют несколько неразрешенных ветвей, соответственно, с неясным ветвлением. Высокую поддержку показывают только внутривидовые группировки этих таксонов. Принимая во внимание вышеизложенное, можно заключить, что либо разработка системы сем. Stichaeidae еще далека от завершения, либо полученный филогенетический сигнал по изученному фрагменту *Co-1* недостаточен для адекватных выводов. Интересно, что последовательность особи *L. sagitta* из Японского моря не формирует тесный кластер с экземплярами из Берингова моря. Генетические расстояния между последовательностями этих особей равны 0.05, что несколько выше обычных внутривидовых величин (0.01). Выборки взяты из крайних границ ареала обитания вида, что может указывать на большие межпопуляционные различия по гену *Co-1* у *L. sagitta*.

Сем. Bathymasteridae представляет собой две далеко отстоящие друг от друга группы (см. рис. 2). По мнению Андерсона [32], это семейство в подотряде Zoarcoidei является наиболее примитивным, что также подтверждается молекулярными данными [14]. Судя по всему, таксономические отношения в данном семействе можно рассматри-

ривать только с привлечением более консервативных генов, что и планируется сделать в последующей работе.

Особи сем. Ammodytidae и семейство Lophidae, хотя и находятся в политомии по отношению к *Dasycoctus setiger*, но выделяются в отдельную, отдаленную от остальных таксонов группу, что вполне подтверждает естественное положение этих групп в традиционной систематике [8] и указывает на правильность выбора внешней группы.

Значения *p*-расстояний, увеличивающиеся с возрастанием таксономического уровня (рис. 3), позволяют предполагать преобладание географической модели видеообразования, и филетической эволюции в целом, в исследованных таксонах бельдюговидных рыб, как и в других группах [3, 6]. Однако точный выбор модели видеообразования не может базироваться только на данных об относительных генетических расстояниях; необходим анализ нескольких параметров или дескрипторов [1, 5]. Поэтому сделанное выше заключение носит предположительный характер. Весьма низкие значения *p*-расстояний в пределах одного вида говорят о высокой степени гомологии последовательностей. Это является показателем точности определения видовой принадлежности исследуемых организмов и, как отмечено выше, широко используется в программе ДНК-штрихкодирования видов [20].

Отклонение соотношения состава нуклеотидов от равномерного 1 : 1 : 1 : 1 в проанализированных последовательностях с преобладанием пиридиновых оснований (рис. 4) можно интерпретировать как отражение гидрофобных свойств белок-кодирующих генов [34], каковым является и *Co-I*. Однако могут обнаруживаться и таксономические различия в составе нуклеотидов, подтверждая особенности эволюции различных филетических линий [6].

Авторы выражают глубокую признательность С.Н. Шариной (ИБМ) за всестороннюю помошь в работе и ценные замечания, А.А. Баланову за предоставленный материал по некоторым редким видам стихеевых рыб из Японского моря и за комментарии по тексту статьи, а также И.И. Глебову за сбор материала в Беринговом море.

Финансовая поддержка исследований осуществлялась за счет гранта Программы Президиума РАН “Биологическое разнообразие” (подпрограмма “Генофонды и генетическое разнообразие”), проекта ДВО 09-П23-07, а также грантов РФФИ 07-04-00186-а, 08-04-91200-яф.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Картавцев Ю.Ф., Ли Ж.-С. Анализ нуклеотидного разнообразия по генам цитохрома b и цитохромоксидазы I на популяционном, видовом и родовом уровнях // Генетика. 2006. Т. 42, № 4. С. 437–461.
2. Johns G.C., Avise J.C. A comparative summary of genetic distances in the vertebrates from the mitochondrial cytochrome b gene // Mol. Biol. Evol. 1998. V. 15. P. 1481–1490.
3. Avise J.C. Phylogeography. The history and formation of species. Cambridge: Harvard Univ. Press, 2001. 447 p.
4. Ward R.D., Zemlak T.S., Innes B.H. et al. DNA barcoding Australia fish species // Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. 2005. V. 360. P. 1847–1857.
5. Картавцев Ю.Ф. Молекулярная эволюция и популяционная генетика. Владивосток: Изд-во Дальневост. ун-та, 2005. 234 с.
6. 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 // Mar. Biol. 2007. V. 152. P. 757–773.
7. Kartavtsev Y.P., Sharina S.N., Goto T. et al. Molecular phylogenetics of pricklybacks and other percoid fishes from the Sea of Japan // Aquatic Biology. 2009. V. 8. P. 95–103.
8. Nelson J.S. Fishes of the World. Forth edition. N.Y.: John Wiley and Sons, Inc., 2006. 601 p.
9. Майр Э. Принципы зоологической систематики. М.: Мир, 1971. 454 с.
10. Mecklenburg C.W., Sheiko B.A. Family Stichaeidae Gill, 1864 pricklybacks. Annotation Checklist of Fishes. California Acad. Sci., 2004. № 35.
11. Kimura S., Sato A. Descriptions of two new pricklybacks (Perciformes: Stichaeidae) from Japan // Bull. Natl. Mus. Sci. 2007. Ser. A, Suppl. 1. P. 67–79.
12. Shinohara G., Yabe M. A new genus and species of pricklyback (Perciformes: Stichaeidae) from Japan // Ichthyol. Res. 2009. V. 56. № 4. P. 394–399.
13. Stepien C.A., Dillon A.K., Brooks M.J. et al. The evolution of blennioid fishes based on an analysis of mitochondrial 12S rDNA // Molecular Systematics of Fishes. San Diego, CA: Acad. Press, 1997. P. 245–270.
14. Радченко О.А., Черешнев И.А., Петровская А.В., Баланов А.А. Молекулярная систематика и филогения бельдюговидных рыб подотряда Zoarcoidei // Вестник ДВО РАН. 2009. № 3. С. 40–47.
15. Макушок В.М. Морфологические основы системы стихеевых и близких к ним семейств рыб (Stichaeidae, Blennioidei, Pisces) // Тр. Зоол. Ин-та АН СССР. 1958. Т. 25. С. 3–129.
16. GenBank, NCBI. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
17. Линдберг Г.У., Красюкова З.В. Рыбы Японского моря и сопредельных частей Охотского и Желтого морей. Л.: Наука, 1975. Ч. 4. 479 с.
18. Shiogaki M. A review of the genera *Pholidapus* and *Opisthocentrus* (Stichaeidae) // Jap. J. Ichthyology. 1984. V. 31. № 3. P. 213–224.
19. Froese R., Pauly D. (Eds). FishBase. World Wide Web electronic publ. www.fishbase.org, version (02/2011).
20. Ratnasingham S., Hebert P.D.N. BOLD: the barcode of life data system (www.barcodinglife.org) // Molecular Ecology Notes. 2007. V. 7. № 3. P. 355 – 364.d

21. *Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж.* Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование: Пер. с англ. М.: Мир, 1984. 480 с.
22. *ChromasPro*. <http://www.technelysium.com.au/chromas.html/>
23. *Posada D., Grandal K.A.* MODELTEST: testing the model DNA substitution // Bioinformatics. 1998. V. 14. P. 817–818.
24. *Swofford D.L.* PAUP*. Phylogenetic analysis using parsimony (*and other Methods). Version 4. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts, 2002. 144 p.
25. *Hulsenbeck J.P., Ronquist F. Mr.* BAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees // Bioinformatics. 2001. V. 17. № 8. P. 754 – 755.
26. *Tamura K., Peterson D., Peterson N. et al.* MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods // Molecular Biology and Evolution. 2011. V. 28(10). P. 2731–2739.
27. StatSoft, Inc. STATISTICA (data analysis software system), version 6. www.statsoft.com. 2001.
28. *Gilbert Ch. H., Thompson J.C.* Notes on the fishes of Puget Sound // Proc. U.S. Nat. Mus. 1905. V. XXVIII. P. 973–987.
29. *Шмидт П.Ю.* Рыбы восточных морей Российской Империи. СПб.: Имп. Рус. геогр. об-во, 1904. 466 с.
30. *Jordan D.S., Evermann B.W.* The fishes of North and Middle America // Bull. U.S. Nat. Mus. 1898. № 47. part. III. P. 2183–3136.
31. *Рутенко О. А., Иванков В. Н.* Морфологический анализ и таксономический статус четырех видов рыб родов *Opisthocentrus* и *Pholidapus* (Perciformes: Stichaeidae) // Биология моря. 2009. Т. 35. № 5. С. 329–336.
32. *Anderson M.E.* Systematics and osteology of the Zoarcidae (Teleostei: Perciformes) // Ichthyol. Bull. J.L.B. Smith. / Inst. Ichthyology. 1994. № 60. 120 p.
33. *Радченко О.А., Черешнев И.А., Петровская А.В.* Родственные отношения и дивергенция некоторых таксонов подсемейства Lycodinae (Zoarcidae, Pisces) по молекулярно-генетическим и морфологическим данным // Вопр. ихтиологии. 2009. Т. 49. № 5. С. 603–616.
34. *Naylor G.J., Collins T.M., Brown W.M.* Hydrophobicity and phylogeny // Nature. 1995. V. 373. P. 565–566.

ПРИЛОЖЕНИЕ-ТАБЛИЦА

Матрица попарных *p*-расстояний для 95 сравниваемых нуклеотидных последовательностей гена *Co-I*. Обозначение последовательностей 1, 2 и т.д. приведено в табл. 1

№	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32
1																																
2	.15																															
3	.09	.16																														
4	.09	.17	.01																													
5	.09	.17	.01	.00																												
6	.09	.17	.01	.00	.00																											
7	.09	.16	.00	.01	.01	.01																										
8	.12	.17	.05	.05	.05	.05	.05																									
9	.12	.16	.05	.05	.05	.05	.05	.05																								
10	.12	.16	.05	.05	.05	.05	.05	.05	.05																							
11	.12	.17	.05	.05	.05	.05	.05	.05	.05	.05																						
12	.11	.17	.02	.02	.02	.02	.02	.02	.02	.02	.02																					
13	.11	.17	.03	.03	.03	.03	.03	.03	.03	.03	.03	.03																				
14	.10	.16	.08	.08	.08	.08	.08	.08	.08	.08	.08	.08	.08																			
15	.10	.16	.08	.08	.08	.08	.08	.08	.08	.08	.08	.08	.08	.08																		
16	.10	.16	.08	.08	.08	.08	.08	.08	.08	.08	.08	.08	.08	.08	.08																	
17	.09	.16	.06	.07	.07	.07	.07	.07	.07	.07	.07	.07	.07	.07	.07	.07																
18	.09	.16	.06	.07	.07	.07	.07	.07	.07	.07	.07	.07	.07	.07	.07	.07	.07															
19	.09	.16	.06	.07	.07	.07	.07	.07	.07	.07	.07	.07	.07	.07	.07	.07	.07															
20	.13	.14	.13	.14	.13	.14	.13	.14	.13	.13	.13	.13	.13	.13	.13	.13	.13	.13														
21	.12	.16	.12	.12	.12	.12	.12	.12	.12	.12	.12	.12	.12	.12	.12	.12	.12	.12	.12													
22	.12	.16	.12	.12	.12	.12	.12	.12	.12	.12	.12	.12	.12	.12	.12	.12	.12	.12	.12	.12												
23	.13	.16	.12	.12	.12	.12	.12	.12	.12	.12	.12	.12	.12	.12	.12	.12	.12	.12	.12	.12	.12											
24	.12	.16	.12	.12	.12	.12	.12	.12	.12	.12	.12	.12	.12	.12	.12	.12	.12	.12	.12	.12	.12	.12										
25	.11	.14	.13	.13	.13	.13	.13	.13	.13	.13	.13	.13	.13	.13	.13	.13	.13	.13	.13	.13	.13	.13	.13									
26	.13	.16	.13	.14	.13	.13	.13	.13	.13	.13	.13	.13	.13	.13	.13	.13	.13	.13	.13	.13	.13	.13	.13	.13								
27	.14	.17	.14	.14	.14	.14	.14	.14	.14	.14	.14	.14	.14	.14	.14	.14	.14	.14	.14	.14	.14	.14	.14	.14								
28	.13	.17	.13	.13	.13	.13	.13	.13	.13	.13	.13	.13	.13	.13	.13	.13	.13	.13	.13	.13	.13	.13	.13	.13								
29	.13	.16	.13	.14	.13	.13	.13	.13	.13	.13	.13	.13	.13	.13	.13	.13	.13	.13	.13	.13	.13	.13	.13	.13								
30	.13	.17	.13	.13	.13	.13	.13	.13	.13	.13	.13	.13	.13	.13	.13	.13	.13	.13	.13	.13	.13	.13	.13	.13								
31	.13	.17	.13	.13	.13	.13	.13	.13	.13	.13	.13	.13	.13	.13	.13	.13	.13	.13	.13	.13	.13	.13	.13	.13								
32	.13	.14	.13	.13	.13	.13	.13	.13	.13	.13	.13	.13	.13	.13	.13	.13	.13	.13	.13	.13	.13	.13	.13	.13								
33	.10	.15	.12	.12	.12	.12	.12	.12	.12	.12	.12	.12	.12	.12	.12	.12	.12	.12	.12	.12	.12	.12	.12	.12								

ПРИЛОЖЕНИЕ-ТАБЛИЦА. Продолжение

№	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33
34	.12	.14	.12	.12	.12	.12	.12	.12	.12	.12	.12	.12	.13	.13	.12	.12	.12	.12	.11	.11	.11	.11	.11	.13	.12	.13	.12	.12	.13	.12	.09	.09	
35	.13	.14	.12	.12	.12	.12	.12	.12	.12	.12	.12	.12	.13	.13	.12	.12	.12	.12	.11	.11	.11	.11	.11	.12	.12	.12	.12	.12	.12	.08	.08		
36	.12	.13	.13	.13	.13	.13	.13	.12	.12	.12	.12	.12	.13	.13	.12	.13	.13	.13	.13	.13	.13	.13	.13	.12	.11	.12	.11	.11	.11	.09	.10		
37	.12	.13	.13	.13	.13	.13	.13	.13	.12	.13	.13	.13	.13	.13	.12	.13	.13	.13	.13	.13	.13	.13	.13	.12	.11	.11	.11	.11	.11	.10	.10		
38	.12	.13	.13	.13	.13	.13	.13	.12	.12	.12	.12	.12	.13	.13	.12	.13	.13	.13	.13	.13	.13	.13	.13	.12	.11	.11	.11	.11	.11	.09	.10		
39	.12	.13	.13	.13	.13	.13	.13	.12	.12	.12	.12	.12	.13	.13	.12	.13	.13	.13	.13	.13	.13	.13	.13	.12	.11	.11	.11	.11	.11	.09	.10		
40	.12	.13	.13	.13	.13	.13	.13	.12	.12	.12	.12	.12	.13	.13	.12	.12	.13	.13	.11	.13	.13	.13	.13	.12	.11	.11	.11	.11	.11	.09	.10		
41	.12	.16	.14	.14	.14	.14	.13	.13	.13	.14	.14	.14	.14	.14	.14	.14	.13	.13	.13	.12	.12	.12	.12	.11	.11	.11	.11	.11	.11	.08	.05		
42	.12	.15	.13	.13	.13	.13	.13	.13	.13	.13	.13	.13	.13	.13	.13	.13	.12	.12	.13	.11	.11	.11	.11	.11	.12	.11	.11	.11	.11	.07	.05		
43	.12	.15	.13	.13	.13	.13	.13	.13	.13	.13	.13	.13	.13	.13	.13	.14	.13	.13	.12	.12	.13	.10	.11	.11	.11	.11	.11	.11	.11	.11	.07	.05	
44	.11	.13	.12	.11	.12	.11	.12	.13	.12	.12	.12	.12	.12	.13	.13	.12	.12	.12	.12	.12	.12	.12	.10	.11	.12	.12	.12	.12	.12	.12	.08	.09	
45	.11	.13	.12	.11	.12	.11	.12	.13	.12	.12	.12	.12	.12	.13	.13	.12	.12	.12	.12	.12	.12	.12	.10	.11	.12	.12	.12	.12	.12	.12	.08	.09	
46	.12	.13	.12	.12	.12	.12	.12	.12	.12	.12	.12	.12	.13	.13	.12	.12	.11	.11	.12	.13	.12	.12	.10	.12	.13	.12	.12	.12	.12	.12	.08	.09	
47	.12	.14	.12	.12	.12	.12	.12	.12	.13	.13	.13	.13	.14	.13	.14	.13	.13	.13	.13	.12	.12	.12	.12	.11	.12	.13	.12	.13	.13	.09	.10		
48	.12	.14	.12	.12	.12	.12	.12	.12	.13	.13	.13	.13	.14	.13	.14	.13	.13	.13	.13	.12	.12	.12	.12	.11	.12	.13	.12	.13	.13	.09	.10		
49	.12	.14	.12	.12	.12	.12	.12	.12	.13	.13	.13	.13	.14	.13	.13	.13	.13	.13	.13	.12	.12	.12	.12	.11	.12	.13	.12	.13	.13	.09	.10		
50	.14	.17	.16	.15	.15	.15	.16	.15	.14	.14	.14	.14	.13	.14	.13	.14	.13	.13	.13	.13	.13	.13	.13	.13	.13	.13	.13	.13	.13	.13	.12	.13	
51	.14	.17	.16	.15	.15	.15	.15	.16	.15	.14	.14	.14	.16	.16	.16	.16	.15	.15	.14	.13	.13	.13	.13	.13	.13	.13	.13	.13	.13	.13	.12	.13	
52	.09	.16	.00	.01	.01	.00	.05	.05	.05	.05	.05	.05	.03	.03	.08	.08	.06	.06	.06	.07	.13	.12	.12	.12	.13	.13	.14	.13	.13	.13	.13	.12	
53	.13	.16	.15	.14	.14	.14	.15	.15	.15	.14	.14	.14	.16	.16	.16	.16	.15	.15	.14	.13	.13	.13	.13	.13	.13	.12	.13	.13	.13	.13	.12	.13	
54	.14	.16	.13	.13	.13	.13	.13	.13	.13	.13	.13	.14	.14	.14	.14	.14	.13	.13	.13	.13	.12	.12	.12	.12	.12	.12	.12	.12	.12	.12	.12	.13	
55	.14	.16	.14	.14	.14	.14	.14	.14	.15	.15	.15	.14	.14	.15	.15	.15	.14	.14	.14	.13	.13	.13	.13	.13	.13	.14	.15	.14	.14	.14	.14	.13	
56	.14	.16	.15	.14	.14	.14	.15	.15	.15	.14	.14	.15	.15	.15	.15	.16	.16	.16	.16	.13	.14	.14	.14	.13	.15	.16	.15	.16	.15	.15	.15	.13	
57	.13	.14	.13	.13	.13	.13	.13	.12	.12	.12	.13	.13	.13	.13	.13	.13	.14	.14	.14	.12	.12	.12	.12	.11	.12	.13	.12	.12	.12	.12	.12	.12	
58	.14	.15	.13	.13	.13	.13	.13	.12	.12	.12	.12	.13	.13	.13	.13	.13	.14	.14	.14	.14	.12	.12	.12	.12	.11	.12	.13	.12	.12	.12	.12	.13	
59	.13	.14	.13	.13	.13	.13	.12	.12	.12	.13	.13	.13	.13	.13	.13	.14	.14	.14	.14	.12	.12	.12	.11	.12	.13	.12	.12	.12	.12	.12	.12	.12	
60	.14	.15	.12	.12	.12	.12	.13	.13	.13	.13	.13	.13	.13	.13	.13	.13	.14	.14	.14	.11	.13	.12	.12	.10	.13	.13	.13	.13	.13	.12	.12	.12	
61	.14	.15	.12	.12	.12	.12	.12	.13	.13	.13	.13	.13	.13	.13	.13	.13	.12	.13	.14	.14	.11	.13	.12	.12	.10	.13	.13	.13	.13	.13	.12	.12	
62	.14	.15	.12	.12	.12	.12	.12	.13	.13	.13	.13	.13	.13	.13	.13	.13	.14	.14	.14	.11	.13	.12	.12	.10	.13	.13	.13	.13	.13	.12	.12	.12	
63	.12	.14	.12	.12	.12	.12	.12	.12	.12	.12	.12	.12	.13	.13	.14	.13	.13	.13	.14	.12	.13	.12	.11	.11	.11	.11	.11	.11	.11	.11	.10	.10	
64	.12	.14	.12	.12	.12	.12	.12	.12	.12	.12	.12	.12	.12	.12	.12	.12	.13	.13	.13	.10	.10	.10	.10	.11	.11	.11	.11	.11	.11	.11	.10	.10	
65	.12	.14	.12	.12	.12	.12	.12	.12	.12	.12	.12	.12	.13	.13	.13	.13	.13	.13	.14	.14	.11	.13	.12	.12	.10	.11	.11	.11	.11	.11	.11	.10	.10
66	.12	.14	.12	.12	.12	.12	.12	.12	.12	.11	.11	.11	.13	.12	.13	.13	.13	.13	.14	.14	.12	.12	.12	.11	.11	.11	.11	.11	.11	.11	.10	.10	
67	.12	.14	.12	.12	.12	.12	.12	.12	.12	.11	.11	.11	.13	.12	.13	.13	.13	.13	.14	.14	.11	.13	.12	.12	.10	.11	.11	.11	.11	.11	.11	.10	.10

ПРИЛОЖЕНИЕ-ТАБЛИЦА. Продолжение

№	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33
68	.13	.15	.13	.13	.13	.13	.13	.13	.13	.13	.13	.13	.13	.14	.14	.14	.14	.13	.13	.11	.13	.12	.12	.12	.13	.14	.13	.13	.14	.13	.13	.13	
69	.13	.15	.13	.13	.13	.13	.13	.13	.13	.13	.13	.13	.13	.14	.14	.14	.14	.13	.13	.11	.13	.12	.13	.12	.13	.14	.13	.13	.13	.13	.13	.13	
70	.13	.15	.13	.13	.13	.13	.13	.13	.13	.13	.13	.13	.13	.14	.14	.14	.13	.13	.13	.11	.13	.12	.13	.12	.13	.14	.13	.13	.13	.13	.13	.13	
71	.13	.15	.13	.13	.13	.13	.13	.13	.13	.13	.13	.13	.13	.14	.14	.14	.14	.13	.13	.13	.11	.13	.12	.13	.12	.13	.14	.13	.13	.13	.13	.13	.13
72	.13	.15	.13	.13	.13	.13	.13	.13	.13	.13	.13	.13	.13	.14	.14	.14	.13	.13	.13	.11	.13	.12	.13	.12	.13	.14	.13	.13	.13	.13	.13	.13	
73	.17	.17	.16	.16	.16	.16	.16	.17	.17	.17	.17	.17	.17	.16	.16	.16	.16	.14	.14	.14	.16	.15	.15	.15	.17	.16	.17	.17	.17	.17	.17	.17	.14
74	.17	.17	.15	.15	.15	.15	.15	.15	.15	.15	.16	.16	.16	.15	.15	.14	.14	.14	.13	.14	.14	.14	.14	.14	.15	.17	.17	.17	.17	.17	.17	.14	.13
75	.17	.17	.15	.15	.15	.15	.15	.15	.15	.15	.16	.16	.16	.15	.15	.14	.14	.14	.13	.14	.14	.14	.14	.14	.15	.17	.17	.17	.17	.17	.17	.14	.13
76	.17	.17	.15	.15	.15	.15	.15	.15	.15	.15	.16	.16	.16	.15	.15	.14	.14	.14	.13	.14	.14	.14	.14	.14	.15	.17	.17	.17	.17	.17	.17	.14	.13
77	.17	.18	.15	.16	.16	.15	.15	.15	.15	.15	.16	.16	.16	.16	.15	.15	.15	.15	.14	.14	.14	.14	.14	.14	.15	.16	.15	.15	.15	.15	.15	.12	
78	.17	.18	.15	.16	.16	.15	.15	.15	.15	.15	.16	.16	.16	.16	.15	.15	.15	.15	.14	.14	.14	.14	.14	.14	.15	.16	.15	.15	.15	.15	.15	.12	
79	.17	.17	.16	.16	.16	.15	.15	.15	.15	.15	.17	.17	.16	.15	.15	.15	.15	.14	.14	.14	.13	.14	.14	.14	.14	.15	.16	.16	.17	.16	.17	.16	.13
80	.17	.17	.15	.16	.16	.15	.15	.15	.15	.15	.16	.16	.16	.15	.15	.15	.15	.14	.14	.13	.14	.14	.13	.14	.15	.16	.16	.17	.16	.17	.16	.14	
81	.17	.17	.15	.16	.16	.15	.15	.15	.15	.15	.16	.16	.16	.15	.15	.15	.15	.14	.14	.13	.14	.14	.13	.14	.15	.16	.16	.17	.16	.17	.16	.14	
82	.17	.18	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.14	.14	.14	.14	.14	.15	.16	.16	.16	.17	.16	.17	.16	.13
83	.17	.18	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.15	.14	.14	.14	.14	.14	.15	.16	.16	.17	.17	.17	.17	.14	
84	.17	.17	.16	.17	.17	.16	.17	.16	.17	.16	.17	.16	.17	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.15	.15	.16	.16	.17	.16	.16	.17	.16	.16	.17	.16	.14
85	.17	.17	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.14	.15	.15	.15	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.14	
86	.17	.17	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.15	.15	.15	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.14	
87	.17	.17	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.15	.15	.15	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.14	
88	.17	.17	.16	.17	.17	.16	.16	.16	.16	.16	.17	.16	.16	.15	.15	.15	.14	.14	.14	.15	.15	.16	.17	.18	.17	.17	.17	.17	.17	.17	.15	.13	
89	.17	.17	.16	.17	.17	.16	.16	.16	.16	.16	.17	.16	.16	.15	.15	.15	.14	.14	.14	.15	.15	.14	.15	.16	.17	.18	.17	.17	.17	.17	.17	.15	
90	.17	.17	.16	.17	.17	.17	.16	.16	.16	.16	.17	.16	.16	.15	.15	.15	.14	.14	.14	.15	.15	.16	.17	.18	.17	.17	.17	.17	.17	.17	.15	.13	
91	.17	.17	.16	.17	.17	.17	.16	.17	.16	.17	.16	.17	.16	.16	.16	.16	.15	.15	.15	.14	.15	.15	.16	.17	.18	.17	.17	.17	.17	.17	.15	.14	
92	.18	.20	.17	.17	.17	.19	.19	.19	.19	.17	.17	.18	.17	.17	.17	.17	.17	.18	.18	.18	.18	.19	.18	.18	.18	.18	.18	.18	.18	.18	.18	.16	
93	.18	.20	.17	.17	.17	.17	.19	.19	.19	.19	.17	.17	.18	.17	.17	.17	.17	.18	.18	.18	.18	.19	.18	.19	.18	.18	.18	.18	.18	.18	.18	.16	
94	.18	.20	.17	.17	.17	.17	.19	.19	.19	.19	.17	.17	.18	.17	.17	.17	.17	.18	.18	.18	.18	.19	.18	.19	.18	.18	.18	.18	.18	.18	.18	.16	
95	.23	.22	.23	.23	.23	.23	.23	.23	.23	.22	.22	.23	.23	.23	.23	.23	.23	.23	.23	.23	.23	.23	.23	.23	.23	.23	.23	.23	.23	.23	.22	.22	

ПРИЛОЖЕНИЕ-ТАБЛИЦА. Продолжение

№	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66
35	.01																																
36	.08	.07																															
37	.08	.08	.00																														
38	.08	.07	.00																														
39	.08	.07	.00																														
40	.08	.07	.00																														
41	.09	.08	.10	.10	.10	.10	.10																										
42	.08	.08	.09	.09	.09	.09	.09	.09	.09	.09	.09	.09	.09	.09	.09	.09	.09	.09	.09	.09	.09	.09	.09	.09	.09	.09	.09	.09	.09	.09			
43	.08	.08	.09	.09	.09	.09	.09	.09	.09	.09	.09	.09	.09	.09	.09	.09	.09	.09	.09	.09	.09	.09	.09	.09	.09	.09	.09	.09	.09	.09			
44	.08	.07	.08	.08	.08	.08	.08	.08	.08	.08	.08	.08	.08	.08	.08	.08	.08	.08	.08	.08	.08	.08	.08	.08	.08	.08	.08	.08	.08	.08			
45	.08	.07	.08	.08	.08	.08	.08	.08	.08	.08	.08	.08	.08	.08	.08	.08	.08	.08	.08	.08	.08	.08	.08	.08	.08	.08	.08	.08	.08	.08			
46	.08	.08	.08	.08	.08	.08	.08	.08	.08	.08	.08	.08	.08	.08	.08	.08	.08	.08	.08	.08	.08	.08	.08	.08	.08	.08	.08	.08	.08	.08			
47	.09	.09	.09	.09	.09	.09	.09	.09	.09	.09	.09	.09	.09	.09	.09	.09	.09	.09	.09	.09	.09	.09	.09	.09	.09	.09	.09	.09	.09	.09			
48	.09	.09	.09	.09	.09	.09	.09	.09	.09	.09	.09	.09	.09	.09	.09	.09	.09	.09	.09	.09	.09	.09	.09	.09	.09	.09	.09	.09	.09	.09			
49	.09	.09	.09	.09	.09	.09	.09	.09	.09	.09	.09	.09	.09	.09	.09	.09	.09	.09	.09	.09	.09	.09	.09	.09	.09	.09	.09	.09	.09	.09			
50	.13	.13	.13	.13	.13	.13	.13	.13	.13	.13	.13	.12	.12	.12	.12	.12	.12	.12	.12	.12	.12	.12	.12	.12	.12	.12	.12	.12	.12	.12			
51	.13	.13	.13	.13	.13	.13	.13	.13	.13	.13	.13	.12	.12	.12	.12	.12	.12	.12	.12	.12	.12	.12	.12	.12	.12	.12	.12	.12	.12	.12			
52	.12	.12	.13	.13	.13	.13	.13	.13	.13	.13	.13	.13	.13	.13	.13	.13	.12	.12	.12	.12	.12	.12	.12	.12	.12	.12	.12	.12	.12	.12			
53	.14	.14	.14	.14	.14	.14	.14	.14	.14	.14	.14	.13	.13	.13	.13	.12	.12	.12	.12	.12	.12	.12	.12	.12	.12	.12	.12	.12	.12	.12			
54	.13	.12	.12	.12	.12	.12	.12	.12	.12	.12	.12	.12	.12	.12	.12	.12	.12	.12	.12	.12	.12	.12	.12	.12	.12	.12	.12	.12	.12	.12			
55	.15	.15	.15	.15	.15	.15	.15	.15	.15	.15	.15	.15	.15	.15	.15	.14	.14	.14	.14	.14	.14	.14	.14	.14	.14	.14	.14	.14	.14	.14			
56	.15	.15	.15	.15	.15	.15	.15	.15	.15	.15	.15	.14	.14	.14	.14	.14	.13	.13	.13	.13	.13	.13	.13	.13	.13	.13	.13	.13	.13	.13			
57	.13	.11	.11	.11	.11	.11	.11	.11	.11	.11	.11	.12	.12	.12	.12	.12	.13	.13	.13	.13	.13	.13	.13	.13	.13	.13	.13	.13	.13	.13			
58	.13	.12	.12	.12	.12	.12	.12	.12	.12	.12	.12	.13	.12	.12	.12	.12	.13	.13	.13	.13	.13	.13	.13	.13	.13	.13	.13	.13	.13	.13			
59	.13	.11	.11	.11	.11	.11	.11	.11	.12	.12	.12	.12	.12	.12	.12	.12	.13	.13	.13	.13	.13	.13	.13	.13	.13	.13	.13	.13	.13	.13			
60	.11	.12	.12	.12	.12	.12	.12	.12	.11	.11	.11	.12	.12	.12	.12	.11	.11	.11	.12	.12	.12	.12	.12	.12	.12	.12	.12	.12	.12	.12			
61	.11	.12	.12	.12	.12	.12	.12	.12	.11	.11	.11	.12	.12	.12	.12	.11	.11	.11	.12	.12	.12	.12	.12	.12	.12	.12	.12	.12	.12	.12			
62	.11	.12	.12	.12	.12	.12	.12	.12	.11	.11	.11	.12	.12	.12	.12	.11	.11	.11	.12	.12	.12	.12	.12	.12	.12	.12	.12	.12	.12	.12			
63	.11	.11	.13	.13	.13	.13	.13	.13	.12	.12	.12	.10	.10	.10	.10	.10	.10	.10	.10	.10	.10	.10	.10	.10	.10	.10	.10	.10	.10	.10			
64	.11	.11	.13	.13	.13	.13	.13	.13	.12	.12	.12	.12	.10	.10	.10	.10	.10	.10	.10	.10	.10	.10	.10	.10	.10	.10	.10	.10	.10	.10			
65	.11	.11	.13	.13	.13	.13	.13	.13	.12	.11	.11	.11	.10	.10	.10	.10	.10	.10	.10	.10	.10	.10	.10	.10	.10	.10	.10	.10	.10	.10			
66	.11	.11	.13	.13	.13	.13	.13	.13	.12	.11	.11	.11	.10	.10	.10	.10	.10	.10	.10	.10	.10	.10	.10	.10	.10	.10	.10	.10	.10	.10			
67	.11	.11	.13	.13	.13	.13	.13	.13	.12	.11	.11	.10	.10	.10	.10	.10	.10	.10	.10	.10	.10	.10	.10	.10	.10	.10	.10	.10	.10	.10			

ПРИЛОЖЕНИЕ-ТАБЛИЦА. Продолжение

№	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67
68	.13	.13	.13	.13	.13	.13	.13	.14	.13	.13	.12	.12	.12	.13	.13	.14	.13	.13	.14	.13	.14	.13	.13	.12	.12	.12	.12	.13	.13	.13	.12	.12		
69	.13	.13	.13	.13	.13	.13	.13	.14	.13	.13	.12	.12	.12	.13	.13	.14	.13	.13	.14	.13	.14	.13	.13	.12	.12	.12	.12	.13	.13	.13	.12	.12		
70	.13	.13	.13	.13	.13	.13	.13	.14	.13	.13	.12	.12	.12	.13	.13	.14	.13	.13	.14	.13	.14	.13	.13	.12	.12	.12	.12	.12	.12	.13	.13	.12	.12	
71	.13	.13	.13	.13	.13	.13	.13	.14	.13	.13	.12	.12	.12	.13	.13	.14	.13	.13	.14	.13	.14	.13	.13	.12	.12	.12	.12	.12	.12	.13	.13	.12	.12	
72	.13	.13	.13	.13	.13	.13	.13	.14	.13	.13	.12	.12	.12	.13	.13	.14	.13	.13	.14	.13	.14	.13	.13	.12	.12	.12	.12	.12	.12	.13	.13	.12	.12	
73	.15	.15	.16	.16	.16	.16	.16	.13	.13	.15	.15	.15	.15	.15	.15	.14	.17	.17	.16	.17	.15	.17	.17	.14	.15	.15	.15	.15	.15	.15	.15	.15	.15	.15
74	.15	.14	.15	.15	.15	.15	.15	.13	.12	.13	.15	.15	.14	.14	.14	.16	.16	.15	.17	.15	.15	.16	.15	.15	.14	.14	.15	.15	.15	.15	.15	.15	.15	.15
75	.15	.14	.15	.15	.15	.15	.15	.13	.12	.13	.15	.15	.14	.14	.14	.16	.16	.15	.17	.15	.15	.16	.15	.15	.14	.14	.15	.15	.15	.15	.15	.15	.15	.15
76	.15	.14	.15	.15	.15	.15	.15	.13	.12	.13	.15	.15	.14	.14	.14	.16	.16	.15	.17	.15	.15	.16	.15	.15	.14	.14	.15	.15	.15	.15	.15	.15	.15	.15
77	.14	.14	.14	.14	.14	.14	.14	.13	.12	.13	.15	.15	.13	.13	.13	.15	.15	.15	.16	.16	.16	.16	.14	.14	.14	.15	.15	.15	.15	.15	.15	.15	.15	
78	.14	.14	.14	.14	.14	.14	.14	.13	.12	.13	.15	.15	.13	.13	.13	.15	.15	.15	.16	.16	.16	.16	.14	.14	.14	.15	.15	.15	.15	.15	.15	.15	.15	
79	.14	.14	.15	.15	.15	.15	.15	.13	.12	.13	.15	.15	.14	.14	.14	.16	.16	.15	.17	.15	.16	.16	.15	.16	.15	.15	.15	.15	.15	.15	.15	.15	.15	.15
80	.14	.14	.15	.15	.15	.15	.15	.13	.12	.13	.15	.15	.14	.14	.14	.16	.16	.15	.17	.15	.16	.16	.15	.15	.14	.14	.15	.15	.15	.15	.15	.15	.15	.15
81	.14	.14	.15	.15	.15	.15	.15	.13	.12	.13	.15	.15	.14	.14	.14	.16	.16	.15	.17	.15	.16	.16	.15	.15	.14	.14	.15	.15	.15	.15	.15	.15	.15	.15
82	.15	.15	.16	.16	.16	.16	.16	.13	.13	.13	.15	.15	.15	.15	.15	.15	.15	.15	.16	.13	.16	.16	.14	.14	.14	.14	.15	.15	.15	.15	.16	.16	.16	
83	.15	.15	.16	.16	.16	.16	.16	.13	.13	.13	.16	.15	.15	.15	.15	.15	.15	.15	.16	.13	.16	.16	.14	.14	.14	.14	.15	.15	.15	.15	.15	.16	.16	
84	.15	.15	.15	.15	.15	.15	.15	.14	.13	.14	.15	.15	.14	.14	.14	.16	.16	.15	.17	.16	.17	.15	.16	.15	.15	.15	.15	.15	.15	.15	.15	.15	.15	
85	.15	.15	.15	.15	.15	.15	.15	.14	.13	.14	.14	.14	.14	.14	.14	.17	.17	.16	.17	.15	.16	.16	.15	.15	.15	.15	.15	.15	.15	.15	.15	.15	.15	
86	.15	.15	.15	.15	.15	.15	.15	.14	.13	.14	.14	.14	.14	.14	.14	.17	.17	.16	.17	.15	.16	.16	.15	.15	.15	.15	.15	.15	.15	.15	.15	.15	.15	
87	.15	.15	.15	.15	.15	.15	.15	.14	.13	.14	.14	.14	.14	.14	.14	.17	.17	.16	.17	.15	.16	.16	.15	.15	.15	.15	.15	.15	.15	.15	.15	.15	.15	
88	.15	.15	.16	.16	.16	.16	.16	.13	.13	.13	.16	.15	.16	.15	.16	.18	.18	.16	.17	.15	.17	.17	.15	.15	.15	.15	.15	.15	.15	.15	.15	.16	.16	
89	.15	.15	.16	.15	.16	.16	.16	.13	.13	.13	.16	.15	.16	.15	.16	.18	.18	.16	.17	.15	.17	.17	.15	.15	.15	.15	.15	.15	.15	.15	.15	.15	.16	
90	.15	.15	.16	.15	.16	.16	.16	.13	.13	.13	.16	.15	.16	.15	.16	.18	.18	.16	.17	.15	.17	.17	.15	.15	.15	.15	.15	.15	.15	.15	.15	.16	.16	
91	.15	.15	.16	.16	.16	.16	.16	.13	.13	.13	.16	.16	.16	.16	.16	.18	.18	.16	.18	.15	.17	.17	.15	.15	.15	.15	.15	.15	.15	.15	.16	.16		
92	.18	.17	.18	.17	.17	.18	.18	.18	.18	.18	.17	.20	.20	.18	.18	.17	.19	.20	.20	.19	.19	.19	.19	.19	.19	.19	.19	.19	.19	.19	.19	.17	.17	.17
93	.18	.17	.18	.17	.17	.18	.18	.18	.18	.18	.17	.20	.20	.18	.18	.17	.19	.20	.21	.20	.19	.19	.19	.19	.19	.19	.19	.19	.18	.18	.18	.18	.18	
94	.18	.17	.17	.18	.17	.17	.18	.18	.18	.18	.17	.20	.20	.18	.18	.17	.19	.20	.20	.19	.19	.19	.19	.19	.19	.19	.19	.19	.19	.17	.17	.17	.17	
95	.21	.21	.21	.21	.21	.22	.22	.22	.23	.23	.22	.22	.22	.23	.23	.22	.22	.21	.21	.20	.22	.22	.21	.21	.21	.21	.21	.21	.20	.20	.20	.20	.20	

ПРИЛОЖЕНИЕ-ТАБЛИЦА. Окончание

№	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95
69	.00																											
70	.00	.00																										
71	.00	.00	.00																									
72	.00	.00	.00	.00																								
73	.17	.17	.17	.17	.17	.17	.17	.17	.17	.17	.17	.17	.17	.17	.17	.17	.17	.17	.17	.17	.17	.17	.17	.17	.17	.17	.17	
74	.15	.15	.15	.15	.15	.15	.15	.15	.15	.15	.15	.15	.15	.15	.15	.15	.15	.15	.15	.15	.15	.15	.15	.15	.15	.15	.15	
75	.15	.15	.15	.15	.15	.15	.15	.15	.15	.15	.15	.15	.15	.15	.15	.15	.15	.15	.15	.15	.15	.15	.15	.15	.15	.15	.15	
76	.15	.15	.15	.15	.15	.15	.15	.15	.15	.15	.15	.15	.15	.15	.15	.15	.15	.15	.15	.15	.15	.15	.15	.15	.15	.15	.15	
77	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.16	
78	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.16	
79	.15	.15	.15	.15	.15	.15	.15	.15	.15	.15	.15	.15	.15	.15	.15	.15	.15	.15	.15	.15	.15	.15	.15	.15	.15	.15	.15	
80	.15	.15	.15	.15	.15	.15	.15	.15	.15	.15	.15	.15	.15	.15	.15	.15	.15	.15	.15	.15	.15	.15	.15	.15	.15	.15	.15	
81	.15	.15	.15	.15	.15	.15	.15	.15	.15	.15	.15	.15	.15	.15	.15	.15	.15	.15	.15	.15	.15	.15	.15	.15	.15	.15	.15	
82	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.16	
83	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.16	
84	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.16	
85	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.16	
86	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.16	
87	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.16	
88	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.16	
89	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.16	
90	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.16	
91	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.16	.16	
92	.18	.18	.18	.18	.18	.18	.18	.18	.18	.18	.18	.18	.18	.18	.18	.18	.18	.18	.18	.18	.18	.18	.18	.18	.18	.18	.18	
93	.18	.19	.19	.19	.19	.19	.19	.19	.19	.19	.19	.19	.19	.19	.19	.19	.19	.19	.19	.19	.19	.19	.19	.19	.19	.19	.19	
94	.18	.18	.18	.18	.18	.18	.18	.18	.18	.18	.18	.18	.18	.18	.18	.18	.18	.18	.18	.18	.18	.18	.18	.18	.18	.18	.18	
95	.21	.21	.21	.21	.21	.21	.21	.21	.21	.21	.21	.21	.21	.21	.21	.21	.21	.21	.21	.21	.21	.21	.21	.21	.21	.21	.21	

Molecular Phylogenetic Study of Several Eelpout Fishes (Perciformes, Zoarcoidei) from Far Eastern Seas on the Basis of the Nucleotide Sequence of the Mitochondrial Cytochrome Oxidase 1 Gene (*Co-I*)

S. V. Turanov, Yu. Ph. Kartavtsev, and V. V. Zemnukhov

Zhirmunsky Institute of Marine Biology, Far Eastern Branch, Russian Academy of Sciences, Vladivostok, 690041 Russia

e-mail: yuri.kartavtsev48@hotmail.com

A total of 95 nucleotide sequences of a *Co-I* gene fragment of approximately 650 bp were analyzed for fishes of the orders Perciformes and Scorpaeniformes (outgroup). Gene trees based on four algorithms (BA, NJ, MP, and ML) were similar in topology of solved branches. An emphasis was placed on the species and generic levels, but a significant phylogenetic signal was obtained for higher taxonomic ranks as well. For instance, a monophyletic origin was confirmed for the family Zoarcidae and the subfamily Opisthocentrinae (Stichaeidae). The proportion of different nucleotides in the sequences compared (*p*-distances) significantly increased with increasing taxonomic rank. The *p*-distances were estimated for four hierarchic levels and were (1) $0.15 \pm 0.06\%$ for the within-species hierarchic level, (2) $6.33 \pm 0.37\%$ for the within-genus level, (3) $11.83 \pm 0.06\%$ for the within-family level, and (4) $15.22 \pm 0.05\%$ for the within-order level. The difference in the *Co-I* gene fragments between levels (1) and (2) allows almost errorless species identification on the basis of this kind of a molecular bar code.