

АНАЛИЗ НУКЛЕОТИДНЫХ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ ГЕНА ЦИТОХРОМОКСИДАЗЫ 1 (CO1) мтДНК ПОЛЯРНОЙ *LIOPSETTA GLACIALIS* И ПОЛОСАТОЙ *LIOPSETTA PINNIFASCIATA* КАМБАЛ (PLEURONECTIDAE) ОХОТСКОГО МОРЯ

Н.А. ПОТАПОВА¹, С.П. ПУСТОВОЙТ², Р.Р. ЮСУПОВ³

¹ Северо-Восточный государственный университет, Магадан, РФ

² Институт биологических проблем Севера ДВО РАН, Магадан, РФ

³ Магаданский научно-исследовательский институт рыбного хозяйства и океанографии РФ

E-mail: pustov@ibpn.ru

Проанализированы первые данные о нуклеотидных последовательностях гена цитохромоксидазы (CO1) мтДНК полярной (*L. glacialis*) и полосатой (*L. pinnifasciata*) камбал Охотского моря. Нуклеотидное разнообразие гена цитохромоксидазы мтДНК 10 особей полярной камбалы ($\pi = 0,00370$) несколько меньше, чем у 28 особей полосатой камбалы ($\pi = 0,00446$), пойманных в Тауйской губе, Охотское море. Величина диспаритетного индекса, найденного по изменчивости нуклеотидов у особей полярной камбалы, указывает на неселективный характер замен, тогда как у особей полосатой камбалы около трети замен селективны. Величина нуклеотидных различий между особями полярной и полосатой камбал подтверждает их видовой статус.

Ключевые слова: цитохромоксидаза 1, полярная камбалы, полосатая камбалы, Охотское море.

Введение. В рамках глобального проекта ДНК-штрихкодирования видов животных и растений [1] в 2005 г. выделена программа, посвященная рыбам (Fish Barcode of Life Initiative, FISH-BOL) [2, 3]. К июлю 2011 г. из 31 тысячи видов рыбообразных и рыб стала известна нуклеотидная последовательность гена цитохромоксидазы митохондриальной ДНК (выбран в качестве единого для всех видов) для 25 % видов, а для отряда камбалообразных — 30,2 % [4]. Подавляющее число видов рыб из Тихого океана исследовано в Институте биоразнообразия, Канада (Biodiversity Institute of Ontario, BIO, [5, 6]). Активное участие российских ученых в выполнении указанной программы позволило получить нуклеотидные последовательности для видов рыб, обитающих в российских водах дальневосточных морей. В

частности, недавно получены первые сведения для ряда видов камбал [7–9]. Ранее генетические работы на камбаловых рыбах проводились с использованием метода электрофореза в геле для определения изменчивости аллозимных локусов [10, 11]. Среди исследованных видов полосатая и полярная камбалы в силу невысокой численности не являются первостепенными промысловыми объектами, что обуславливает их недостаточную изученность [12]. Современные данные о биологии полярной камбалы известны только для популяций северной части Охотского моря [13,14]. Краткие сведения о биологии полосатой камбалы получены для популяции из эстуария р. Большая (Западная Камчатка) [15].

Цель работы — провести статистический анализ нуклеотидных последовательностей фрагмента гена цитохромоксидазы двух видов полярных камбал из Охотского моря.

Материалы и методы. Особи полосатой (*L. pinnifasciata*) и полярной (*L. glacialis*) камбал отловлены в зимний период во время промыслового лова наваги в Амахтонском заливе Тауйской губы, северная часть Охотского моря. Материал собирали в течение пяти лет, с 2008 по 2012 гг. Всего исследовали 10 особей полярной и 28 особей полосатой камбалы. Латинское название полосатой камбалы дано по Фадееву [12] и У. Эшмайеру (<http://research.calacademy.org>), часто употребляют устаревшее название — *L. pinnifasciatus* [16].

Митохондриальную ДНК выделяли из замороженных кусочков мышц по солехлороформной методике [9, 17]. Секвенирование нуклеотидной последовательности гена цитохромоксидазы 1 произведено в ОАО «Синтол» (Москва). Для полимеразно-цепной реакции (ПЦР)

© Н.А. ПОТАПОВА, С.П. ПУСТОВОЙТ, Р.Р. ЮСУПОВ, 2014

здесь наименьшей среди прочих моделей. Модель является производной от двухпараметрической модели Kimura 2-parameter (K2) и учитывает количество GC нуклеотидов. Для исследованных сиквенсов указанная поправка оказалась существенной, так как ВИС для модели K2 существенно выше (1918,4) и даже выше, чем для однопараметрической модели Джукса-Кантора (1909,7). Сами замены носят неселективный характер, на что указывает величина теста Таджимы (табл. 3).

Для полосатой камбалы первые сведения о нуклеотидной последовательности гена CO1 получены для особей из Японского моря [8].

Общая длина исследованного нами участка гена цитохромоксидазы у 28 особей полосатой камбалы из Тауйской губы составила 599 нуклеотидов, обнаружено 11 гаплотипов (табл. 2). Как и у предыдущего вида, один корневой гаплотип G1 – наиболее частый (16/28 = 0,5714), второй корневой G2 – менее частый (3/28 = 0,1071), прочие варианты единичны. В общий кластер производных от первого гаплотипа G1 входят еще 6 гаплотипов, для второго гаплотипа G2 обнаружено 3 производных от него гаплотипа. Наличие второго корневого гаплотипа обусловило статистическое отличие по диспаратетному индексу проб LP-5, LP-12,

Таблица 2. Полиморфные сайты и гаплотипы нуклеотидной последовательности гена цитохромоксидазы 1 мтДНК полосатой камбалы

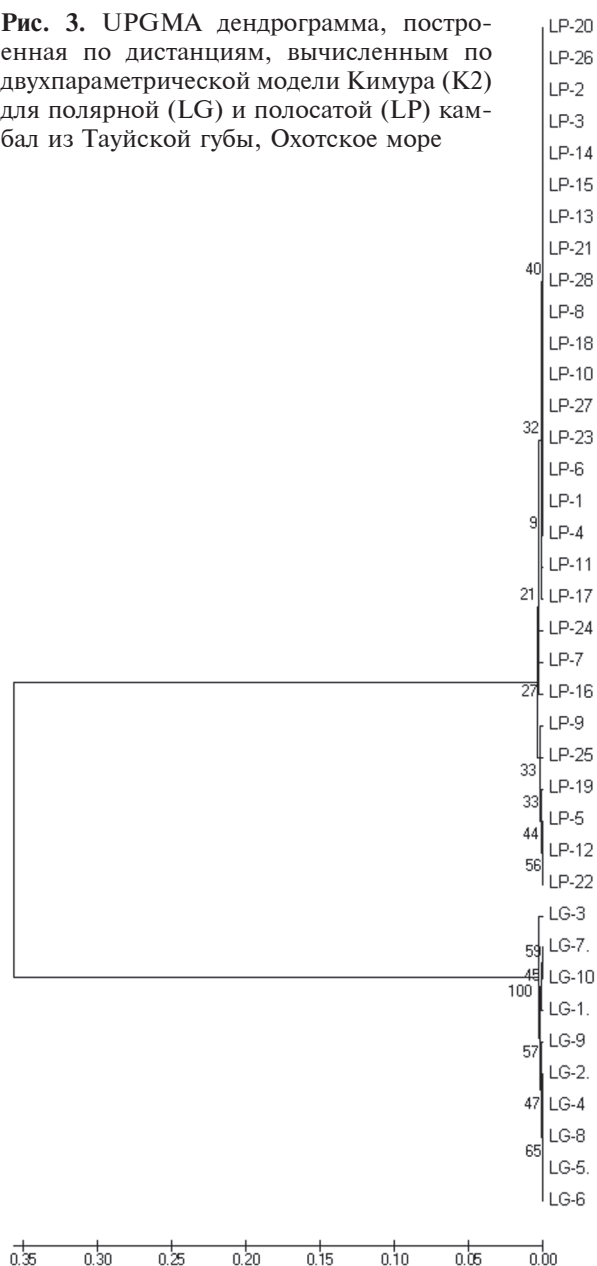
Номера особей	10	14	164	165	301	304	310	349	397	446	463	538	544	580	598	Га- п- ло- ти- пы
LP-1, LP-2, LP-3, LP-6, LP-8, LP-10, LP-13, LP-14, LP-15, LP-18, LP-20, LP-21, LP-23, LP-26, LP-27, LP-28	A	C	A	T	A	T	A	T	G	A	G	G	G	T	T	G1
LP-4	–	A	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	G1.1.
LP-11	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	C	–	–	–	–	G1.2.
LP-17	–	–	–	–	–	–	–	C	–	–	–	–	–	–	–	G1.3.
LP-7	–	–	–	–	–	–	T	C	A	C	–	–	–	–	–	G1.4.
LP-16	–	–	–	–	–	–	T	C	–	–	–	A	–	–	–	G1.5.
LP-24	–	A	T	C	–	–	–	–	–	–	–	–	–	C	–	G1.6.
LP-5, LP-22, LP-22	–	–	–	–	–	C	–	C	–	–	–	–	A	C	C	G2
LP-19	–	–	–	–	–	C	–	C	–	–	–	–	–	C	C	G2.1.
LP-25	G	–	–	–	–	C	–	C	–	T	–	–	A	C	C	G2.2.
LP-9	–	–	–	–	G	C	–	C	–	–	–	–	A	–	–	G2.3.

Таблица 3. Показатели изменчивости нуклеотидных последовательностей гена цитохромоксидазы 1 у полярной (*L. glacialis*) и полосатой (*L. pinnifasciata*) камбал

Вид	<i>N</i>	<i>m</i>	<i>s</i>	p_s	π	<i>D</i>	Модель *
Полярная камбала	596	10	6	0,01008	0,00370	0,154	T92
Полосатая камбала	599	28	15	0,02504	0,00446	–1,046	JC(K2)
Оба вида	582	38	275	0,47251	0,18404	2,389	K2

Примечание. *N* – длина секвенированного участка гена, *m* – число особей (сиквенсов), *s* – число полиморфных сайтов, $p_s = s/N$ – доля полиморфных сайтов, π – нуклеотидное разнообразие, *D* – тест Таджимы. * Наиболее вероятная модель для способа нуклеотидных замен, найденная по величине ВИС.

Рис. 3. UPGMA дендрограмма, построенная по дистанциям, вычисленным по двухпараметрической модели Кимура (K2) для полярной (LG) и полосатой (LP) камбал из Тауйской губы, Охотское море



LP-19 и LP-22 (нулевая гипотеза при сравнении указанных проб отвергается в 62 случаях попарного сравнения из 378).

В полученном нами наборе сиквенсов для полосатой камбалы наиболее вероятным способом замены нуклеотидов является однопараметрическая модель Джукса и Кантора (JC, $ВІС = 2464,37$). По величине Байесовского критерия $ВІС$ от этой модели незначительно

отличается двухпараметрическая модель Кимуры ($K2$, $ВІС = 2465,77$). Отметим, что обычно при изучении нуклеотидных последовательностей гена цитохромоксидазы у рыб без обсуждения принимается модель Кимуры. Тест Таджимы указывает на неселективный характер нуклеотидных замен (табл. 3). Полученный результат ожидаем и для предыдущего вида, поскольку исследованы выборки из одного места Тауйской губы. Возможно, это одна популяция каждого вида. Селективный характер замен можно предполагать в случае анализа выборок из разных частей ареала, где вектор отбора может быть неодинаковым. Для проверки высказанной гипотезы нужны дополнительные исследования.

Нуклеотидное разнообразие полярной камбалы несколько меньше, чем полосатой, что возможно связано с большим числом исследованных особей у второго вида (табл. 3). Изменчивость гена *COI* невысока, поскольку он рассматривается как видоспецифичный маркер [22]. Вместе с тем нами показана изменчивость этого гена, что обуславливает необходимость исследовать несколько особей каждого вида для полного описания характерного для вида набора гаплотипов. Использование ограниченного набора особей (например, [8]) может повлиять в том числе и на филогенетические построения для широкого набора видов. По нашему мнению, исследование двух-трех десятков особей (как в случае с полосатой камбалой) может быть необходимым минимумом для корректной оценки величины нуклеотидного разнообразия гена цитохромоксидазы I у каждого вида камбал.

Исследованные виды рельефно различаются по последовательностям изученного участка гена мтДНК (рис. 3), что подтверждает видовой статус как полярной, так и полосатой камбал [23]. Отметим, что в ихтиологической литературе иногда встречается смешанное написание вида. Например, в работе Токранова и др. [15] авторы исследованную ими камбалу называют полярной полосатой камбалой *Liopsetta pinnifasciata*.

Существенные видовые отличия в нуклеотидных последовательностях гена *COI* обусловили рост величины нуклеотидной изменчивости (табл. 3). Тест Таджимы свидетельствует

о селективном характере замен, накопленных в процессе эволюции двух видов.

В настоящей работе впервые генетическими методами доказано совместное обитание двух видов рода полярных камбал в Амахтонском заливе Тауйской губы. В результате траловой съемки на шельфе северной части Охотского моря в 2000 г. обнаружено обитание семи видов рыб сем. *Pleuronectidae* [24]. Среди них найдена только полярная камбала. Границы ареалов исследованных видов в Охотском море точно не известны [12]. Можно предположить, что для полосатой камбалы Амахтонский залив является самым северным местообитанием в Охотском море, поскольку она сосредоточена в основном в Японском море, а также в южных частях Охотского и Берингова морей [25]. Полярная камбала является наиболее холодолюбивым видом семейства камбаловых и распространена в северных частях Охотского и Берингова морей России, поэтому ее нынешнее местонахождение возможно близко к южной границе ареала.

ANALYSIS OF NUCLEOTIDE SEQUENCES OF CYTOCHROME C OXIDASE I (COI) GENE OF ARCTIC *LIOPSETTA GLACIALIS* AND STRIPED *LIOPSETTA PINNIFASCIATA* FLOUNDER (PLEURONECTIDAE) OF THE SEA OF OKHOTSK

N.A. Potapova, S.P. Pustovoyt, R.R. Yusupov

North East State University, Magadan, Institute of Biological Problems of the North FED Russian Academy of Sciences, Magadan Magadan Research Institute of Fisheries and Oceanography
E-mail: pustov@ibpn.ru

The first data on nucleotide sequences of cytochrome C oxidase I (COI) gene of Arctic and striped flounders of the Sea of Okhotsk are analyzed. Nucleotide diversity of COI gene for 10 individuals of arctic flounder ($\pi = 0,00370$) is slightly less than that for 28 individuals of a striped flounder ($\pi = 0,00446$), caught in the Tauy Lip, the Sea of Okhotsk. The size of the disparity index found on variability of nucleotides at individuals of a polar flounder indicates not selective nature of replacements, whereas at individuals of a striped flounder about a third of replacements is selective. The size of nucleotide distinctions between individuals arctic and striped flounders confirms the specific status of these fishes.

АНАЛІЗ НУКЛЕОТИДНИХ ПОСЛІДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ ГЕНА ЦИТОХРОМОКСИДАЗИ I (COI) мтДНК ПОЛЯРНОЇ *LIOPSETTA GLACIALIS* ТА СМУГАСТОЇ *LIOPSETTA PINNIFASCIATA* КАМБАЛ (PLEURONECTIDAE) ОХОТСЬКОГО МОРЯ

Н.А. Потапова, С.П. Пустовойт, Р.Р. Юсупов

Проаналізовано перші дані про нуклеотидні послідовності гена цитохромоксидази (COI) мтДНК полярної (*L. glacialis*) та смугастої (*L. pinnifasciata*) камбал Охотського моря. Нуклеотидна різноманітність гена цитохромоксидази мтДНК 10 особин полярної камбали ($\pi = 0,00370$) дещо менше, ніж у 28 особин смугастої камбали ($\pi = 0,00446$), виловлених в Тауйській губі, Охотське море. Величина диспаратного індексу, знайденого по мінливості нуклеотидів у особин полярної камбали, вказує на не-селективний характер замінів, тоді як у особин смугастої камбали близько третини замінів селективні. Величина нуклеотидних відмінностей між особинами полярної і смугастої камбал підтверджує їхній видовий статус.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Hebert P.D.N., Cywinska A., Ball S.L., de Waard J.R. Biological identifications through DNA barcodes // Proc. Roy. Soc. L. Ser. B. – 2003. – 270, № 1512. – P. 313–321.
2. Ward R.D., Zemlak T.S., Innes B.A. et al. DNA barcoding Australia's fish species // Ibid. – 2005. – 360, № 1716. – P. 1847–1857.
3. Ward R.D., Hanner R., Hebert P.D.N. The campaign to DNA barcode all fishes, FISH-BOL // J. Fish Biol. – 2009 – 74, № 2. – P. 329–356.
4. Becker S., Hanner R., Steinke D. Five years of FISH-BOL: Brief status report // Mitochondrial DNA. – 2011. – 22, Suppl. 1. – P. 3–9.
5. Hubert N., Hanner R., Holm E. et al. Identification Canadian freshwater fishes through DNA barcodes // PLoS ONE. – 2008. – 3, № 6. – e2490.
6. Mecklenburg C.W., Moller P.R., Steinke D. Biodiversity of arctic marine fishes: taxonomy and zoogeography // Marine Biodiversity. – 2011. – 41. – P. 109–140.
7. Потапова Н.А., Пустовойт С.П., Юсупов Р.Р. ДНК-штрихкодирование полярной камбалы *Liopsetta glacialis* // Вестн. Сев.-Вост. гос. ун-та. – 2013. – Вып. 19. – С. 84–91.
8. Шарина С.Н., Картавцев Ю.Ф. Филогенетический анализ камбал (Teleostei, Pleuronectiformes), основанный на исследовании нуклеотидных последовательностей гена цитохромоксидазы I (Co1) // Генетика. – 2010. – 46, № 3. – С. 401–407.

9. Пустовойт С.П., Юсупов Р.Р. О нуклеотидной последовательности гена цитохромоксидазы Со-1 митохондриальной ДНК желтоперой камбалы (*Limanda aspera*) Тайской губы // Вестн. Сев.-Вост. гос. ун-та. – 2012. – Вып. 17. – С. 49–58.
10. Коваль Е.З., Богданов Л.В. Сравнение электрофоретических спектров белков у разных видов дальневосточных камбал (Pleuronectiformes, Pleuronectidae) // Вопр. ихтиологии. – 1982. – 22, вып. 4. – С. 679–685.
11. Pustovoit S.P., Yusupov R.R. Genetic differentiation of yellowfin sole (*Limanda aspera*) from Tai Bay in the Okhotsk Sea // Cytology and Genetics. – 2011. – 45, № 3. – P. 182–186.
12. Фадеев Н.С. Справочник по биологии и промыслу рыб северной части Тихого океана. – Владивосток : ТИПРО-центр, 2005. – 366 с.
13. Юсупов Р.Р. Эмбрионально-личиночное развитие полярной камбалы *Liopsetta glacialis* (Pleuronectidae) Тайской губы (северная часть Охотского моря) // Изв. ТИПРО. – 2010. – 162. – С. 179–193.
14. Юсупов Р.Р., Басов И.Д. Морфо-биологическая характеристика полярной камбалы *Liopsetta glacialis* (Pleuronectidae, Pleuronectiformes) Тайской губы (северная часть Охотского моря) // Вестн. СВНЦ ДВО РАН. – 2005. – № 2. – С. 48–55.
15. Токранов А.М., Максименков В.В. Некоторые черты биологии полярной полосатой камбалы *Liopsetta pinnifasciata* (Pleuronectidae) эстуария реки Большая (западная Камчатка) // Вопр. ихтиологии. – 1994. – 34, № 6. – С. 774–777.
16. Линдберг Г.У., Федоров В.В. Рыбы Японского моря и сопредельных частей Охотского и Желтого морей. – СПб.: Наука, 1993. – Ч. 6. – 272 с.
17. Sambrook J.F., Fritsch E.F., Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual. – New York : Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989. – 1626 p.
18. Ivanova N.V., De Waard J.R., Hebert P.D.N. An inexpensive, automation-friendly protocol for recovering high-quality DNA // Mol. Ecol. Notes. – 2006. – 6. – С. 998–1002.
19. 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. – 19, № 6. – P. 479–489.
20. Tamura K., Peterson D., Peterson N. et al. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. 2011. www.megasoftware.net
21. Kumar S., Gadagkar S.R. Disparity Index : A simple statistic to measure and test the homogeneity of substitution patterns between molecular sequences // Genetics. – 2001. – 158. – P. 1321–1327.
22. Шнеер В.С. ДНК-штрихкодирование видов животных и растений – способ их молекулярной идентификации и изучения биоразнообразия // Журн. общ. биологии. – 2009. – 70, № 4. – С. 296–315.
23. Промысловые рыбы России / Под ред. О.Ф. Гриценко и др. – М., 2006. – 1280 с.
24. Вышегородцев В.А., Панфилов А.М. О результатах донной траловой съемки в северной части Охотского моря на НИС «Зодиак» в августе-сентябре 2000 г. // Состояние и перспективы рыбохозяйственных исследований в бассейне северной части Охотского моря. – Магадан, 2001. – С. 7–36.
25. Дьяков Ю.П. Распространение и зоогеографическая характеристика камбалообразных рыб (Pleuronectiformes) дальневосточных морей России // Исследования водных биологических ресурсов Камчатки и северо-западной части Тихого океана. – 2007. – Вып. 9. – С. 205–229.

Поступила 06.06.13