

С. П. Пустовойт, Р. Р. Юсупов

ДНК штрих-кодирование хоботной камбалы (*Myzopsetta proboscidea*) из Тайской губы, Охотское море

Аннотация. Хоботная камбала (*Myzopsetta proboscidea*) рассматривается как промысловый вид рыб отряда камбалообразные (*Pleuronectiformes*). Впервые описана изменчивость нуклеотидных последовательностей гена цитохромоксидазы субъединицы 1 (CO I) митохондриальной ДНК популяции хоботной камбалы, обитающей в Тайской губе, Охотское море. У 15 особей в последовательностях длиной 669 нуклеотида выявлено 12 полиморфных сайтов, гаплотипическое разнообразие равно $0,724 \pm 0,0312$. Указанная величина больше, чем у особей из Берингова и Чукотского морей (сведения из Международной Базы, *International Of Barcode Of Life, IBOL*). Из 15 исследованных особей у семи особей обнаружены новые варианты нуклеотидного состава исследованного гена, тогда как у восьми полное совпадение с аналогичными последовательностями у ранее исследованных особей (Международная База). Выявление видовых особенностей нуклеотидной последовательности фрагмента гена позволит внести ясность в систематику малоротых камбал семейства *Pleuronectidae*.

Ключевые слова: хоботная камбала, цитохромоксидаза субъединицы 1 мтДНК, Охотское море.

Авторы:

Пустовойт Сергей Павлович — кандидат биологических наук, заведующий кафедрой биологии и химии Северо-Восточного государственного университета; 68500 г. Москва, ул. Портовая, д.13, e-mail: kafbio@svgu.ru;

Юсупов Равиль Рашитович — кандидат биологических наук, главный научный сотрудник лаборатории прибрежных рыб Магаданского Научно-Исследовательского Институт Рыбного Хозяйства и Океанографии (МагаданНИРО). 68500 г. Магадан, ул. Портовая д. 36/10.

Хоботная камбала (*Myzopsetta proboscidea*) является одним из промысловых видов рыб, добываемых в морях Дальнего Востока России. Например, в промысловых уловах камбаловых рыб (*Pleuronectidae*) на западнокамчатском шельфе хоботная камбала обычно встречается вместе с желтоперой камбалой, но ее численность значительно меньше [1]. Как и другие виды малоротых камбал, она зимой обычно отходит от побережья в глубинные участки шельфа, а летом возвращается на откорм и нерест. Подробные сведения о биологии этого вида обобщены недавно [2].

Одним из перспективных направлений генетических исследований хоботной камбалы следует признать определение нуклеотидных последовательностей митохондриальной ДНК (мтДНК). В рамках программы FISH-BOL, основным является ген цитохромоксидазы субъединицы 1 мтДНК (DNA barcode) [3, 4]. Данный ген рассматривается как видовой маркер, пригодный для идентификации видов рыб, в том числе и камбал [5–7].

Цель данной работы — описание нуклеотидных последовательностей фрагмента гена цитохромоксидазы субъединицы 1 у хоботной камбалы из Охотского моря.

15 особей хоботной камбалы пойманы как прилов при промысле сельди в Тайской губе в 2009—

2010 гг. Материал хранился в замороженном состоянии до лабораторного исследования. Буквы в названии особи — от латинского названия вида, цифры — порядковые номера особей, исследованных в 2015 г.

Из замороженных кусочков мышц особей выделяли ДНК по стандартной методике с небольшими модификациями [7]. Секвенирование нуклеотидной последовательности фрагмента гена цитохромоксидазы выполнено в ЗАО «Синтол», г. Москва. Для полимеразной цепной реакции использованы следующие праймеры [8]: VF1 5' TTC TCA ACC AAC CAC AAA GAC ATT GG 3', VR1 5'TAG ACT TCT GGG TGG CCA AAG AAT CA3'. Из пары антипараллельных последовательностей (прямой и обратной), определенных у каждой особи, для дальнейшего анализа получена одна последовательность. Последовательности ДНК были выровнены при помощи программы Clustal W, входящей в пакет MEGA 6.0 [9]. Для конструирования дендрограмм использовали r-дистанции, метод кластеризации для построения дендрограмм невзвешанный попарно-групповой (UPGMA). Показатели гаплотипического и нуклеотидного разнообразия, а также теста Таджимы найдены при помощи программы (DnaSP, v.5) [10].

Общая длина исследованного фрагмента гена цитохромоксидазы субъединицы у всех особей

хоботной камбалы составила 669 нуклеотидов. Ранее нуклеотидная последовательность этого участка гена цитохромоксидаза определена у 11 особей из Берингова и Чукотского морей. Номера секвенсов, хранящиеся в Международной Базе (International Of Barcode Of Life, IBOL, www.ibol.org) указаны в таблице 1. Проанализируем генетическую изменчивость хоботной камбалы с учетом опубликованных данных.

Поскольку полная нуклеотидная последовательность имеется в Международной Базе, то можно привести только полиморфные варианты (Табл. 1). Нумерация сайтов в таблице начинается с первого номера самой длинной последовательности FMV440-09. В этом случае проанализированные нами последовательности начинаются с третьей позиции и заканчиваются 671. Восемь камбал из Охотского моря имеют такие же последовательности фрагмента гена, что и особи, секвенсы которых хранятся в базе IBOL (Рис.1).

Для остальных можно отметить следующие варианты. Если взять за типичную (поскольку она выявлена у наибольшего числа особей) последовательность № DSFAL208-07, то наибольшее число вариантов отмечено у особи MP-415. Трансверсии следующие: № 29 C→G, № 43 T→G, № 51 G→C, № 119 T→A, № 122 C→G, № 256 T→G. Столь высокое число трансверсий при отсутствии более вероятных транзиций в данной последовательности пока не имеет объяснения. Немногим меньше полиморфных сайтов у секвенса MP-115: транзиции в положении № 359 и № 653 G→A, и в положении № 371 C→T и № 575 T→C. Как и в предыдущем случае, у особи MP-2315 четыре полиморфных сайта: транзиции № 365 A→G, № 371 C→T, № 653 G→A и трансверсия № 575 T→A. Сайт № 371 полиморфен (транзиция) у особи № MP-815 и MP-2315. Есть и единичные замены, например, у особи MP-615 обнаружена транзиция (№ 92 G→A), у MP-515 и MP-1015 транзиция в сайте № 365 A→G.

Таблица 1. Полиморфные сайты в нуклеотидной последовательности фрагмента гена цитохромоксидаза субъединицы 1 митохондриальной ДНК хоботной камбалы

Код особи	29	43	51	92	119	122	200	256	359	365	371	575	653	671
DSFAL208-07	C	T	G	G	T	C	A	T	G	A	C	T	G	—
DSFAL249-07	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
DSFAL657-09	—	—	—	—	—	—	G	—	—	—	—	—	—	—
DSFIB052-11	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
DSFIB117-11	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
DSFIB135-11	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
DSFIB136-11	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
DSFIB152-12	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
DSFIB154-12	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
DSFIB238-13	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
FMV440-09	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	C
MP-115	—	—	—	—	—	—	—	—	A	—	T	C	A	T
MP-415	G	G	C	—	A	G	—	—	—	—	—	—	—	T
MP-515	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	T
MP-615	—	—	—	A	—	—	—	—	—	—	—	—	—	T
MP-815	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	T	—	A	T
MP-1015	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	T
MP-2015	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	T
MP-2315	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	T	A	A	T
MP-2415	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	T
MP-2515	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	T
MP-2615	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	T
MP-3915	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	T
MP-4015	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	T
MP-4315	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	T
MP-4815	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	T

Примечание: прочерк означает отсутствие нуклеотида в последовательности.

Появление новых, ранее не обнаруженных вариантов нуклеотидов в исследованной последовательности скорее всего связано с особенностями генетического разнообразия у хоботных камбал Охотского моря. Показатели генетического разнообразия выборки из Охотского моря существенно выше аналогичных величин у камбал из Берингова и Чукотского морей. Следует также отметить необходимость с осторожностью относиться к результатам исследований ограниченного числа особей при описании генетической изменчивости отдельного вида [11].

Нуклеотидное и гаплотипическое разнообразие исследованного фрагмента гена цитохромоксидазы хоботной камбалы имеет значение сходное с таковыми у полярной и полосатой камбал (Табл. 2). Вместе с тем оно меньше, чем у белокорой палтуса. Отметим, что особи перечисленных видов пойманы в Охотском море (за исключением отмеченных данных из GenBank). У всех исследованных камбал замены носят неселективный характер (Табл.2).

Исследованный нами участок мтДНК имеет особенности в нуклеотидном составе, характерные для данного вида. О необходимости в накоплении информации о видовых (или родовых?) особенностях говорит, в частности, факт неопределенности в отношении рода, к которому принадлежит хоботная камбала. В отечественном определителе рыб Японского моря род точно не определен, поскольку научное название вида — *Pleuronectes (Limanda) proboscideus* [12]. Л. А. Борец [1] относит рассматриваемый вид к роду *Pleuronectes*. В современной сводке о промысловых рыбах России [13] хоботная камбала отнесена к роду *Limanda (Limanda proboscidea)*. А. Н. Световидов [14] рассматривал хоботную камбалу как подвид длиннорылой камбалы (*Limanda punctatissima proboscidea*). Р. Р. Юсупов [2] разделяет точку зрения о принадлежности хоботной камбалы к роду *Myxopsetta*. Аналогичной точки зрения придерживаются ихтиологи-систематики [15]. Современное изучение генетических особенностей генов митохондрий хоботной камбалы в сравнении с таковыми у родственных видов из числа малоротых камбал позволит внести ясность в вопрос о родовой принадлежности исследованного вида.

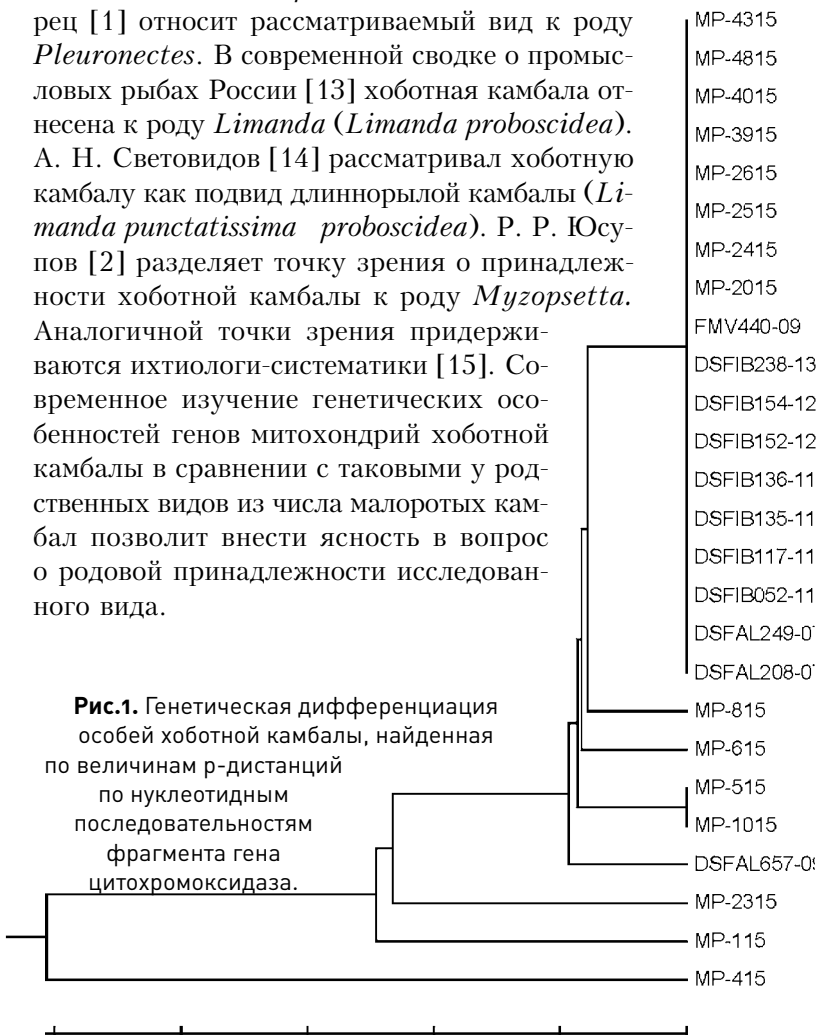


Рис.1. Генетическая дифференциация особей хоботной камбалы, найденная по величинам р-дистанций по нуклеотидным последовательностям фрагмента гена цитохромоксидазы.

Таблица 2. Параметра генетического разнообразия камбал, обитающих в северной части Охотского моря

Выборка	N	m	S	Ps	Нуклеотидное разнообразие (π)	Число гаплотипов (h)	Гаплотипическое разнообразие (Hd)	D	Источник
Хоботная камбала (<i>Myxopsetta proboscidea</i>)	669	15	12	0,01794	0,00352 ± 0,000294	7	0,724 ± 0,0312	-1,6185, p>0,05	н.д.
Хоботная камбала (<i>Myxopsetta proboscidea</i>)	639–673	11	1	0,00157	0,00029 ± 0,00007	2	0,182 ± 0,0434	-1,1285, p>0,05	Данные из NCBI
Полярная камбала (<i>Liopsetta glacialis</i>)	596	10	6	0,01008	0,00370 ± 0,000206	6	0,844 ± 0,03257	0,154, p>0,05	Потапова и др., 2014
Полосатая камбала (<i>Liopsetta pinnifasciata</i>)	599	28	15	0,02504	0,00447 ± 0,000166	11	0,675 ± 0,0185	-1,2038, p>0,05	Потапова и др., 2014
Белокорый палтус (<i>Hippoglossus stenolepis</i>)	651	9	11	0,0169	0,00495 ± 0,00106	7	0,917 ± 0,0307	-0,9581, p>0,05	Пустовойт и др., 2015

N — длина секвенированного участка гена, m — число особей (секвенсов), s — число полиморфных сайтов, π = s/N — доля полиморфных сайтов, π — нуклеотидное разнообразие, h — число гаплотипов, Hd — гаплотипическое разнообразие, D — тест Таджимы.

Литература

1. Борец Л. А. Донные ихтиоцены российского шельфа: состав, структура, элементы функционирования и промысловое значение / Л. А. Борец // Владивосток: ТИНРО-центр. — 1997. — 217 с.
2. Юсупов Р. Р. Биологическая характеристика хоботной камбалы *Myxopsetta proboscidea* (Pleuronectidae) северной части Охотского моря / Р. Р. Юсупов // Исследования водных биологических ресурсов Камчатки и северо-западной части Тихого океана. — 2013. — Вып.29. — С. 116–124.
3. Becker S. Five years of FISH-BOL: Brief status report / S. Becker, R. Hanner, D. Steinke // Mitochondrial DNA. — 2011. — 22 (S1). — P. 3–9.
4. Ward R. D. The campaign to DNA barcode all fishes, FISH-BOL / R. D. Ward, R. Hanner, P. D. N. Hebert // Journal of Fish Biology. — 2009. — V. 74. — № 2. — P. 329–356.
5. Потапова Н. А. Анализ нуклеотидных последовательностей гена цитохромоксидазы 1 (CO1) мтДНК полярной *Liopsetta glacialis* и *Liopsetta pinnifasciata* полосатой камбал (Pleuronectidae) Охотского моря / Н. А. Потапова, С. П. Пустовойт, Р. Р. Юсупов // Цитология и генетика. — 2014. — Т. 48. — № 6. — С.11–16.
6. Пустовойт С. П. Анализ изменчивости нуклеотидной последовательности фрагмента гена цитохромоксидазы 1 мтДНК у тихоокеанского белокорого палтуса (*Hippoglossus stenolepis*) Охотского моря / С. П. Пустовойт, Р. Р. Юсупов, А. И. Каика // Исследования водных биологических ресурсов Камчатки и северо-западной части Тихого океана. — 2015. — Вып. 36. — С. 25–33.
7. Пустовойт С. П. О нуклеотидной последовательности гена цитохромоксидаза CO-1 митохондриальной ДНК желтоперой камбалы (*Limanda aspera*) Тауйской губы / С. П. Пустовойт, Р. Р. Юсупов // Вестник Северо-Восточного государственного университета. — 2012. — Выпуск 17. — С. 49–58.
8. Ivanova N. V. An inexpensive, automation-friendly protocol for recovering high-quality DNA / N. V. Ivanova, J. R. De Waard, P. D. N. Hebert // Molecular Ecology Notes. — 2006. — № 6. — С. 998–1002.
9. Tamura K. MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. Molecular Biology and Evolution / K. Tamura, G. Stecher, D. Peterson, A. Filipski, S. Kumar. — 2013. — № 30. — P. 2725 – 2729.
10. Librado P. Dna SP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data / P. Librado, J. Rozas // Bioinformatics. — 2009. — № 25. — P. 1451–1452.
11. Шарина С. Н. Филогенетический анализ камбал (Teleostei, Pleuronectiformes), основанный на исследовании нуклеотидных последовательностей гена цитохромоксидазы (CO-1) / С. Н. Шарина, Ю. Ф. Картавцев // Генетика. — 2010. — Т. 46. — № 3. — С. 401–407.
12. Линдберг Г. У. Рыбы Японского моря и сопредельных частей Охотского и Желтого морей / Г. У. Линдберг, В. В. Федоров // СПб: Наука. — 1993. — Часть 6. — 272 с.
13. Промысловые рыбы России. В двух томах / под ред. О. Ф. Гриценко, А. Н. Котляра и Б. Н. Котенева М.: изд-во ВНИРО. — 2006. — 1280 с.
14. Световидов А. Н. Рыбы северных морей СССР. М.Л.: изд-во АН СССР. 1954. 566 с.
15. Федоров В. В. Каталог морских и пресноводных рыб северной части Охотской моря / В. В. Федоров, И. А. Черешнев, М. В. Назаркин, А. В. Шестаков, В. В. Волобуев // Владивосток: Дальнаука. — 2003. — 204 с.

Pustovoit S. P., Yusupov R. R.

DNA barcoding Longhead dab (*Myxopsetta proboscidea*) from Taiu Bay, the Sea of Okhotsk

Abstract. Longhead dab (*Myxopsetta proboscidea*) is considered as a commercial species of flatfish. For the first time described the variability of the nucleotide sequences of the gene cytochrome oxidase subunit 1 (CO I) mitochondrial DNA of northern populations of Longhead dab, inhabiting Taiu Bay, the Sea of Okhotsk. The nucleotide sequence of length 672 revealed 7 polymorphic sites, haplotype diversity equal to $0,724 \pm 0,0311$. This

value is greater than that of individuals from the Bering and Chukchi Seas due to the detection of individuals with new variants of the nucleotide composition of the investigated gene. Identification of specific features of the nucleotide sequence of the gene fragment allows to clarify the systematics of smallmouth flounder *Pleuronectidae*.

Key words: Longhead dab, cytochrome oxidase 1 of mtDNA, the Sea of Okhotsk.

Authors:

Pustovoit Sergei — Ph.D. in Biological Sciences, Head of Department of Biology and Chemistry, North Eastern State University, 685000 Russia, Magadan, Portovaya Street, 13, kafbio@svgu.ru;

Yusupov Ravil — Ph.D. in Biological Sciences, Chief Researcher, Laboratory of Coastal Fish, Magadan Research Institute of Fisheries and Oceanography, 685000 Magadan, Portovaya Street 36/10.

References

1. Borec L. A. Donnye ihtiocyeny rossijskogo shel'fa: sostav, struktura, jelementy funkcionirovaniya i promyslovoe znachenie / L. A. Borec // Vladivostok: TINRO-centr. — 1997. — 217 s.
2. Jusupov R. R. Biologicheskaja karakteristika hobotnoj kambaly *Myzopsetta proboscidea* (*Pleuronectidae*) severnoj chasti Ohotskogo morja / R. R. Jusupov // Issledovaniya vodnyh biologicheskikh resursov Kamchatki i severo-zapadnoj chasti Tihogo okeana. — 2013. — Vyp. 29. — S. 116–124.
3. Becker S. Five years of FISH-BOL: Brief status report / S. Becker, R. Hanner, D. Steinke // Mitochondrial DNA. — 2011. — 22 (S1). — P. 3–9.
4. Ward R. D. The campaign to DNA barcode all fishes, FISH-BOL / R. D. Ward, R. Hanner, P. D. N. Hebert // Journal of Fish Biology. — 2009. — V. 74. — № 2. — P. 329–356.
5. Potapova N. A. Analiz nukleotidnyh posledovatel'nostej gena citohromoksidazy 1 (SO1) mtDNK poljarnoj *Liopsetta glacialis* i *Liopsetta pinnifasciata* polosatoj kambal (*Pleuronectidae*) Ohotskogo morja / N. A. Potapova, S. P. Pustovojt, R. R. Jusupov // Citologija i genetika. — 2014. — T. 48. — № 6. — S.11–16.
6. Pustovojt S. P. Analiz izmenchivosti nukleotidnoj posledovatel'nosti fragmenta gena citohromoksidazy 1 mtDNK u tihookeanskogo belokorogo paltusa (*Hippoglossus stenolepis*) Ohotskogo morja / S. P. Pustovojt, R. R. Jusupov, A. I. Kaika // Issledovaniya vodnyh biologicheskikh resursov Kamchatki i severo-zapadnoj chasti Tihogo okeana. — 2015. — Vyp. 36. — S. 25–33.
7. Pustovojt S. P. O nukleotidnoj posledovatel'nosti gena citohromoksidaza SO-1 mitochondrial'noj DNK zheltoperoj kambaly (*Limanda aspera*) Taujskoj guby / S. P. Pustovojt, R. R. Jusupov // Vestnik Severo-Vostochnogo gosudarstvennogo universiteta. — 2012. — Vypusk 17. — S. 49–58.
8. Ivanova N. V. An inexpensive, automation-friendly protocol for recovering high-quality DNA / N. V. Ivanova, J. R. De Waard, P. D. N. Hebert // Molecular Ecology Notes. — 2006. — № 6. — C. 998–1002.
9. Tamura K. MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. Molecular Biology and Evolution / K. Tamura, G. Stecher, D. Peterson, A. Filipski, S. Kumar. — 2013. — № 30. — P. 2725–2729.
10. Librado P. Dna SP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data / P. Librado, J. Rozas // Bioinformatics. — 2009. — № 25. — P. 1451–1452.
11. Sharina S. N. Filogeneticheskij analiz kambal (*Teleostei*, *Pleuronectiformes*), osnovannyj na issledovanii nukleotidnyh posledovatel'nostej gena citohromoksidazy (SO-1) / S. N. Sharina, Ju. F. Kartavcev // Genetika. — 2010. — T. 46. — № 3. — S.401–407.
12. Lindberg G. U. Ryby Japonskogo morja i sopredel'nyh chastej Ohotskogo i Zheltogo morej / G. U. Lindberg, V. V. Fedorov // SPB: Nauka. — 1993. — Chast' 6. — 272 s.
13. Promyslovye ryby Rossii. V dvuh tomah / pod red. O. F. Gricenko, A. N. Kotljara i B. N. Koteneva M.: izd-vo VNIRO. — 2006. — 1280 s.
14. Svetovidov A. N. Ryby severnyh morej SSSR. M.L.: izd-vo AN SSSR. 1954. 566 s.
15. Fedorov V. V. Katalog morskikh i presnovodnyh ryb severnoj chasti Ohotskoj morja / V. V. Fedorov, I. A. Chereshev, M. V. Nazarkin, A. V. Shestakov, V. V. Volobuev // Vladivostok: Dal'nauka. — 2003. — 204 s.