

КРАТКИЕ  
СООБЩЕНИЯ

УДК 597.585.4.575

СЕВЕРНЫЙ ОДНОПЁРЫЙ ТЕРПУГ *PLEUROGRAMMUS MONOPTERYGIUS*  
(PALLAS, 1810) (PISCES: HEXAGRAMMIDAE) В ЯПОНСКОМ МОРЕ –  
ПОДТВЕРЖДЕНИЕ НА ОСНОВЕ ГЕНЕТИЧЕСКИХ ДАННЫХ

© 2009 г. А. А. Баланов\*, А. Д. Кухлевский

Институт биологии моря Дальневосточного отделения РАН – ИБМ ДВ РАН, Владивосток

\* E-mail: abalanov@imb.dvo.ru

Поступила в редакцию 14.04.2009 г.

**Ключевые слова:** однопёрый терпуг, *Pleurogrammus monopterygius*, Японское море, идентификация, 16S rRNA, COI, cyt b.

В последнее время для точной идентификации видов, помимо морфологических, активно используются генетические методы. Показано, что применение различных молекулярно-генетических подходов позволяет достаточно надёжно разделять виды и определять филогенетические взаимоотношения разных групп рыб (Albertson et al., 1999; Smith, Griggs, 2001; Schander, Willassen, 2005).

В северной части Тихого океана северный однопёрый терпуг *Pleurogrammus monopterygius* (Pallas, 1810) наиболее обычен в прибрежных районах между средними Курильскими о-вами и зал. Аляска (Рутенберг, 1962; Дудник, Золотов, 2000; Мельников, Ефимкин, 2003). Встречается данный вид также в Охотском море, в тихоокеанских водах о. Хоккайдо и доходит на север до Анадырского залива (Таранец, 1941; Амаока et al., 1995; Борец, 2000; Баланов, 2003; Черешнев, Назаркин, 2004). В водах Японского моря *P. monopterygius* впервые был обнаружен в 2002 г. (Антоненко и др., 2003) и повторно – весной и летом 2007 г. (Соломатов и др., 2009). В последней работе сообщалось о трудностях в морфологическом разделении двух близких видов: северного и южного *P. azonus* Jordan et Metz, 1913 однопёрых терпугов.

В настоящей статье сделана попытка сравнить фрагменты последовательностей ДНК митохондриального генома (цитохром оксидазы I, цитохрома *b* и 16S rRNA) и ядерного генома (интрон 1 гена белка фактора репликации *gpS7*) одной особи *P. monopterygius* из материала, лёгшего в основу работы Соломатова с соавторами (2009), пойманной у юго-западного побережья Сахалина, с данными по этому виду из генетического банка.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Материалом для настоящей работы послужили пробы ДНК, собранные в донной траловой

съёмке, которая была выполнена совместно ТИНРО-центром, Хабаровским отделением ТИНРО-центра и СахНИРО на НИС “Дм. Песков” в апреле–мае 2007 г. Исследованиями был охвачен западносахалинский шельф, северная часть Татарского пролива и частично шельф северного Приморья на глубинах 18–614 м.

Ваучерные экземпляры: *P. monopterygius* МИМБ № 18845, половозрелый самец *SL* 296 мм, Японское море, НИС “Дм. Песков”, тр. 30, 13.04.2007, 46°04'2 с.ш., 141°03'3 в.д., глубина лова 500–514 м, донный трал; *P. azonus* МИМБ 18931, 2 экз. 198–229 мм *SL*, НИС “Дм. Песков”, Татарский пролив (Японское море), тр. 60, 19.04.2007, 47°48'1 с.ш., 141°19' в.д., глубина лова 200 м, донный трал.

Для исследования использованы пробы тканей сердца, фиксированные в 96%-ном этиловом спирте. Тотальную ДНК выделяли стандартным методом (Sambrook et al., 1989). Реакцию амплификации выполняли в 25 мкл, содержащих: 1 × ПЦР буфер (75 мМ Tris-HCl (pH 8.8 при 25°C), 20 мМ (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0.01% Tween 20 и 1.5 мМ MgCl<sub>2</sub>), 1 мМ смеси dNTP (0.25 мМ каждого), 0.25 мМ каждого праймера, 50 нг ДНК и 1 единицу Taq ДНК-полимеразы.

Используемые праймеры: для гена 16S рибосомальной РНК (16S rRNA) – 16SAR: 5'-CGCCTGTTTATCAAAAACAT-3' и 16SBR: 5'-CCGGTCTGAACTCAGATCACGT-3'; для гена цитохром оксидазы I (COI) – COI-Fish1: 5'-TCAACCAACCACAAAGACATTGGCAG-3' и COI-FishR1: 5'-TAGACTTCTGGGTGGCCAAAGAATCA-3'; для гена цитохрома *b* (cyt b) – FishCytB-F: 5'-ACCACCGTTGTTATTCAACTACAAGAAC-3' и TrucCytB-R: 5'-CCGACTTCCGGATTACAAGACCG-3'; для интрона 1 фактора белка репликации *gpS7* (*gpS7* intron 1) – S7RPEX1F:

5'-TGGCCTCTTCCTTGGCCGTC-3' и S7RPEX2R: 5'-AACTCGTCTGGCTTTTCGCC-3'.

Сравнение последовательности ДНК гена 16S rRNA и гена цитохрома *b* ваучерных образцов *Pleurogrammus azonus* и *P. monopterygius* из коллекции Музея Института биологии моря (МИБ) с имеющимися в генетическом банке данных (GenBank)

Коллекция МИБ	GenBank			
	ген 16S rRNA		ген цитохрома <i>b</i>	
	<i>P. azonus</i> (AB084134, AY539012)	<i>P. monopterygius</i> (EF458471)	<i>P. azonus</i> (AB087415)	<i>P. monopterygius</i> (AB087414)
<i>P. azonus</i> (EU856710)	487/0			
<i>P. monopterygius</i> (EU856713)		583/0		
<i>P. azonus</i> (EU856712)			958/0	
<i>P. monopterygius</i> (EU856715)				997/0.1

Примечание. До черты – длина анализируемого участка пар нуклеотидов (п.н.); после черты – нуклеотидная дивергенция, %.

Условия реакции амплификации были следующими. Для 16S rRNA последовательности гена: 94°C – 3 мин, последующие 30 циклов 94°C – 30 с, 54°C – 30 с, 72°C – 1 мин и окончательная достройка цепей 68°C – 5 мин. Для фрагмента гена *cytb*: 94°C – 3 мин, последующие 30 циклов 94°C – 30 с, 57°C – 30 с, 72°C – 1 мин 30 с и окончательная достройка цепей 68°C – 5 мин. Для фрагментов генов COI и *gpS7-intron1*: 94°C – 3 мин, последующие 30 циклов 94°C – 30 с, 60°C – 30 с, 72°C – 1 мин и окончательная достройка цепей 68°C – 5 мин.

Продукты реакции амплификации проверялись в 1%-ном агарозе и очищались переосаждением этиловым спиртом. Очищенные продукты использовались в качестве матрицы для секвенирующей реакции. Секвенальная реакция выполнялась в условиях, рекомендованных производителем, с использованием BigDye Terminator v. 3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems). Продукты секвенальной реакции осаждали этиловым спиртом и высушивали под вакуумом. Электрофорез проводили в машине ABI Prism 3130 DNA sequencer на 50 см колонке в полимере POP-7. Последовательности собирали с использованием программы SeqScape v. 2.5 (Applied Biosystems). Полученные последовательности были депонированы в Национальном центре биотехнологической информации (National Center for Biotechnology Information – NCBI/GenBank) под следующими номерами: *P. azonus* 16S rRNA, COI, *cytb* и *gpS7-intron 1* – EU856710, EU856711, EU856712, EU869283 соответственно; *P. monopterygius* 16S rRNA, COI, *cytb* и *gpS7-intron 1* – EU856713, EU856714, EU856715, EU869284 соответственно.

Полученные нами последовательности митохондриальных и ядерного гена *P. azonus* и *P. monopterygius* сравнивали с аналогичными последовательностями ДНК, доступными в GenBank/EMBL/DDBJ базах данных (*P. azonus*: 16S rRNA – AB084134, AY539012; *cytb* – AB087415; *gpS7-intron 1* – AY583195. *P. monopterygius* 16S rRNA –

EF458471, *cytb* – AB087414, *gpS7-intron 1* – AY583196).

Филогенетическое древо строили по методу ближайшего соседства (NJ) (Saitou, Nei, 1987) с использованием программы “MEGA 4” (Tamura et al., 2007). Эволюционное расстояние рассчитывали с применением 2-параметрического метода Кимуры (Kimura, 1980). Для статистической проверки поддержки ветвей использовали бутстреп метод с 1000 репликациями (Felsenstein, 1985).

В качестве внешней группы была взята последовательность гена цитохрома *b* *Hexagrammos octogrammus* (AB087412).

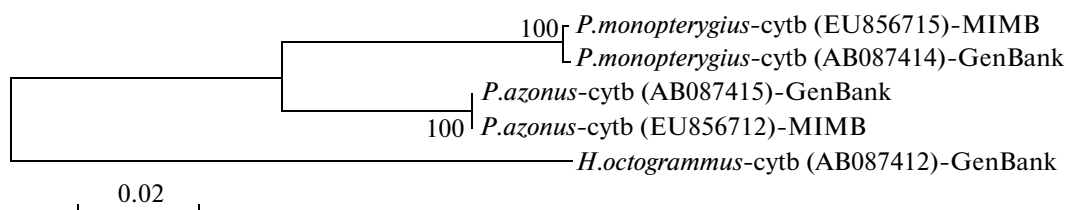
Ваучерные экземпляры и пробы ДНК хранятся в коллекции музея Института биологии моря им. А.В. Жирмунского ДВО РАН (МИБ).

## РЕЗУЛЬТАТЫ

Были секвенированы 3 фрагмента митохондриального генома (16S rRNA, COI и *cytb*), в сумме составляющие 15% митохондриального генома, и 1 фрагмент ядерного гена (*gpS7-intron 1*) у двух видов терпугов *P. azonus* и *P. monopterygius*. Результаты сравнительного анализа 16S rRNA и *cytb* последовательностей ДНК наших образцов и взятых из генетического банка данных представлены в таблице.

Из таблицы видна полная идентичность 16S rRNA и *cytb* участков мтДНК наших образцов и взятых из генетического банка. Секвенированный нами фрагмент гена *cytb* *P. monopterygius* отличается от имеющегося в генетическом банке данных на 1 нуклеотид. Данная замена не влияет на состав транслируемого белка.

**Ядерный ген *gpS7-intron 1*.** Имеющиеся в GenBank нуклеотидные последовательности для *P. azonus* (AY583195) и *P. monopterygius* (AY583196) короткие (217 п.н.) и идентичны для обоих видов. Соответственно они идентичны на данном участке с последовательностями, полученными нами для этих двух видов. Следует отметить необычную консервативность данного локуса у



Филогенетическое дерево, отражающее точность видовой принадлежности ваучерных образцов коллекции Музея Института биологии моря РАН *Pleurogrammus azonus* и *P. monopterygius*. Дерево построено на основании фрагмента гена цитохрома *b* (958 п.н.) с использованием метода ближайшего соседства (NJ) с бутстреп поддержкой 1000 реплик.

наших видов. Сравнение интрона 1 гена *gpS7* *P. azonus* и *P. monopterygius* на участке в 573 п.н. выявило только 1 нуклеотидную замену.

**COI.** В GenBank/EMBL/DDBJ нуклеотидных базах нет сведений для этих двух видов. Мы сравнили полученные нами фрагменты ДНК этого участка митохондриального генома для *P. azonus* и *P. monopterygius* друг с другом. После выравнивания и обрезки концов получился участок длиной 675 п.н. Различия между этими двумя видами составляют 35 нуклеотидных замен, что соответствует дивергенции 5.4%.

## ОБСУЖДЕНИЕ

Видовая идентификация молодых и взрослых особей *P. azonus* и *P. monopterygius* вызывает определенные затруднения, так как большинство признаков этих видов перекрываются в значительной степени (Рутенберг, 1962; Линдберг, Красюкова, 1987). Тем не менее, подробный анализ морфологических признаков одноперых терпугов рода *Pleurogrammus* показал, что есть признаки, которые позволяют хорошо разделять оба вида. Наиболее надежным признаком является наличие/отсутствие изгиба 1-й боковой линии на дорсальной части хвостового стебля. У *P. azonus* этого выступа нет, у *P. monopterygius* — есть (Рутенберг, 1962; Ильинский, 2007; Соломатов и др., 2009).

Для идентификации терпугов применялись генетические методы. Так Янаджимото (Yanagimoto, 2003) использовал ПЦР–ПДРФ анализ 12S rRNA-16S rRNA фрагмента митохондриального генома для идентификации 7 видов терпугов родов *Hexagrammos* и *Pleurogrammus* (сем. Hexagrammidae). Три фермента рестрикции (*DdeI*, *DpnII*, and *MspI*) были информативны для надежного определения этих видов.

Мы использовали более современную методику, секвенировав 3 фрагмента митохондриального генома и 1 участок ядерного, и так же получили положительный результат. Сравнение последовательностей генов 16S rRNA и *cytb* у исследованных рыб с имеющимися в генетическом банке для данных видов последовательностями ДНК полностью подтвердило видовую принадлежность наших препаратов. Приведенное филогенетическое дерево

(рисунок), построенное для последовательности гена *cytb*, отражает однозначность видовой принадлежности анализированных образцов. Характерно, что экземпляр из Японского моря со 100%-ной вероятностью объединился с *P. monopterygius*. Это еще раз доказывает, что в Японском море был обнаружен представитель именно этого вида.

Уровень дивергенции нуклеотидных последовательностей генов COI и *cytb* у *P. azonus* и *P. monopterygius* составил соответственно 5.4 и 7.7%. Подобные значения характерны для межвидового уровня (Hebert et al., 2003b; Ward et al., 2005; Картавцев, Ли, 2006; Kartavtsev et al., 2008). Низкий внутривидовой и высокий межвидовой уровень изменчивости нуклеотидных последовательностей генов COI и *cytb* позволяет безошибочно дискриминировать эти виды (Картавцев, Ли, 2006).

Мы проанализировали 4 разных фрагмента генома одноперых терпугов, но, как правило, для надежного определения большинства видов достаточно и одного гена, например фрагмента гена COI, используемого в настоящее время для штрихкодирования организмов различных таксономических групп (Hebert et al., 2003a, 2003b, 2004; Ward et al., 2005; Картавцев, Ли, 2006).

Таким образом, как морфологическими (Соломатов и др., 2009), так и генетическими методами подтверждено проникновение в Японское море северного одноперого терпуга *P. monopterygius*. На примере исследованного материала по этому виду мы хотели продемонстрировать возможность разных методов в определении видовой принадлежности рыб.

В заключение хотелось бы отметить, что в силу разных причин (неразработанность систематики определенной группы рыб, повреждение экземпляров, невозможность сохранения материала и т.д.) исследователям не всегда доступен весь спектр информации о том или ином виде. Поэтому для правильного и надежного определения любого вида необходимо привлечение всего комплекса данных, которые могут характеризовать этот вид. В первую очередь, это подробное морфологическое описание с выделением основных, наиболее характерных признаков данного вида. Любое описание должно содержать информацию о месте поимки, фоновые условия и данные об орудиях лова. Желатель-

но привести рисунок или фотографию. Обнаруженный экземпляр должен быть зафиксирован и сохранен в любой научной коллекции (местных или центральных музеев), что позволит потом легко найти нужный образец. В настоящий момент не лишним будет собрать и генетические пробы. Небольшой кусочек ткани (сердца или скелетных мышц), фиксированный в 96%-ном этиловом спирте, возможно, позволит гарантированно определить животное, когда невозможно сохранить целую рыбу. Наличие фотографии и спиртовой пробы, к примеру, гораздо лучше, чем простое цитирование того, что кто-то где-то поймал тот или иной вид.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Дальневосточного отделения РАН № 09-III-A-06-193.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Антоненко Д.В., Соломатов С.Ф., Калчугин П.В. 2003. Об обнаружении северного одноперого терпуга *Pleurogrammus monopterygius* и окуня-бараменуки *Sebastes baramenike* в водах Приморья (Японское море) // *Вопр. ихтиологии*. Т. 43. № 2. С. 281–282.
- Баланов А.А. 2003. Дополнения к ихтиофауне материкового склона юго-восточного Сахалина (Охотское море) // *Вопр. ихтиологии*. Т. 43. № 1. С. 132–135.
- Борец Л.А. 2000. Аннотированный список рыб дальневосточных морей. Владивосток: Изд-во ТИНРО-центра, 192 с.
- Дудник Ю.И., Золотов О.Г. 2000. Распространение, особенности биологии и промысел одноперых терпугов рода *Pleurogrammus* (Hexagrammidae) в прикурильских водах // *Промыслово-биологические исследования рыб в тихоокеанских водах Курильских островов и прилежащих районах Охотского и Берингова морей в 1992–1998 гг.* М.: ВНИРО. С. 78–90.
- Ильинский Е.Н. 2007. Экспертный метод разделения уловов молоди одноперых терпугов рода *Pleurogrammus* (Hexagrammidae; Scorpaeniformes) в зоне смешения их ареалов // *Изв. Тихоокеан. НИИ рыб. хоз-ва и океанографии*. Т. 148. С. 167–169.
- Картавец Ю.Ф., Ли Ж.С. 2006. Анализ нуклеотидного разнообразия по генам цитохрома *b* и цитохромоксидазы I на популяционном, видовом и родовом уровнях // *Генетика*. Т. 42. № 4. С. 437–461.
- Линдберг Г.У., Красюкова З.В. 1987. Рыбы Японского моря и сопредельных частей Охотского и Желтого морей. Ч. 5. Л.: Наука, 526 с.
- Мельников И.В., Ефимкин А.Я. 2003. Молодь северного одноперого терпуга *Pleurogrammus monopterygius* в эпиэпелагиали глубоководных районов северной части Тихого океана // *Вопр. ихтиологии*. Т. 43. № 4. С. 469–482.
- Рутенберг Е.П. 1962. Обзор рыб семейства терпуговых (Hexagrammidae) // *Тр. Ин-та океанологии АН СССР*. Т. 59. С. 3–100.
- Соломатов С.Ф., Антоненко Д.В., Баланов А.А., Калчугин П.В. 2009. Новые данные о встречаемости северного одноперого терпуга *Pleurogrammus monopterygius* (Hexagrammidae) в Японском море // *Вопр. ихтиологии*. Т. 49. № 1. С. 56–58.
- Таранец А.Я. 1941. О нахождении морского ленка *Pleurogrammus monopterygius* у северо-восточного Сахалина // *Тр. Зоол. музея Моск. гос. ун-та*. Т. 6. С. 305.
- Черешнев И.А., Назаркин М.В. 2004. Первая находка северного одноперого терпуга *Pleurogrammus monopterygius* (Scorpaeniformes: Hexagrammidae) в районе Тауйской губы (северная часть Охотского моря) // *Вопр. ихтиологии*. Т. 44. № 3. С. 375–379.
- Albertson R.C., Markert J.A., Danley P.D., Kocher T.D. 1999. Phylogeny of a rapidly evolving clade: the cichlid fishes of Lake Malawi, East Africa // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. V. 96. P. 5107–5110.
- Amaoka K., Nakaya K., Yabe M. 1995. The fishes of Northern Japan. Sapporo: Kita-Nihon Kaiyo Center Co. Ltd, 390 p.
- Felsenstein J. 1985. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap // *Evolution*. V. 39. P. 783–791.
- Hebert P.D.N., Cywinska A., Ball S.L., deWaard J.R. 2003a. Biological identifications through DNA barcodes // *Proc. Roy. Soc. London. Ser. B. Biol. Sci.* V. 270. P. 313–321.
- Hebert P.D.N., Ratnasingham S., deWaard J.R. 2003b. Barcoding animal life: cytochrome *c* oxidase subunit 1 divergences among closely related species // *Proc. Roy. Soc. London. Ser. B. Biol. Sci.* V. 270. P. 596–599.
- Hebert P.D.N., Penton E.H., Burns J.M. et al. 2004. Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astraptes fulgerator* // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. V. 101. P. 14812–14817.
- Kartavtsev Y.Ph., Sharina S.N., Goto T. et al. 2008. Cytochrome oxidase I gene sequence analysis in six flatfish species (Teleostei, Pleuronectidae) of Far East Russian with inferences in phylogeny and taxonomy // *Mitochondrial DNA*. V. 19. № 6. P. 479–489.
- Kimura M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences // *J. Mol. Evol.* V. 16. P. 111–120.
- Saitou N., Nei M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees // *Mol. Biol. Evol.* V. 4. P. 406–425.
- Sambrook J.F., Fritsch E.F., Maniatis T. 1989. Molecular cloning: a Laboratory manual. 2-nd edit. New-York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1659 p.
- Schander C., Willassen E. 2005. What can biological barcoding do for marine biology? // *Mar. Biol. Res.* V. 1. P. 79–83.
- Smith P.J., Griggs L. 2001. DNA identification of Pacific bluefin tuna (*Thunnus orientalis*) in the New Zealand fishery // *N. Zealand J. Mar. Fresh. Res.* V. 35. P. 843–850.
- Tamura K., Dudley J., Nei M., Kumar S. 2007. MEGA4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0 // *Mol. Biol. Evol.* V. 24. P. 1596–1599.
- Ward R.D., Zemplak T.S., Innes B.H. et al. 2005. DNA barcoding Australia's fish species // *Phil. Trans. Roy. Soc. London. Ser. B. Biol. Sci.* V. 360. P. 1847–1857.
- Yanagimoto T. 2003. Identification of seven greenling species using polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) analysis of mitochondrial DNA // *Nippon Suisan Gakkaishi*. V. 69. № 5. P. 726–732.