

ОБЩАЯ
БИОЛОГИЯ

УДК 597.211+575.17

ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ ГЕНА СУБЪЕДИНИЦЫ I
ЦИТОХРОМОКСИДАЗЫ (COI) мтДНК МИНОГ,
ОТНОСИМЫХ К *LETHENTERON SAMTSCHATICUM*
И *LETHENTERON REISSNERI* COMPLEX,
НЕ ИМЕЮТ РАЗЛИЧИЙ ВИДОВОГО УРОВНЯ

© 2011 г. В. С. Артамонова, А. В. Кучерявый, академик Д. С. Павлов

Поступило 20.12.2010 г.

Исторически в систематике миног важную роль отводили жизненной стратегии. На этом основании в ряде случаев были выделены так называемые сателлитные группы видов [1]. Личинки миног внутри сателлитной группы неразличимы морфологически, но взрослые миноги различаются по ряду признаков (прежде всего, по длине тела). Считается, что после метаморфоза миноги одного вида мигрируют в крупные водоемы (реки, озера, моря, океаны), становятся паразитами костистых рыб и приступают к размножению спустя 0.5–3 года, а особи другого вида не покидают родную реку, становятся половозрелыми спустя 6–10 мес и затем погибают [1–4]. В сателлитную группу входит, как правило, один паразитический анадромный вид и его виды-спутники — непаразитические или паразитические резидентные виды, которые, как полагают, произошли от первого симпатрически [1, 4].

В частности, принято считать, что на Дальнем Востоке обитают паразитическая проходная минога *L. samtschaticum* и симпатрически произошедший от нее вид *L. reissneri*. Изначально считали, что этот вид связан общностью происхождения с *L. japonicum*, однако позже было признано, что вид *L. japonicum* синонимичен виду *L. samtschaticum*, который исторически был описан раньше [5]. Кроме того, по данным некоторых авторов на Дальнем Востоке встречается сибирская непаразитическая минога *L. kessleri* [6], которую относят в настоящее время к той же группе, что *L. samtschaticum* и *L. reissneri*.

В последние годы японские исследователи уделяли большое внимание изучению генетических особенностей жилых непаразитических миног Дальнего Востока [7, 8]. В результате исследования как ядерных, так и митохондриальных мар-

кёров было показано, что на территории Японии и в Южной Корее, помимо *L. samtschaticum*, обитают две уникальные формы миног — *L. sp. N* и *L. sp. S.*, каждой из которых вполне может быть присвоен видовой статус на основании существенных генетических отличий от всех до сих пор изученных миног [7]. В то же время *L. kessleri* и *L. reissneri*, описанные в качестве самостоятельных видов, продемонстрировали столь высокое генетическое сходство как ядерного, так и митохондриального геномов, что было предложено объединить эти виды в единый комплекс — *L. reissneri complex* [8].

Вопрос о генетических различиях между жилыми непаразитическими миногами *L. reissneri complex* и анадромным паразитическим видом *L. samtschaticum* до сих пор не изучен. Между тем он исключительно важен, поскольку не все исследователи согласны с тем, что особенности жизненной стратегии миног имеют наследственную природу [3, 4].

В настоящее время генетическую характеристику вида дают, как правило, на основании нуклеотидной последовательности гена субъединицы I цитохромоксидазы (COI) митохондриального генома (Barcoding). Показано, что в абсолютном большинстве случаев различия по этому локусу, даже между близкородственными видами хордовых, составляют более 2% [9]. В данной работе мы изучили последовательность фрагмента мтДНК длиной 1072 п.н., включающего частичную последовательность гена COI, для жилых и проходных миног одной и той же речной системы — системы р. Утхолок (Западная Камчатка).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Отлов миног во время нереста 2005 и 2006 гг. (май–июнь) проводили на нерестилищах при помощи электролова таким образом, чтобы в анализ попали совместно нерестящиеся особи разных форм. Локализация мест отлова миног

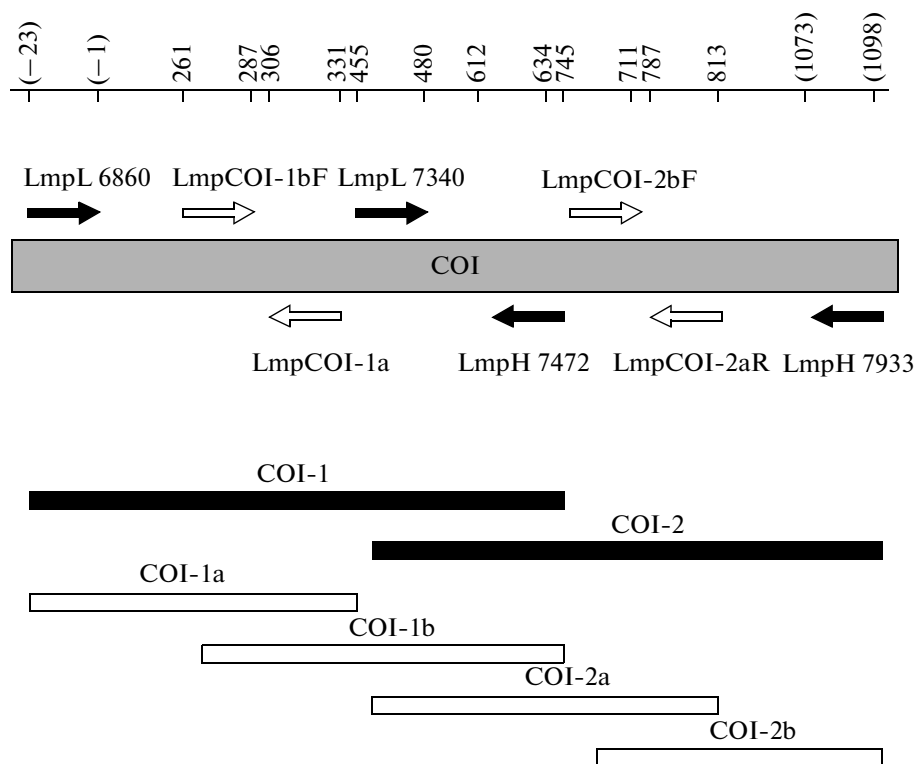


Рис. 2. Схема отжига основных (черные стрелки) и дополнительных (белые стрелки) праймеров в пределах локуса COI мтДНК. Вверху дана условная шкала (без соблюдения масштаба), на которой приведены положения первого и последнего нуклеотида каждого праймера на последовательности, секвенированной в данной работе. Внизу показаны ПЦР-продукты, получаемые при использовании различных пар праймеров (черный цвет — только основных, белый цвет — основных и дополнительных).

ном в настоящей работе, представлена на рис. 2. Последовательности всех праймеров приведены в табл. 2.

Во всех случаях ПЦР-продукты получали на амплификаторе “Терцик” (производство “ДНК-технология”, Москва). Амплификацию проводили в 25 мкл буфера производства фирмы “Fermentas” (75 mM Tris-HCl (pH 8.8), 20 mM (NH₄)₂SO₄, 0.1% Tween 20, 2 mM MgCl₂). Смесь для амплификации содержала около 300 нг тотальной клеточной ДНК, по 200 нмоль каждого из четырех дез-

оксирибонуклеотидов, по 10 пмоль прямого и обратного праймеров и 0.5–0.7 ед. Taq-полимеразы (производство “Бионэм”, Москва). Для предотвращения испарения в ходе реакции сверху на смесь наслаивали минеральное масло. Программа амплификации включала в себя этап первоначальной денатурации ДНК (95°C, 4 мин), 30 циклов синтеза ПЦР-продукта (95°C — 45 с, 54°C — 45 с, 72°C — 1 мин), а также этап конечной элонгации цепи (72°C, 5 мин).

Таблица 2. Праймеры, использованные для получения ПЦР-продуктов и секвенирования локуса COI мтДНК миног

Праймер	Последовательность нуклеотидов	Источник
LmpL 6860	5'-GGCTTTGGCAACTGACTTGTACC-3'	[7]
LmpCOI-1aR	5'-GAGGACTGCAGTAATTTAAACGGATC-3'	В этой работе
LmpCOI-1bF	5'-TAAARCCYCCAACATAACACAATACC-3'	В этой работе
LmpH 7472	5'-TACTGTGAATATGTGRTGGGCTC-3'	[7]
LmpL 7340	5'-TGATTTTTTGGTCACCCTGAAGTTTA-3'	[7]
LmpCOI-2aR	5'-CCGGTRAGTCCYCCTACAGTRAATAAG-3'	В этой работе
LmpCOI-2bF	5'-ATGACACACCCCCATACTATGRGC-3'	В этой работе
LmpH 7933	5'-CATGTAGTGTATGCATCAGGGTARTC-3'	[7]

Таблица 3. Положение переменных нуклеотидов в последовательности локуса COI мтДНК у миног бассейна р. Утхолок

Видовая принадлежность особей по комплексу морфологических и экологических признаков	Положение переменного нуклеотида					№ последовательности в GenBank
	304	451	775	1036	1057	
<i>L. camtschaticum</i>	A	G	A	T	A	HQ686281
<i>L. camtschaticum</i> (smolt)	T	A	A	T	G	HQ686282
<i>L. camtschaticum</i>	T	G	A	T	A	HQ686283
<i>L. camtschaticum</i>	A	G	A	T	A	HQ686284
<i>L. reissneri</i> complex	T	G	A	T	A	HQ686285
<i>L. camtschaticum</i>	T	G	A	T	G	HQ686286
<i>L. camtschaticum</i>	T	G	A	T	A	HQ686287
<i>L. camtschaticum</i>	T	G	A	T	G	HQ686288
<i>L. camtschaticum</i>	T	G	A	T	G	HQ686289
<i>L. camtschaticum</i>	T	G	A	T	G	HQ686290
<i>L. reissneri</i> complex	T	G	A	T	A	HQ686291
<i>L. reissneri</i> complex	T	G	A	T	A	HQ686292
<i>L. reissneri</i> complex	T	G	A	T	A	HQ686293
<i>L. reissneri</i> complex	T	G	A	T	A	HQ686294
<i>L. reissneri</i> complex	A	G	A	T	A	HQ686295
<i>L. reissneri</i> complex	A	G	A	T	A	HQ686296
<i>L. reissneri</i> complex	T	A	A	T	G	HQ686297
<i>L. reissneri</i> complex	T	G	A	T	G	HQ686298
<i>L. reissneri</i> complex	T	G	A	C	G	HQ686299
<i>L. reissneri</i> complex	T	G	A	T	A	HQ686300
<i>L. reissneri</i> complex	A	G	A	T	A	HQ686301
<i>L. sp.</i> (ammocoet)=(<i>L. reissneri</i> complex)	T	G	A	T	A	HQ686302
<i>L. sp.</i> (ammocoet)=(<i>L. reissneri</i> complex)	A	G	A	T	A	HQ686303
<i>L. sp.</i> (ammocoet)=(<i>L. reissneri</i> complex)	T	G	A	T	A	HQ686304
<i>L. sp.</i> (ammocoet)=(<i>L. reissneri</i> complex)	T	G	A	T	A	HQ686305
<i>L. sp.</i> (ammocoet)=(<i>L. reissneri</i> complex)	T	G	G	T	G	HQ686306

Полученные ПЦР-продукты пересаживали при комнатной температуре, добавляя к смеси для амплификации этанол до конечной концентрации 70% и ацетат аммония до конечной концентрации 125 мМ. Осадок ДНК промывали 70%-ным этанолом, высушивали и растворяли в бидистиллированной воде.

В реакцию секвенирования брали около 0.3 пмоль ПЦР-продукта и 3.2 пмоль соответствующего праймера. Каждый полученный ПЦР-продукт секвенировали как с прямого, так и с обратного праймера. Секвенирование ДНК проводили с помощью набора реактивов ABI PRISM® BigDye™ Terminator v. 3.1 с последующим анализом продуктов реакции на автоматическом секвенаторе ДНК ABI PRISM 3730 Applied Biosystems на базе Межинститутского Центра коллективного пользования “ГЕНОМ” ИМБ РАН.

Результаты секвенирования анализировали с использованием программы BioEdit v 7.0.5 [10].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Все секвенированные последовательности представлены в Международной базе данных GenBank. Номера последовательностей приведены в табл. 3 наряду с их характерными особенностями.

Полноразмерная последовательность локуса COI мтДНК имела длину 1072 п.н. для всех секвенированных образцов, причем последовательности отличались между собой заменами не более чем трех нуклеотидов одновременно, т.е. менее чем на 0.3 %. В целом на секвенированном участке было выявлено пять переменных нуклеотидов, что составляет менее 0.5% длины последовательности. Последовательность, которая встречалась у миног бассейна р. Утхолок наиболее часто

5'-	TATAATACTT	AGCGCCCCTG	ATATAGCCTT	CCCACGTATA	AATAACATAA
51	GCTTTTGACT	GCTCCACCA	TCCCTACTCT	TACTTTTAGC	TTCCGCAGGA
101	GTTGAAGCAG	GAGCCGGAAC	TGGATGAACA	GTATACCCAC	CTCTAGCAGG
151	AAATTTAGCC	CACACAGGGG	CCTCTGTTGA	CTTAACAATT	TTCTCCCTTC
201	ATCTAGCCGG	TATTTTCATCA	ATCCTTGGGG	CAGTCAACTT	TATTACAACA
251	ATTTTAAACA	TAAAACCTCC	AACATAACA	CAATACCAAA	CCCCATTATT
301	TGT□TGATCC	GTTTAAATTA	CTGCAGTCCT	CCTTCTTCTA	TCACTTCCTG
351	TACTTGCAGC	TGCCATCACT	ATACTTTTAA	CAGATCGTAA	TTTAAATACA
401	TCCTTCTTTG	ACCCTGCAGG	AGGAGGAGAC	CCAATCCTTT	ACCAACACCT
451	□TTCTGATTC	TTTGGGCACC	CTGAAGTTTA	TATTCTAATT	TTACCAGGCT
501	TTGGAATTAT	CTCTCACGTA	GTCGCCTACT	ACTCCGGGAA	AAAAGAACCA
551	TTTGGATATA	TAGGAATAGT	CTGAGCAATA	ATAGCCATTG	GGTTACTAGG
601	GTTTATTGTA	TGAGCCCACC	ACATATTCAC	GGTAGGAATA	GATGTTGACA
651	CACGAGCCTA	CTTTACATCA	GCCACAATAA	TTATTGCTAT	TCCAACAGGA
701	GTTAAAGTCT	TTAGCTGACT	AGCCACACTC	CATGGCGGAA	AAATCGTGTG
751	ACACACCCCC	ATACTATGAG	CCCTAGGCTT	CATTTTCTTA	TTTACTGTAG
801	GGGGACTTAC	CGGAATTGTC	TTATCCAAC	CATCACTAGA	TATTATCCTT
851	CATGATACTT	ATTATGTAGT	AGCTCACTTC	CATTATGTAT	TATCTATAGG
901	AGCTGTTTTT	GCAATCATAG	CTGGCTTCGT	TCATTGATTC	CCACTATTTA
951	CAGGATATAC	ACTTAACGAA	ACCTGATCAA	AAGCACACTT	TGTCATTATA
1001	TTTACTGGTG	TAAATCTTAC	ATTCTTCCCT	CAACA□TTCC	TAGGTTTAGC
1051	TGGTAT□CCA	CGACGTTACT	CA -3'		

Рис. 3. Вариант последовательности локуса COI мтДНК, наиболее распространенный у миног бассейна р. Утхолок. В рамках — нуклеотиды, которые могут меняться в последовательностях некоторых особей этой водной системы.

(11 из 26), приведена на рис. 3. В рамках — нуклеотиды, находящиеся в тех позициях, в которых у некоторых миног встречались нуклеотидные замены.

В группе проходных миног, состоящей из девяти особей, было зарегистрировано четыре различных гаплотипа COI мтДНК, в группе из 12 производителей жилой формы — пять гаплотипов, а у пяти пескороек, относящихся к *L. reissneri complex*, было выявлено три варианта последовательности.

Все гаплотипы, обнаруженные у анадромных особей, встречались также и у резидентных производителей миног. Один гаплотип, обнаруженный у производителя жилой формы, в других группах особей не встречался, как и один из гаплотипов, обнаруженных у одной из пескороек жилой формы. В этой последней группе два других гаплотипа были общими для всех изученных групп. Все нуклеотидные замены для локуса COI мтДНК конкретных особей, проанализированных в настоящей работе, отражены в табл. 3.

Таким образом, оказалось, что проанализированный фрагмент мтДНК не содержит ни одного нуклеотида, специфичного для жилой или проходной форм миног р. Утхолок, т.е. различия видового уровня между жилыми и проходными миногами бассейна р. Утхолок отсутствовали. При этом число выявляемых гаплотипов также зависело не от принадлежности группы особей к той

или иной форме, а от величины изученной выборки. Ведь наряду с тремя часто встречающимися гаплотипами, доли которых составили 42, 23 и 19%, у миног р. Утхолок выявлены три редких гаплотипа, присутствовавших в 4–8% случаев, т.е. встретившиеся нам всего 1–2 раза. С учетом этого обстоятельства выявленное разнообразие вариантов COI мтДНК внутри отдельных групп миног р. Утхолок практически совпадало у жилой и проходной форм, причем доля вариативных нуклеотидов была низкой.

Следует отметить, что полученные данные о том, что виды *L. camtschaticum* и *L. reissneri complex*, вероятно, не являются генетически самостоятельными, не противоречат данным, полученным ранее другими авторами [8]. Так, идентичные гаплотипы COI мтДНК были обнаружены у одной из особей, отнесенных к виду *L. kessleri* из р. Берая (приток р. Найба, о. Сахалин), и у двух особей с Японских островов, отнесенных к виду *L. camtschaticum* (в оригинальной работе — *L. japonicum*). При этом весьма вероятно, что это именно тот гаплотип COI мтДНК, который наиболее часто встречается у миног бассейна р. Утхолок. Во всяком случае последовательности длиной 1009 п.н., приведенные для упомянутых выше особей в международной базе данных GenBank (AB198751, AB198746, AB198747), полностью совпадают одна с другой, а также с последовательностью, представленной в данной работе

на рис. 3 — в той части, которая является общей для всех последовательностей (участок мтДНК, секвенированный нами, содержит 26 дополнительных нуклеотидов на 5'-конце и 37 дополнительных нуклеотидов на 3'-конце, причем среди них есть переменные).

Также обращает на себя внимание тот факт, что в работах, содержащих филогенетические построения, различия между миногами, относящимися к *L. samtschaticum* и *L. reissneri* complex, на приводимых дендрограммах всегда незначимы [4, 8, 11], несмотря на то, что в них сравнивают последовательности митохондриальной ДНК локусов COI и *cyt b* представителей *L. samtschaticum*, *L. kessleri* и *L. reissneri* из географически удаленных точек.

Результаты, полученные в настоящем исследовании, подкрепляют гипотезу о принадлежности жилых и проходных миног бассейна р. Утхолок к одному виду (*L. samtschaticum*). Данная гипотеза была высказана ранее на основании перекрывания морфологических признаков, считающихся видовыми, у разных форм миног [3], а также наблюдений совместного нереста особей жилой и проходной формы [2]. Таким образом, полученные данные могут служить аргументом в пользу предположения о том, что особенности жизненной стратегии миног имеют в основном наследственную природу и в значительной степени определяются факторами среды.

Авторы благодарят А.А. Махрова (ИПЭЭ РАН) за помощь в подборе литературы и ценные замечания.

Работа поддержана грантом Президента Российской Федерации для молодых российских ученых МК-1392.2009.4 и грантом РФФИ 11-04-00697-а.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Hardisty M.W.* Life Without Jaws. Ceredigion: Forrest, 2006. 272 p.
2. Кучерявый А.В., Савваитова К.А., Груздева М.А., Павлов Д.С. // Вопр. ихтиологии. 2007. Т. 47. № 4. С. 462–466.
3. Кучерявый А.В., Савваитова К.А., Павлов Д.С. и др. // Вопр. ихтиологии. 2007. Т. 47. № 1. С. 42–57.
4. *Docker M.F.* // Amer. Fish. Soc. Symp. 2009. V. 72. P. 71–114.
5. Бозуцкая Н.Г., Насека А.М. Каталог бесчелюстных и рыб пресных и солоноватых вод России с номенклатурными и таксономическими комментариями. М.: КМК, 2004. 389 с.
6. Атлас пресноводных рыб России / Под ред. Ю.С. Решетникова. М.: Наука, 2002. Т. 1. 379 с.
7. *Yamazaki Y., Goto A., Nishida M.* // J. Fish Biol. 2003. V. 62. P. 591–609.
8. *Yamazaki Y., Yokoyama R., Nishida M., Goto A.* // J. Fish Biol. 2006. V. 68. Suppl. B. P. 251–269.
9. *Hebert P.D.H., Ratnasingham S., deWaard J.R.* // Proc. R. Soc. London. B. Suppl. 2003. V. 270. P. S96–S99.
10. *Hall T., Therapeutics I.* Biological Sequence Alignment Editor for Win 95/98/NT/2K/XP. Electron. resource. BioEdit Vers. 7.0.5. <http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>
11. *Lang N.J., Roe K.J., Renaud C.B., et al.* // Amer. Fish. Soc. Symp. 2009. V. 72. P. 41–55.