

УДК 597-556:35.575.17

РАЗРАБОТКА ПАНЕЛЕЙ МИКРОСАТЕЛЛИТНЫХ МАРКЕРОВ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ СТРУКТУРЫ КАМБАЛЫ-КАЛКАН *SCOPHTHALMUS MAEOTICUS*

Н. А. Небесихина, Н. А. Бессонова

Азовский научно-исследовательский институт рыбного хозяйства (ФГБНУ «АзНИИРХ»),
Ростов-на-Дону 344000, Россия

E-mail: nebesihina_n_a@azniirkh.ru; nabessonova79@gmail.com

Аннотация. Было проанализировано девять локусов камбалы-калкан *Scophthalmus maeoticus*, которые тестировались на трех выборках (Крымский промысловый район Черного моря, Кавказский промысловый район Черного моря, Азовское море) с целью отработки панели микросателлитных маркеров.

Ключевые слова: камбала-калкан *Scophthalmus maeoticus*, генетическая структура, микросателлитные локусы (STR)

DEVELOPMENT OF MICROSATELLITE MARKER PANELS FOR THE STUDY OF THE BLACK SEA TURBOT *SCOPHTHALMUS MAEOTICUS* GENETIC STRUCTURE

N. A. Nebesikhina, N. A. Bessonova

Azov Sea Research Fisheries Institute (FSBSI "AzNIIRKH"), Rostov-on-Don 344000, Russia

E-mail: nebesihina_n_a@azniirkh.ru; nabessonova79@gmail.com

Abstract. Nine loci of the Black Sea turbot *Scophthalmus maeoticus*, which were tested on three samples (the Crimean fishing area of the Black Sea, the Caucasian fishing area of the Black Sea, the Sea of Azov) were analyzed with the purpose of elaboration of a microsatellite marker panel.

Keywords: the Black Sea turbot *Scophthalmus maeoticus*, genetic structure, microsatellite loci (short tandem repeats — STRs)

ВВЕДЕНИЕ

Камбала-калкан *S. maeoticus* встречается в Черном море, в южной и реже в северной части Азовского моря. Отмечается в Босфоре (в Мраморном море вид не отмечен), в восточной части Средиземного моря и в Адриатическом море, входит в устья рек (Днепр, Днестр). Камбалы рода *Scophthalmus* являются одним из наиболее важных в мировом рыбоводстве и перспективных для отечественной практики искусственного воспроизводства и товарной аквакультуры видов водных биоресурсов. Камбала-калкан (*S. maeoticus*) является одной из наиболее ценных промысловых видов рыб Черного моря, где, не совершая протяженных миграций, образует отдельные локальные сообщества. Зарубежные авторы не выделяют *S. maeoticus* в отдельный вид. Подробные филогенетические исследования семейства Scophthalmidae (Chanet, 2003) показали, что *S. maeoticus* конспецифичен с *S. maximus*. Однако это таксономическое решение не было принято всеми исследователями, изучающими эти виды. Азовская же популяция камбалы-калкан современным научным сообществом рассматривается как подвид черноморской камбалы-калкан.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Материалом исследований послужили выборки камбалы-калкан *S. maeoticus*, входящие в «Каталог коллекции тканей камбалы-калкан *Scophthalmus maeoticus* для молекулярно-генетического анализа» (свидетельство о государственной регистрации базы данных № 2016620005 от 11.01.2016 г). Для первичного анализа были отобраны три выборки, приуроченные к Кавказскому и Крымскому промысловым районам в Черном море и району Азовского моря.

Выделение ДНК проводили параллельно по двум методикам: методом солевой экстракции (Aljanabi et al., 1999) и методом абсорбции на колонках (PALL) (Ivanova N.V. et al., 2006) из плавников, хранившихся в 96 % этаноле. STR-генотипирование проводили по 9 микросателлитным локусам (3/9 CA 15, Sma1-125 INRA, Sma-02, Sma 3-12 INRA, Sma-USC26, Sma-C09, Sma-E52, Sma-E79, Sma-E191) с ди-, три- и тетра-нуклеотидными повторяющимися последовательностями. Четыре из них уже обрабатывались прежде на *S. maeoticus*, остальные пять ранее использовались при анализе большого ромба, или камбалы-тюрбо, *Scophthalmus maximus* средиземноморской и атлантической популяций (Estoup A. et al., 1998; Iyengar A. et al., 2000; Bouza C. et al., 2002; Pardo B.G. et al., 2006; Chen S.L. et al., 2007; Navajas Pérez R. et al., 2012). В табл. 1 указаны основные характеристики используемых локусов.

Таблица 1

Характеристика микросателлитных локусов для генотипирования камбалы-калкан

Локус	Последовательность	Метка	Повторяющаяся	Размерный
3/9CA15	F: AGAGTGAAGAACGTACCTGC	HEX	(CA) ₁₅	229–249
	R: CAATGGAGAGGCAGTATCGG			
Sma1-125INRA	F: CACACCTGACAAAGCTCAAC	TAMRA	(TAGA) ₁₁ -(TG) ₄	118–146
	R: GCTGAACATTTTCATGTTGATAG			
Sma-02	F: GGAGGATGTATTGAAAGTGT	FAM	(TG) ₁₆	93–151
	R: AGAGCAGGTCATTATACAGC			
Sma3-12INRA	F: CACAATTGAATCACGAGATG	HEX	(TG) ₂₁	91–107
	R: GCCACCACTGCGTAAACAC			
Sma-USC26	F: TCAAACCAACGGACTAACAACA	TAMRA	(TATC) ₁₂	226–282
	R: CTTCATTACCAGCCCATCAAAGT			
Sma-C09	F: CGACCCGCCCCTACAGGAT	HEX	(TC) ₁₃ TA(TC) ₂	211–291
	R: AGCGACAGCAACGCACCAAG			
Sma-E52	F: CTCGATGATGTGCCAGAAGA	FAM	(TAT) ₄	305–308
	R: GAGAGAGAAGCGGAACAGGA			
Sma-E79	F: GCAGCGACTTGCTTCTTTCT	HEX	(GT) ₆ -(AT) ₁₄ - (GT) ₉ -(TA) ₇	231–309
	R: GTCAGTTTGTGGTGTGTGGG			
Sma-E191	F: GGAGGGCGAAGAAGAAGAAG	FAM	(CGA) ₄	273–279
	R: GCTGCTCCAGTCTGCGTT			

Для проведения ПЦР-амплификации локусы Sma1-125INRA, Sma-02, Sma3-12INRA, Sma-USC26 были объединены в мультиплекс, остальные локусы амплифицировали каждый по отдельности. Для визуализации же ПЦР-продукты объединялись, кроме ПЦР-продуктов по локусам 3/9CA15 и Sma C09, которые визуализировались отдельно из-за их пересекающихся диапазонов. Каждую ПЦР выполняли в 13 мкл реакционной смеси, содержащей 50–100 нг ДНК; по 1 пкМ меченых флуоресцентным красителем прямых праймеров, по 4 пкМ обратных (не меченых) праймеров; 1x Taq Turbobuffer Mgfree (Evrogen); 2 m MМg Cl₂ (ООО «НПФ Синтол»); 0,8 единиц HSTaq DNA Polymerase (Evrogen) и 0,2 m M dNTPMix (Thermo Scientific). Для проведения реакции использовали режим амплификации Touch-Down: предварительная денатурация ДНК — 1 мин при 94 °С; 8 циклов: плавление — 20 с при 95 °С, отжиг праймеров — 25 с при 58 °С в первом цикле со снижением в каждом последующем цикле на 0,5 °С, синтез ДНК — 40 с при 65 °С; 25 циклов: плавление — 20 с при 95 °С, отжиг праймеров — 25 с при 54 °С, синтез ДНК — 40 с при 65 °С; цикл досинтеза ДНК — 10 мин при 65 °С. Продукты амплификации разделяли с помощью капиллярного электрофореза на устройстве секвенирования ДНК Нанофор 05 (ЭЗАН, Россия). Полученные первичные

данные обрабатывали с помощью программы «ДНК ФА» (ООО «НПФ Синтол»). Статистическую обработку данных проводили в пакетах программ GenAlEx v. 6 (Peakall, Smouse, 2006), FSTAT v. 2.9.3.2 (Goudet, 2002), FreeNA (Chapuis, Estoup, 2007).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Из 9 апробированных локусов один (Sma-E52) в выборках черноморской камбалы-калкан проявил себя как мономорфный локус с единственным аллельным вариантом — 308 пн, а у 3 % рыб азовской выборки отмечался аллель с размером 305 пн. Размеры аллелей в этих исследованиях показали совпадения с данными других исследований (Karan S. et al., 2016; Estoup A. et al., 1998; Iyengar A. et al., 2000; Bouza C. et al., 2002; Pardo B.G. et al., 2006; Chen S.L. et al., 2007; Navajas Pérez R. et al., 2012), за исключением локуса 3/9 CA15. Размеры аллелей локуса 3/5 CA15 находятся в интервале между 165 и 197 пн (Karan S. et al., 2016), однако в настоящем исследовании размеры аллелей локуса 3/9 CA15 варьировались от 229 до 249 пн. Локус Sma C09 был исключен из общего анализа из-за его плохой амплификабельности — при визуализации отмечались две формы аллелей: в виде одного пика (норма) и множество пиков (в виде гребня) (рис. 1).

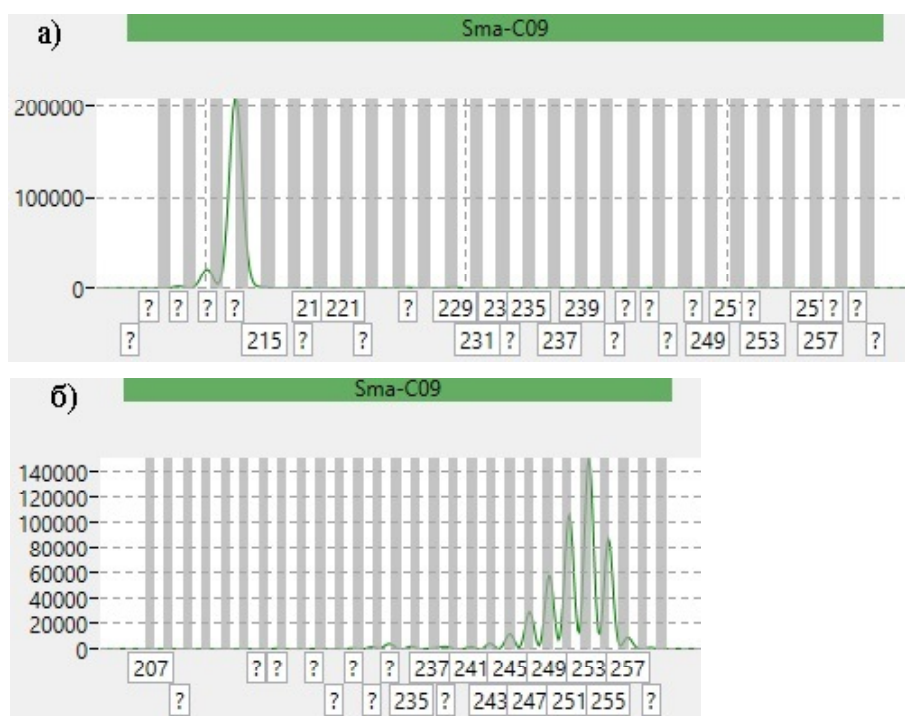


Рис. 1. Электрофореграмма микросателлитного локуса Sma C09
а) нормальная форма аллеля; б) форма аллеля в виде гребня

Причин возникновения таких паттернов названо несколько (Miller, Yuan, 1997).

В итоге для предварительного анализа генетической структуры выборок камбалы-калкан было отобрано 8 полиморфных локусов. Результаты статистического анализа изменчивости камбалы-калкан по 8 микросателлитным локусам представлены в табл. 2. У 96 особей камбалы-калкан из 3 выборок был выявлен 71 аллель. Наиболее изменчивым оказался локус Sma-E79 с максимальным количеством аллелей (19), а наименее изменчивым — локус Sma-E52 с 2 аллельными вариантами. Минимальная длина аллеля 91 пн выявлена в локусе Sma 3-12 INRA, максимальная длина — 317 пн в локусе Sma-E79. Эффективное число аллелей на локус в исследованных выборках камбалы-калкан варьировало от 1 до 5,67. Наибольший размерный диапазон аллелей (231–309 пн) характерен для локуса Sma-E79, наименьший — для локуса Sma-E52 (305–308 пн). Величина ожидаемой гетерозиготности в 3 выборках камбалы-калкан находилась в диапазоне 0,031 (Sma-E52) — 0,824 (Sma-USC26). Величина средней ожидаемой гетерози-

Таблица 2

Оценка генетического разнообразия камбалы-калкан в Азово-Черноморском бассейне

Район выборки	Локус	N	Na	Ne	Ho	He	F	Null
Кавказский	3/9 CA15	31	8	3,647	0,71	0,726	0,022	0,00001
	Sma1-125INRA	31	9	4,565	0,806	0,781	-0,033	0,00001
	Sma-02	31	7	2,177	0,323	0,541	0,403***	0,14734
	Sma 3-12 INRA	32	6	2,86	0,719	0,65	-0,105	0,00000
	Sma-USC 26	31	8	5,67	0,613	0,824	0,256***	0,12577
	Sma-E52	30	1	1	0	0	#Н/Д	0,00100
	Sma-E79	32	8	2,118	0,344	0,528	0,349***	0,14670
	Sma-E191	32	3	2,713	0,344	0,631	0,456**	0,17883
Азовское море	3/9CA15	31	5	2,73	0,581	0,634	0,084	0,00759
	Sma1-125INRA	32	7	2,947	0,781	0,661	-0,183	0,00000
	Sma-02	32	6	1,858	0,156	0,462	0,662***	0,24119
	Sma3-12INRA	32	6	2,354	0,688	0,575	-0,195	0,00000
	Sma-USC26	32	7	5,095	0,531	0,804	0,339**	0,14926
	Sma-E52	32	2	1,032	0,031	0,031	-0,016	0,00006
	Sma-E79	32	13	5,375	0,25	0,814	0,693***	0,31641
	Sma-E191	32	3	2,073	0,219	0,518	0,577**	0,19276
Крымский	3/9CA15	29	6	3,253	0,793	0,693	-0,145	0,00000
	Sma1-125INRA	31	6	3,32	0,806	0,699	-0,154	0,00000
	Sma-02	32	4	2,202	0,313	0,546	0,428*	0,15531
	Sma3-12INRA	32	7	3,531	0,719	0,717	-0,003	0,00001
	Sma-USC26	32	9	5,611	0,656	0,822	0,201	0,08229
Крымский	Sma-E52	29	1	1	0	0	#Н/Д	0,00100
	Sma-E79	31	9	2,272	0,161	0,56	0,712***	0,26358
	Sma-E191	31	3	2,253	0,29	0,556	0,478***	0,18756

Примечания: N — размер выборки; Na — количество различных аллелей; Ne — количество эффективных аллелей; Ho — наблюдаемая гетерозиготность; He — ожидаемая гетерозиготность; F — индекс фиксации (коэффициент инбридинга); Null — частота нуль-аллелей; уровень достоверности * P < 0,05, ** P < 0,01, *** P < 0,001.

гетерозиготности в популяциях камбалы-калкан Черного моря (Кавказский район $U_{He} = 0,625 \pm 0,088$ и Крымский район $U_{He} = 0,617 \pm 0,087$) и популяциях Азовского моря ($U_{He} = 0,612 \pm 0,089$) находились на одном уровне, что указывает на одинаковую степень генетического разнообразия в данных популяциях. В некоторых локусах было зафиксировано преобладание показателей наблюдаемой гетерозиготности (Ho) над ожидаемой (He), соответственно внутривидовой коэффициент инбридинга (F) принимает в этих случаях отрицательные значения. А по другим локусам наоборот отмечалось значительное преобладание гетерозигот. В крымской и азовской выборках по некоторым локусам наблюдались статистически значимые отклонения от равновесия Харди-Вайнберга. Отклонение от равновесия Харди-Вайнберга может возникать в естественных популяциях в силу ряда причин: действие отбора, инбридинг, смесь нескольких популяций, в которых отличаются частоты аллелей, наличие нуль-аллелей. Отмечающийся недостаток гетерозигот по локусам Sma-02 и Sma-E79 у камбалы-калкан четко коррелирует с наличием нуль-аллелей, значения которых поддерживается высоким уровнем достоверности ($P < 0,001$). Нуль-аллели в большей степени фиксируются у широко распространенных видов в различных их популяциях, что указывает на высокий уровень дифференциации между ними (Charuis, 2008).

Обращает на себя внимание наличие у камбалы-калкан большого числа частных аллелей — 28 (рис. 2). Частота встречаемости, не превышающая 5 % порог, регистрировалась у большинства частных аллелей (26). Информативных аллелей (частотой встречаемости выше 15 %) выявлено не было.

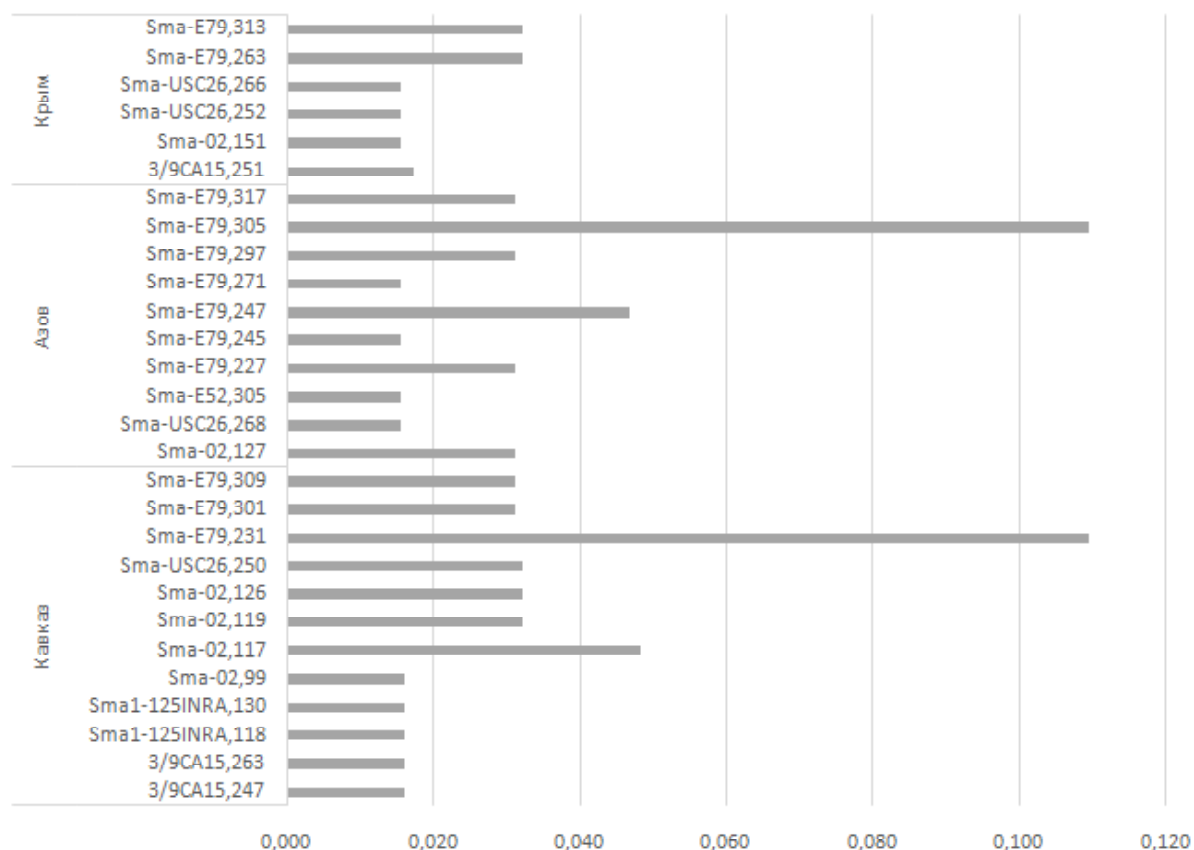


Рис. 2. Частота встречаемости частных аллелей в микросателлитных локусах у камбалы-калкан из различных популяций Азово-Черноморского бассейна

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты исследований 9 локусов камбалы-калкан *S. maeoticus*, которые тестировались на выборках из трех популяций (Крымский промысловый район Черного моря, Кавказский промысловый район Черного моря, Азовское море) с целью отработки ряда микросателлитных маркеров, позволили отобрать 8 локусов для дальнейшего анализа генетической структуры выборок камбалы-калкан. Высокое значение нуль-аллелей по некоторым локусам свидетельствует о том, что эти локусы следует исключить из анализа, однако в дальнейшем следует проверить их на более репрезентативной выборке.

БЛАГОДАРНОСТИ

Благодарность Н.Е. Бойко, С.А. Негоде и сотрудникам Керченского филиала ФГБНУ «АзНИИРХ» за содействие в отборе проб.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Aljanabi Salah M., Martinez I.* Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques // *Nucleic Acids Res.* 1999. Vol. 25. No. 22. Pp. 4692–4693.
- Bouza C., Presa P., Castro J., Sánchez L., & Martínez P.* All ozyme and microsatellite diversity in natural and domestic populations of turbot (*Scophthalmus maximus*) in comparison with other Pleuronectiformes // *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences.* 2002. Vol. 59. No. 9. Pp. 1460–1473.
- Chanet B.* Interrelationships of scophthalmid fishes (Pleuronectiformes: Scophthalmidae) // *Cybium.* 2003. Vol. 27. No. 4. Pp. 275–286.
- Chapuis M.-P., M. Lecoq, Y. Michalakakis, A. Loiseau, G.A. Sword, S. Piry and A. Estoup.* Do outbreaks affect genetic population structure. A worldwide survey in *Locustamigratoria*, a pest plagued by microsatellite null alleles. *Molecular Ecology.* 17(16). 2008. Pp. 3640–3653.

- Chapuis M.P. and A. Estoup.* Microsatellite null alleles and estimation of population differentiation. *Mol. Biol. Evol.* 2007. 24(3). Pp. 621–631.
- Chen S.L., Ma H.Y., Jiang Y., Liao X.L. & Meng L.* Isolation and characterization of polymorphic microsatellite loci from an EST library of turbot (*Scophthalmus maximus*) and cross-species amplification // *Molecular Ecology Notes*. 2007. Vol. 7. No. 5. Pp. 848–850.
- Estoup A., Rousset F., Michalakis Y., Cornuet J. M., Adriamanga M., Guyomard R.* Comparative analysis of microsatellite and allozyme markers: a case study investigating microgeographic differentiation in brown trout (*Salmo trutta*) // *Molecular Ecology*. 1998. Vol. 7. No. 3. C. 339–353.
- Goudet J.* FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices, version 2.9.3.2 [Electronic resource]. 2002. URL://www2.unil.ch/popgen/softwares/fstat.htm
- Ivanova N.V., de Waard J., Hebert P.D.N.* An inexpensive, automation-friendly protocol for recovering high-quality DNA // *Mol. Ecology Notes*. 2006. Vol. 6. Pp. 998–1002.
- Iyengar A., Piyapattanakorn S., Heipel D.A., Stone D.M., Howell B.R., Child A.R. & Maclean N.* A suite of highly polymorphic microsatellite markers in turbot (*Scophthalmus maximus* L.) with potential for use across several flatfish species // *Molecular Ecology*. 2000. Vol. 9. No. 3. Pp. 368–371.
- Karan S., Dođdu S.A., Uyan A., Gürlek M., Ergüden D., & Turan C.* Microsatellite loci for Black Sea turbot *Scophthalmus maeoticus*. *Natural and Engineering Sciences*. 2016. 1(3). Pp. 23–26.
- Miller M.J., Yuan B.Z.* Semiautomated resolution of overlapping stutter patterns in genomic microsatellite analysis // *Analytical biochemistry*. 1997. Vol. 251. No. 1. Pp. 50–56.
- Navajas-Pérez R., Robles F., Molina-Luzón M.J., De La Herran R., Álvarez Dios J.A., Pardo B.G., Vera M., Bouza C., Martínez P.* Exploitation of a turbot (*Scophthalmus maximus* L.) immune-related expressed sequence tag (EST) database for microsatellite screening and validation // *Molecular ecology resources*. 2012. Vol. 12. No. 4. Pp. 706–716.
- Pardo B.G., Hermida M., Fernández C., Bouza C., Pérez M., Llavona A., Sánchez L., Martínez P.* A set of highly polymorphic microsatellites useful for kinship and population analysis in turbot (*Scophthalmus maximus* L.) // *Aquaculture research*. 2006. Vol. 37. No. 15. Pp. 1578–1582.
- Peakall R. and Smouse P.E.* GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research // *Molecular Ecology Notes*. 2006. No. 6. Pp. 288–295.