

ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО ПО РЫБОЛОВСТВУ
ВСЕРОССИЙСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ
РЫБНОГО ХОЗЯЙСТВА И ОКЕАНОГРАФИИ (ФГБНУ «ВНИРО»),
АЗОВО-ЧЕРНОМОРСКИЙ ФИЛИАЛ ФГБНУ «ВНИРО» («АЗНИИРХ»)



ТРУДЫ АЗНИИРХ

Том 2

Ростов-на-Дону
2019

УДК 639.2/3+628.394.6(262.54+263.5)

ББК 47.2

Труды АзНИИРХ: сборник научных трудов печатается согласно решению Редакционно-издательского совета (РИС) ФГБНУ «АзНИИРХ» от 19 января 2016 г. № 1

Периодическое издание выходит 1 раз в 2 года

Т 782

Труды АзНИИРХ / Отв. редактор В.Н. Белоусов. — Ростов-н/Д.: Азово-Черноморский филиал ФГБНУ «ВНИРО» («АзНИИРХ»), 2019. — Том 2. — 228 с.

В сборнике научных трудов рассмотрены вопросы комплексного использования биоресурсов, аквакультуры, биологические основы воспроизводства ценных промысловых рыб в Азово-Черноморском рыбохозяйственном бассейне, а также проблемы экологии и природоохраны рыбохозяйственных водоемов.

Ответственный редактор: к.б.н. В.Н. Белоусов

Редакционная коллегия:

к.б.н. В.А. Лужняк, к.б.н. Т.О. Барабашин, к.б.н. Л.А. Бугаев, Г.В. Ермолаева

Редактор: Е.А. Савчук

ISSN 2587-5949

ОЦЕНКА ГЕНЕТИЧЕСКОГО РАЗНООБРАЗИЯ ПОПУЛЯЦИИ КАМБАЛЫ-КАЛКАН *SCOPHTHALMUS MAEOTICUS*

Н. А. Бессонова, Н. А. Небесихина

Всероссийский научно-исследовательский институт рыбного хозяйства и океанографии (ФГБНУ «ВНИРО»),
Азово-Черноморский филиал ФГБНУ «ВНИРО» («АзНИИРХ»), Ростов-на-Дону
E-mail: nabessonova79@gmail.com

Аннотация. В Российской Федерации одним из наиболее важных для рыбоводства и перспективных для отечественной практики искусственного воспроизводства видов водных биоресурсов является камбала-калкан *Scophthalmus maeoticus* (Pallas, 1814). Именно камбала-калкан черноморская и камбала-калкан азовская будут использоваться в ближайшее время для формирования ремонтно-маточных стад производителей и получения потомства. Для этой цели было проанализировано восемь локусов камбалы-калкан *Scophthalmus maeoticus*, которые тестировались на трех выборах (Крымский промысловый район Черного моря, Кавказский промысловый район Черного моря, Азовское море). Методы исследования включают в себя отбор проб, выделение ДНК колоночным методом, постановку ПЦР, последующий анализ полученного ПЦР-продукта в генетическом анализаторе «Нанофор-05» и статистическую обработку материала в программах FreeNa, GenAEx. В результате анализа была определена величина средней ожидаемой гетерозиготности, число приватных аллелей, изменчивость исследуемых локусов, отклонение от равновесия Харди-Вайнберга, а также уровень генетической дифференциации и процент мигрантов на одно поколение между тремя изучаемыми выборками.

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

ASSESSMENT OF GENETIC DIVERSITY OF THE BLACK SEA TURBOT *SCOPHTHALMUS MAEOTICUS* POPULATION

N. A. Bessonova, N. A. Nebesikhina

Russian Federal Research Institute of Fisheries and Oceanography (FSBSI "VNIRO"),
Azov-Black Sea Branch of the FSBSI "VNIRO" ("AzNIIRKH"), Rostov-on-Don
E-mail: nabessonova79@gmail.com

Abstract. In the Russian Federation, the Black Sea turbot *Scophthalmus maeoticus* (Pallas, 1814) is one of the most important aquatic species for aquaculture; it is promising for domestic practice of both artificial reproduction and commercial aquaculture. In the near future, the Black Sea and Azov populations of the Black Sea turbot will be used to form the broodstocks and obtain juveniles. For this purpose, eight loci of the Black Sea turbot *Scophthalmus maeoticus*, which have been tested on three samples (Crimean fishing area of the Black Sea, Caucasian fishing area of the Black Sea, the Sea of Azov), were analyzed. Research methods include sampling, DNA isolation by means of spin-column method, PCR amplification, subsequent analysis of the obtained PCR product in the genetic analyzer Nanoform-05, and statistical processing of the data using FreeNa and GenAEx software. As a result of the analysis, the value of average expected heterozygosity, the number of private alleles, variability of the investigated loci, deviation from the Hardy-Weinberg equilibrium, as well as the level of genetic differentiation, and the percentage of migrants per generation between the three studied samples have been determined.

Keywords: Black Sea turbot *Scophthalmus maeoticus*, genetic structure, microsatellite loci (STR), Black Sea, Sea of Azov

ВВЕДЕНИЕ

Одним из наиболее важных для искусственного воспроизводства и товарной аквакультуры видов водных биоресурсов являются камбалы рода *Scophthalmus*. В странах Западной Европы развито индустриальное рыбоводство камбалы-тюрбо *Scophthalmus maximus* (Linnaeus, 1758). В России такими видами являются камбала-калкан черноморская *Scophthalmus maeoticus* (Pallas, 1814) и камбала-калкан азовская, именно они будут использоваться в ближайшее время для формирования ремонтно-маточных стад производителей и получения потомства. Существовали сомнения относительно таксономической принадлежности азовской камбалы-калкан (*S. maeoticus torosus*), которая считалась некоторыми авторами идентичной *S. maeoticus* [1]. Современное научное сообщество определяет азовскую камбалу-калкан как подвид черноморской. Зарубежные авторы не выделяют *S. maeoticus* в отдельный вид. Такие филогенетические исследования семейства *Scophthalmidae* [2] показали, что *S. maeoticus* конспецифичен с *S. maximus*, что, однако, не было принято всеми исследователями, изучающими эти виды.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалом для исследований послужили выборки камбалы-калкан *S. maeoticus*, вошедшие 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 (рис. 1, 2).

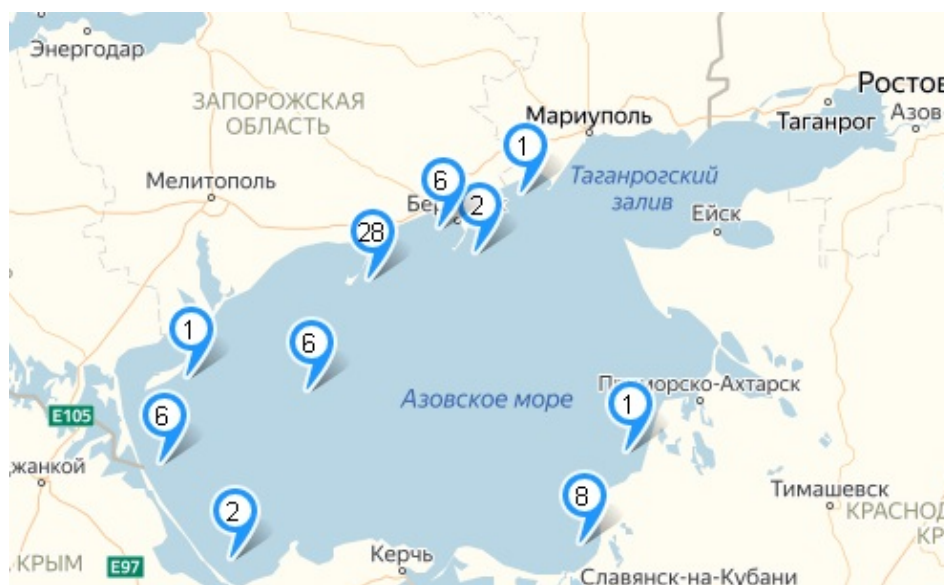
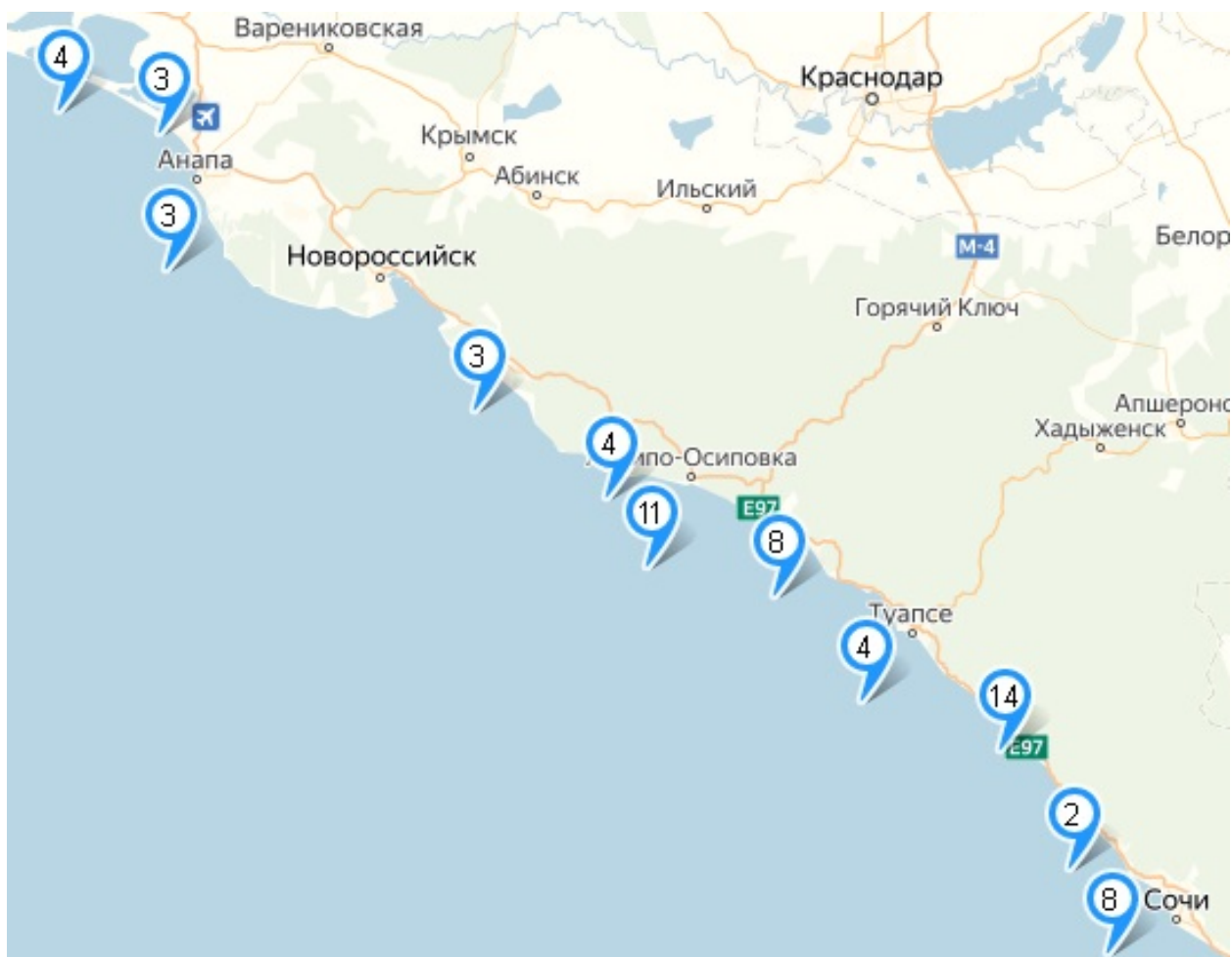


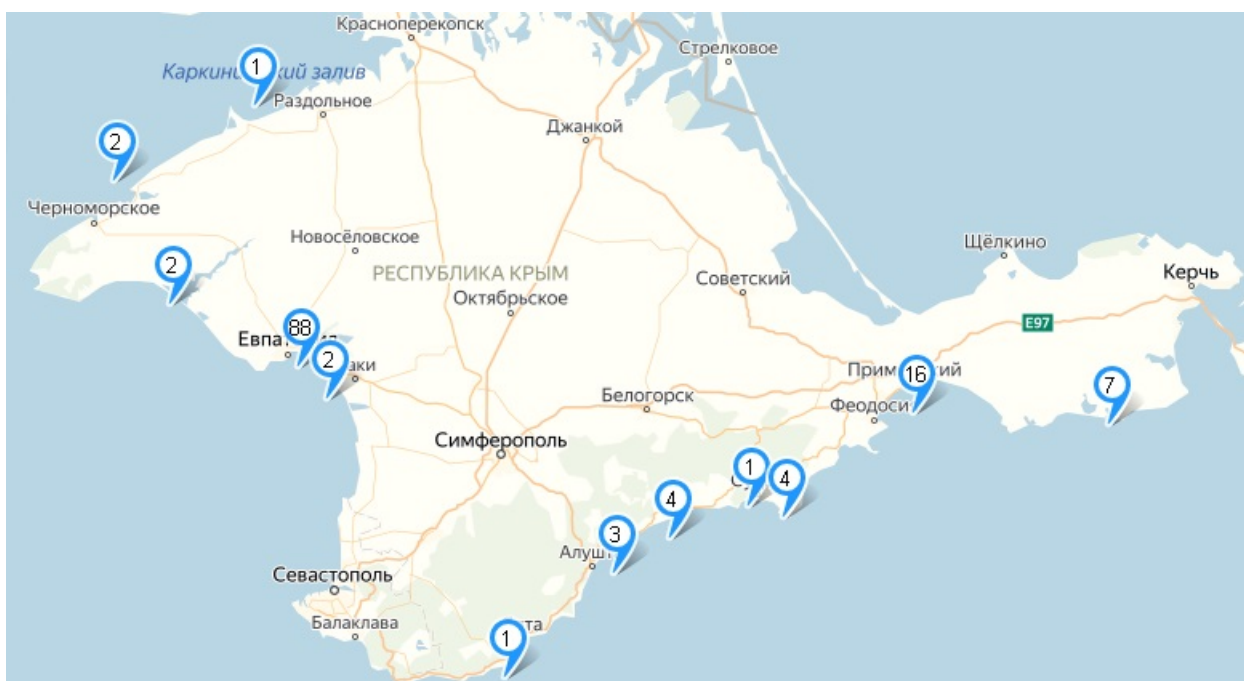
Рис. 1. Карта-схема места отбора проб камбалы в Азовском море

Выделение ДНК проводили методом абсорбции на колонках (PALL) [3] из плавников, хранившихся в 96%-ном этаноле. STR-генотипирование проводили по 8 микросателлитным локусам (3/9 CA15, Sma1-125INRA, Sma-02, Sma3-12INRA, Sma-USC26, Sma-E52, Sma-E79, Sma-E191) [4–9]. Табл. 1 содержит основные характеристики используемых локусов.

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 (немеченых) праймеров; 1x TaqTurbobuffer Mgfree (Evrogen); 2 mM MgCl₂ (ООО «НПФ Синтол»); 0,8 единиц HSTaqDNA Polymerase (Evrogen) и 0,2 mMd NTPMix (ThermoScientific). Для проведения реакции использовали режим амплификации Touch-Down: предварительная денатурация ДНК — 1 мин при 94 °C; 8 циклов: плавление — 20 с при 95 °C, отжиг праймеров — 25 с при 58 °C в первом цикле со снижением в каждом последующем цикле на 0,5 °C, синтез ДНК — 40 с при 65 °C; 25 циклов: плавление — 20 с при 95 °C, отжиг праймеров —



а)



б)

Рис. 2. Карта-схема места отбора проб камбалы в Кавказском (а) и Крымском (б) промысловых районах Черного моря

Таблица 1. Характеристика микросателлитных локусов для генотипирования камбалы

Локус	Последовательность праймеров	Метка	Повторяющаяся копия	Размерный диапазон, пн
3/9CA15	F: AGAGTGAAGAACGTACCTGC	HEX	(CA) ₁₅	217–263
	R: CAATGGAGAGGCCAGTATCGG			
Sma1-125INRA	F: CACACCTGACAAAGCTCAAC	TAMRA	(TAGA) ₁₁ -(TG) ₄	118–148
	R: GCTGAACATTTTCATGTTGATAG			
Sma-02	F: GGAGGATGTATTGAAAGTGT	FAM	(TG) ₁₆	93–151
	R: AGAGCAGGTCATTATACAGC			
Sma3-12INRA	F: CACAATTGAATCACGAGATG	HEX	(TG) ₂₁	85–111
	R: GCCACCACTGCGTAACAC			
Sma-USC26	F: TCAAACCAACGGACTAACAAACA	TAMRA	(TATC) ₁₂	202–282
	R: CTTTATTACCAGCCCATCAAAGT			
Sma-E52	F: CTCGATGATGTGCCAGAAGA	FAM	(TAT) ₄	305–311
	R: GAGAGAGAAGCGGAACAGGA			
Sma-E79	F: GCAGCGACTTGCTTCTTTCT	HEX	(GT) ₆ -(AT) ₁₄ - (GT) ₉ -(TA) ₇	227–317
	R: GTCAGTTTGTGGTGTGTGGG			
Sma-E191	F: GGAGGGCGAAGAAGAAGAAG	FAM	(CGA) ₄	273–289
	R: GCTGCTCCAGTCTGCGTT			

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 для секвенирования ДНК Нанофор-05 (ЭЗАН, Россия). Полученные первичные данные обрабатывали с помощью программы «ДНК ФА» (ООО «НПФ Синтол»).

Используя GenAlEx v. 6 [10], для каждой выборки подсчитывали среднее число аллелей на локус (A), число эффективных аллелей (AR), частоту встречаемости частных аллелей (prA), наблюдаемую (Ho) и ожидаемую (He) гетерозиготность, Fis — коэффициент инбридинга, для объединенных данных выполняли анализ PCA. Отклонение от равновесия Харди-Вайнберга (HWE) в выборках и популяциях по всем локусам оценивали с помощью «GlobalTest» в программе GenePop v.4 [11]. Наличие и частоту нулевых аллелей проверяли в FreeNA [12]. Структурированность популяций камбалы анализировали в программе Structura v. 2.3.4 [13] с последующей обработкой данных в синтаксическом анализаторе Structura Harvester [14]. Поток генов отслеживался с помощью программы BAPS v. 6 [15].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты статистического анализа изменчивости камбалы-калкан по 8 микросателлитным локусам представлены в табл. 2.

У 256 особей камбалы из трех популяций по 8 полиморфным локусам было зафиксировано 90 аллелей. Наиболее изменчивым оказался локус Sma-E79 с максимальным количеством аллелей (20), а наименее изменчивым — локус Sma-E52 с 3 аллельными вариантами. Минимальная длина аллеля (85 пн) выявлена в локусе Sma3-12INRA, максимальная длина (317 пн) — в локусе Sma-E79. Наибольший и наименьший размерные диапазоны аллелей характерны для локусов Sma-E79 и Sma-E52 (227–317 пн и 305–311 пн, соответственно).

Было выявлено большое число частных аллелей — 30 (рис. 3). Частота встречаемости, не превышающая 5%-ный порог, фиксируется у всех частных аллелей (29), кроме аллели размером 317 пн локуса Sma-E79.

Все маркеры продемонстрировали средний уровень ожидаемой гетерозиготности, за исключением Sma-02 и Sma-E52 с низким уровнем. Величина средней ожидаемой гетерозиготности в популяциях камбалы Черного моря (Кавказский район $U_{He}=0,622\pm 0,086$ и Крымский район $U_{He}=0,582\pm 0,089$) и в популяциях Азовского ($U_{He}=0,569\pm 0,089$) и Балтийского морей ($0,670\pm 0,098$) находилась приблизительно

Таблица 2. Оценка генетического разнообразия камбалы в Черном и Азовском морях

Район выборки	Локус	N	Na	Ne	Ho	He	F	Null
Кавказский	3/9CA15	63	11	4,009	0,73	0,751	0,027	0,00000
	Sma1-125INRA	63	9	3,878	0,762	0,742	-0,027	0,00002
	Sma-02	63	13	2,739	0,397	0,635	0,375***	0,15061
	Sma3-12INRA	64	7	3,359	0,75	0,702	-0,068	0,00001
	Sma-USC26	64	9	5,251	0,672	0,81	0,170***	0,08636
	Sma-E52	62	3	1,05	0,016	0,047	0,660***	0,08294
	Sma-E79	63	11	2,5	0,413	0,6	0,312***	0,14992
	Sma-E191	63	4	2,83	0,365	0,647	0,435***	0,17529
Азовское море	3/9CA15	60	7	3,176	0,65	0,685	0,051***	0,00011
	Sma1-125INRA	61	8	3,015	0,77	0,668	-0,153	0,00000
	Sma-02	59	6	1,924	0,237	0,48	0,506***	0,17309
	Sma3-12INRA	61	6	1,999	0,574	0,5	-0,148	0,00000
	Sma-USC26	60	11	5,806	0,633	0,828	0,235***	0,10949
	Sma-E52	60	2	1,034	0,033	0,033	-0,017	0,00006
	Sma-E79	61	14	4,597	0,23	0,782	0,707***	0,31610
	Sma-E191	61	4	2,151	0,295	0,535	0,449**	0,15597
Крымский	3/9CA15	129	10	3,766	0,736	0,734	-0,003***	0,01499
	Sma1-125INRA	129	7	3,529	0,806	0,717	-0,125	0,00000
	Sma-02	130	5	2,019	0,377	0,505	0,253***	0,09848
	Sma3-12INRA	130	11	3,498	0,723	0,714	-0,013	0,00000
	Sma-USC26	128	13	5,57	0,719	0,82	0,124***	0,06078
	Sma-E52	128	3	1,016	0,016	0,016	-0,006	0,00012
	Sma-E79	128	14	2,203	0,328	0,546	0,399***	0,15332
	Sma-E191	127	4	2,392	0,433	0,582	0,256***	0,10761

Примечание: 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

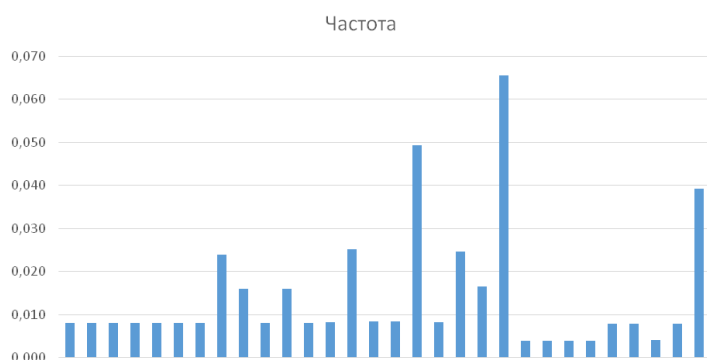


Рис. 3. Частота встречаемости частных аллелей в микросателлитных локусах у камбалы из различных популяций Черного и Азовского морей

но на одном уровне, что указывает на равную степень генетического разнообразия внутри исследуемых популяций.

В крымской и азовской выборках по некоторым локусам наблюдались статистически значимые отклонения от равновесия Харди-Вайнберга. Такое отклонение может объясняться рядом причин: действие отбора, инбридинг, смесь нескольких популяций, в которых отличаются частоты аллелей, наличие нуль-аллелей. Отмечающийся недостаток гетерозигот по локусу Sma-E79 в Азовской популяции четко коррелирует с наличием нуль-аллелей, значения которых поддерживаются 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 [16].

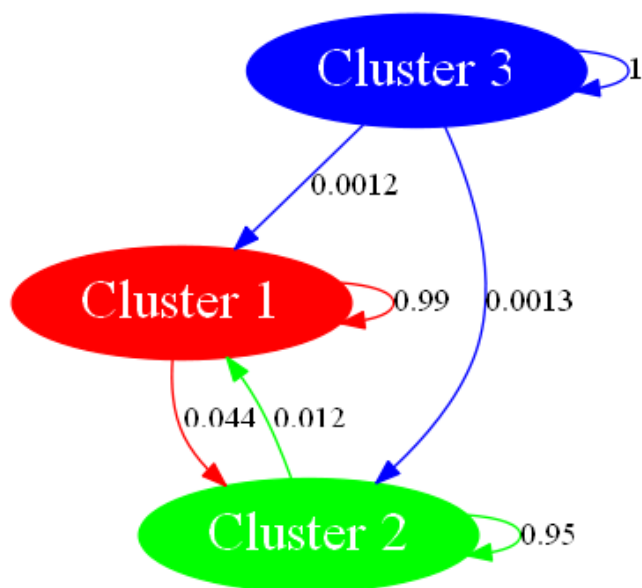


Рис. 4. Графические результаты VAPS: 1 — Кавказский район; 2 — Азовское море; 3 — Крымский район

Результаты анализа VAPS показывают, что между исследуемыми популяциями существует поток генов (рис. 4).

ВЫВОДЫ

Дифференциация кавказской и крымской популяций очень низка, процент мигрантов на поколение составляет 43 %. В ситуации с популяциями Черного и Азовского морей — 16–18 %, дифференциация между ними оценивается как незначительная, что подтверждается значениями F_{ST} (табл. 3).

Такой генетической дифференциации недостаточно для того, чтобы выделять азовскую камбалу-калкан в отдельный вид или подвид. В дальнейшем предстоит уточнение результатов на более репрезентативной выборке и проведение анализа митохондриальной ДНК.

Таблица 3. Оценка степени генетической дифференциации камбалы в Черном и Азовском морях

Pop 1	Pop 2	Fst (via Frequency)	Nm	#Pop 1	#Pop 2
Кавказский р-н	Азовское море	0,015	15,961	64	61
Кавказский р-н	Крымский р-н	0,006	42,995	64	131
Азовское море	Крымский р-н	0,014	18,004	61	131

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Марти Ю.Ю. Материалы к биологии черноморской камбалы-калкан (*Rhombus maeoticus* Pallas) // Сборник, посвященный научной деятельности почетного члена Академии наук СССР, заслуженного деятеля науки и техники Николая Михайловича Книповича (1885–1939). М.: Изд-во АН СССР, 1939. С. 232–253.
2. Chanet V. Interrelationships of scophthalmid fishes (Pleuronectiformes: Scophthalmidae) // Cybium. 2003. Vol. 27, no. 4. Pp. 275–286.
3. Ivanova N.V., de Waard J., Hebert P.D.N. An inexpensive, automation-friendly protocol for recovering high-quality DNA // Molecular Ecology Notes. 2006. Vol. 6, issue 4. Pp. 998–1002.
4. 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. Pp. 339–353. doi: 10.1046/j.1365-294X.1998.00362.x.
5. 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. doi: 10.1046/j.1365-294x.2000.00874-3.x.
6. Bouza C., Presa P., Castro J., Sánchez L., Martínez P. Allozyme 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. doi: 10.1139/f02-114.
7. 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. doi: 10.1111/j.1365-2109.2006.01600.x.
8. 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. doi: 10.1111/j.1471-8286.2007.01725.x.
9. Navajas-Pérez R., Robles F., Molina-Luzón M.J., De La Herrán, 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. doi: 10.1111/j.1755-0998.2012.03126.x.
10. Peakall R., Smouse P.E. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research // *Molecular Ecology Notes*. 2006. Vol. 6, issue 1. Pp. 288–295. doi: 10.1111/j.1471-8286.2005.01155.x.
 11. Rousset F. Genepop'007: a complete reimplementation of the Genepop software for Windows and Linux. *Mol. Ecol. Resources* 8, 2008. Pp. 103–106.
 12. Chapuis M.-P., Estoup A. Microsatellite null alleles and estimation of population differentiation // *Molecular Biology and Evolution*. 2007. Vol. 24, no. 3. Pp. 621–631. doi: 10.1093/molbev/msl191.
 13. Pritchard J.K., Stephens M., Rosenberg, N.A., and Donnelly P. Association mapping in structured populations // *Am. J. Hum. Genet.* 2000. 67. Pp. 170–181.
 14. Earl D.A. and von Holdt B.M. STRUCTURE HARVESTER: A Website and Program for Visualizing STRUCTURE Output and Implementing the Evanno Method // *Conservation Genetics Resources*. 2012. Vol. 4. Pp. 359–361. doi: 10.1007/s12686-011-9548-7.
 15. Corander J., Waldmann P. and Sillanpää M.J. Bayesian analysis of genetic differentiation between populations // *Genetics*. 2003. Vol. 163. Pp. 367–374.
 16. Chapuis M.-P., Lecoq M., Michalakis Y., Loiseau A., Sword G.A., Piry S., Estoup A. Do outbreaks affect genetic population structure? A worldwide survey in *Locustamigratoria*, a pest plagued by microsatellite null alleles // *Molecular Ecology*. 2008. Vol. 17, no. 16. Pp. 3640–3653. doi: 10.1111/j.1365-294X.2008.03869.x.