

УДК 575.174.015.3

## ПОИСК ПОЛИМОРФНЫХ МИКРОСАТЕЛЛИТНЫХ ЛОКУСОВ ДЛЯ МОРСКОГО ОКУНЯ *SEBASTES TACZANOWSKII* STEINDACHNER, 1880 (SEBASTIDAE)

© 2021 г. Н. М. Батищева<sup>1</sup>, \*, Вл. А. Брыков<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Национальный научный центр морской биологии им. А.В. Жирмунского ДВО РАН,  
Владивосток 690041, Россия

\*e-mail: batishchevanata@gmail.com

Поступила в редакцию 09.12.2020 г.

После доработки 17.01.2021 г.

Принята к публикации 01.04.2021 г.

Восточный морской окунь *Sebastes taczanowskii* Steindachner, 1880 – живородящая костистая рыба, которая играет существенную роль в функционировании сублиторальных сообществ рыб и является важным видом для любительского лова (Маркевич, Гнубкина, 2015). Биология *S. taczanowskii* относительно хорошо изучена, однако сведения о его популяционной структуре отсутствуют. Проведены поиск и апробация имеющихся данных по микросателлитным локусам у близких видов рода *Sebastes* с целью оценки уровня внутривидового полиморфизма и выбора наиболее информативных локусов для дальнейших исследований. Апробированы праймеры для 19 микросателлитных локусов, из которых только пять могут быть использованы для анализа генетической изменчивости у *S. taczanowskii*.

**Ключевые слова:** микросателлиты, полиморфизм, окунеобразные

**DOI:** 10.31857/S0134347521040021

Восточный морской окунь *Sebastes taczanowskii* распространен от побережья Корейского полуострова до о-ва Сахалин (Японское море), встречается в прибрежных водах Японии, а также у южных Курильских островов (Takahashi et al., 1991; Колпаков, 2006; Nagasawa et al., 2008). К настоящему времени изучены экология *S. taczanowskii* (Haldorson, Love, 1991; Hayakawa, Munehara, 2003) и его филогенетические отношения (Asahida et al., 2004; Hyde, Vetter, 2007; Kartavtsev et al., 2009). Цель данного исследования – апробация 19 имеющихся микросателлитных локусов для использования в анализе отцовства и популяционной генетике *S. taczanowskii*.

### МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Материалом для исследования послужили 48 особей *S. taczanowskii*, пойманных в зал. Восток (зал. Петра Великого Японского моря). Геномную ДНК выделяли из мышечных тканей с помощью стандартного фенол/хлороформного метода (Asahida et al., 1996).

Стандартная разработка микросателлитных локусов для разных видов включает создание геномной библиотеки, поиск микросателлитных

последовательностей и фланкирующих их участков (Hayden, Sharp, 2001), используемых в качестве праймеров в полимеразной цепной реакции (ПЦР). Другой подход заключается в использовании праймерных участков у близкородственных видов, для которых они известны (Asahida et al., 2004). Во многих случаях данный подход оказывается успешным.

В настоящей работе мы использовали 19 микросателлитных локусов, выявленных у видов рода *Sebastes*: KSs2A, KSs3, KSs7, KSs11B, KSs16, KSs26 – у *S. schlegeli* (см.: An et al., 2009); Ssc12, Ssc23, Ssc51, Ssc69 – у *S. schlegeli* (см.: Yoshida et al., 2005); Py3-29 – у *S. schlegeli* (см.: Bai et al., 2011); Sma3, Sma5, Sma7, Sma10, Sma11 – у *S. maliger* (см.: Wimberger et al., 1999); SR 7-2, SR 7-7, SR 7-25 – у *S. rastrelliger* (см.: Westerman et al., 2005). Пять из 19 микросателлитных локусов (табл. 1) были успешно амплифицированы для *S. taczanowskii*, и был проведен анализ размеров фрагментов. Условия амплификации были адаптированы индивидуально для каждого микросателлитного локуса. К 5'-концу каждого прямого праймера была пришта последовательность ДНК фага M13, который помечали одним из четырех флуоресцентных красителей: ROX, FAM, R6G или TAMRA. Пред-

**Таблица 1.** Информативность анализируемых полиморфных локусов для *Sebastes taczanowskii*

Локус	Исходный вид/ аллельное разнообразие	nA	Ho	He	HWE	F <sub>IS</sub>
SR 7-2	<i>S. rastrelliger</i> /4	9	1.0000	0.7061	0.0000	-0.4162
SR 7-7	<i>S. rastrelliger</i> /12	9	0.9787	0.8106	0.0180	-0.2074
SR 7-25	<i>S. rastrelliger</i> /11	15	0.9792	0.8834	0.0316	-0.1084
Sma3*	<i>S. maliger</i> /5	14	0.6458	0.7890	0.0000	0.1815
Sma10	<i>S. maliger</i> /15	16	0.9583	0.8010	0.8796	-0.1965

Примечание. nA – число аллелей в локусе; Ho – наблюдаемая гетерозиготность; He – ожидаемая гетерозиготность; HWE – значимость нарушения равновесия Харди–Вайнберга, приведены только значимые значения ( $P < 0.05$ ); F<sub>IS</sub> – коэффициент инбридинга. \*Наличие нуля аллелей.

варительную оценку продукта ПЦР проводили с помощью гель-электрофореза в 1.5% агарозном геле. Электрофоретическое разделение продуктов осуществляли на автоматическом секвенаторе ABI3130 (Applied Biosystems Inc., США) с применением размерного стандарта (S450) (CO<sub>R</sub>DIS). Анализ длины фрагментов визуализировали с помощью программного пакета GeneMapper ver. 5.0 (Applied Biosystems).

Для оценки информативности выбранных микросателлитных локусов использовали стандартные статистические процедуры. Наличие нулевых аллелей, больших вставок и делеций, а также подсчет пиков заикания были протестированы с помощью MICRO-CHECKER ver. 2.2.3 (Van Oosterhout et al., 2004). Вариабельность в каждом локусе измеряли по количеству аллелей, ожидаемой и наблюдаемой гетерозиготности, равновесию Харди–Вайнберга (HWE); нарушение равновесия по сцеплению было проверено с использованием GENEPOP 4.0 (Rousset, 2008). Достоверное значение для всех критериев значимости разнообразия корректировали последовательной процедурой Бонферрони (Rice, 1989).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Все пять локусов у *S. taczanowskii* оказались полиморфными (табл. 1). Стабильная и качественная амплификация наблюдалась при использовании праймеров, разработанных для отдаленных видов рода *Sebastes*: *S. maliger* и *S. rastrelliger*. Достаточно интересно, что ни один из локусов, разработанных для близкородственного вида *S. schlegelii*, не амплифицировался у *S. taczanowskii*.

Количество аллелей в оцениваемых локусах варьировало от 9 до 16 (табл. 1). Нулевые аллели обнаружены только для локуса Sma3. Наличие в аллелях больших вставок и делеций, заикающихся пиков в каком-либо локусе не выявлено. Наблю-

даемая и ожидаемая гетерозиготность варьировала от 0.6458 до 1000 и от 0.7061 до 0.8834 соответственно (табл. 1). Отклонения наблюдаемых частот генотипов от равновесного распределения Харди–Вайнберга наблюдались по двум локусам: SR 7-2 и Sma3. Отклонения от HWE могут указывать на инбридинг или свидетельствовать об ошибках генотипирования образцов (Wigginton et al., 2005; Morin et al., 2009). Коэффициент инбридинга варьировал от -0.4162 (SR 7-2) до 0.1815 (Sma 3). Обнаруженный недостаток гетерозигот в локусе Sma3, скорее всего, вызван наличием нулевых аллелей. Локус SR 7-2 показал избыток гетерозигот и неравновесие по сцеплению.

Некоторые авторы отмечают, что аллельное разнообразие у вида, для которого разрабатывался праймер, должно быть выше (Petit et al., 2005; Selkoe, Toonen, 2006). В нашем случае мы наблюдали эту закономерность лишь у одного локуса из пяти (табл. 1).

Таким образом, с использованием праймеров, разработанных для отдаленных видов (*S. maliger*, *S. rastrelliger*), у *S. taczanowskii* выявлено пять высокополиморфных микросателлитных маркеров. Эти локусы могут быть использованы для изучения популяционно-генетической структуры у данного вида, а также для анализа генетического родства особей.

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ

Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены.

## БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы благодарны Т.Ф. Прийме, В.Д. Ягодиной, Е.И. Бондарь (Национальный научный центр морской биологии ДВО РАН), А. Татаренкову (Калифорнийский университет, Ирвин) за помощь в работе.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Колпаков Н.В. О биологии малого *Sebastes minor* и восточного *S. taczanowskii* (Sebastidae) морских окуней прибрежных вод северного Приморья // Вопр. ихтиологии. 2006. Т. 46. № 3. С. 334–344.
- Маркевич А.И., Гнубкина В.П. Особенности позднего эмбрионального развития и предличинок восточного *Sebastes taczanowskii* и малого *S. minor* морских окуней (Sebastidae) в заливе Петра Великого Японского моря // Изв. ТИНРО. 2015. Т. 183. С. 112–119.
- An H.S., Park J.Y., Kim M.-J. et al. Isolation and characterization of microsatellite markers for the heavily exploited rockfish *Sebastes schlegeli*, and cross-species amplification in four related *Sebastes* spp. // Conserv. Genet. 2009. V. 10. № 6. P. 1969–1972. <https://doi.org/10.1007/s10592-009-9870-8>
- Asahida T., Gray A.K., Gharrett A.J. Use of microsatellite locus flanking regions for phylogenetic analysis? A preliminary study of *Sebastes subgenera* // Environ. Biol. Fishes. 2004. V. 69. P. 461–470.
- Asahida T., Kobayashi T., Saitoh K., Nakayama I. Tissue preservation and total DNA extraction from fish stored at ambient temperature using buffers containing high concentration of urea // Fish. Sci. 1996. V. 62. № 5. P. 727–730. <https://doi.org/10.2331/fishsci.62.727>
- Bai C.C., Liu S.F., Zhuang Z.M. et al. Isolation and characterization of microsatellite markers for the Korean rockfish, *Sebastes schlegeli* // Genet. Mol. Res. 2011. V. 10. № 3. P. 2065–2068. <https://doi.org/10.4238/vol10-3gmr1522>
- Haldorson L., Love M. Maturity and fecundity in the rockfishes, *Sebastes* spp. // Mar. Fish. Rev. 1991. V. 53. № 2. P. 25–31.
- Hayakawa Y., Munehara H. Comparison of ovarian functions for keeping embryos by measurement of dissolved oxygen concentrations in ovaries of copulatory and non-copulatory oviparous fishes and viviparous fishes // J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 2003. V. 295. № 2. P. 245–255. [https://doi.org/10.1016/S0022-0981\(03\)00297-1](https://doi.org/10.1016/S0022-0981(03)00297-1)
- Hayden M.J., Sharp P.J. Sequence-tagged microsatellite profiling (STMP): a rapid technique for developing SSR markers // Nucleic Acids Res. 2001. V. 29. № 8. Art. e43. <https://doi.org/10.1093/nar/29.8.e43>
- Hyde J.R., Vetter R.D. The origin, evolution, and diversification of rockfishes of the genus *Sebastes* (Cuvier) // Mol. Phylogenet. Evol. 2007. V. 44. № 2. P. 790–811. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2006.12.026>
- Kartavtsev Y.P., Sharina S.N., Goto T. et al. Sequence diversity at cytochrome oxidase 1 (Co-1) gene among sculpins (Scorpaeniformes, Cottidae) and some other scorpaeniformes of Russia Far East with phylogenetic and taxonomic insights // Genes Genomics. 2009. V. 31. № 2. P. 183–197.
- Morin P.A., Leduc R.G., Archer F.I. et al. Significant deviations from Hardy–Weinberg equilibrium caused by low levels of microsatellite genotyping errors // Mol. Ecol. Resour. 2009. V. 9. № 2. P. 498–504. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2008.02502.x>
- Nagasawa T., Ishida R., Sasaki M. Development of *Sebastes taczanowskii* (Scorpaenidae) in the Sea of Japan off Hokkaido with a key to species of larvae // Ichthyol. Res. 2008. V. 55. № 2. P. 124–132.
- Petit R.J., Deguilloux M.F., Chat J. et al. Standardizing for microsatellite length in comparisons of genetic diversity // Mol. Ecol. 2005. V. 14. P. 885–890.
- Rice W.R. Analyzing tables of statistical tests // Evolution. 1989. V. 43. № 1. P. 223–225.
- Rousset F. Genepop'007: a complete re-implementation of the genepop software for Windows and Linux // Mol. Ecol. Resour. 2008. V. 8. № 1. P. 103–106. <https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2007.01931.x>
- Selkoe K.A., Toonen R.J. Microsatellites for ecologists: a practical guide to using and evaluating microsatellite markers // Ecol. Lett. 2006. V. 9. № 5. P. 615–629. <https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2006.00889.x>
- Takahashi H., Takano K., Takemura A. Reproductive cycles of *Sebastes taczanowskii*, compared with those of other rockfishes of the genus *Sebastes* // Environ. Biol. Fishes. 1991. V. 30. № 1–2. P. 23–30.
- Van Oosterhout C., Hutchinson W.F., Wills D.P.M., Shipley P. MICRO-CHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data // Mol. Ecol. Notes. 2004. V. 4. № 3. P. 535–538. <https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2004.00684.x>
- Westerman M.E., Buonaccorsi V.P., Stannard J.A. et al. Cloning and characterization of novel microsatellite DNA markers for the grass rockfish, *Sebastes rastrelliger*, and cross-species amplification in 10 related *Sebastes* spp. // Mol. Ecol. Notes. 2005. V. 5. № 1. P. 74–76. <https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2004.00837.x>
- Wigginton J.E., Cutler D.J., Abecasis G.R. A note on exact tests of Hardy–Weinberg equilibrium // Am. J. Hum. Genet. 2005. V. 76. № 5. P. 887–893. <https://doi.org/10.1086/429864>
- Wimberger P., Burr J., Gray A. et al. Isolation and characterization of twelve microsatellite loci for rockfish (*Sebastes*) // Mar. Biotechnol. 1999. V. 1. № 3. P. 311–315.
- Yoshida K., Nakagawa M., Wada S. Multiplex PCR system applied for analysing microsatellite loci of Schlegel's black rockfish, *Sebastes schlegeli* // Mol. Ecol. Notes. 2005. V. 5. № 2. P. 416–418. <https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2005.00945.x>

## Search of Polymorphic Microsatellite Loci for *Sebastes taczanowskii* Steindachner, 1880 (Sebastidae)

N. M. Batishcheva<sup>a</sup> and V. A. Brykov<sup>a</sup>

<sup>a</sup>*A.V. Zhirmunsky National Scientific Center of Marine Biology, Far East Branch, Russian Academy of Sciences, Vladivostok 690041, Russia*

The white-edged rockfish *Sebastes taczanowskii* Steindachner, 1880 is a marine viviparous teleost, which plays a substantial role in the functioning of subtidal fish communities and is an important recreational fishery species (Markevich, Gnyubkina, 2015). The biology of *S. taczanowskii* has been well studied; however, there is no information about the population structure of the species. The aim of our study was to evaluate the available data on microsatellite loci from closely related species of the genus *Sebastes*, assess intra-species polymorphism, and select the most informative loci for further analysis. We screened 19 microsatellite loci, of which only five could be used to analyze the genetic variability in *S. taczanowskii*.

*Keywords:* microsatellites, polymorphism, rockfish