

Водные биоресурсы и среда обитания
 2019, том 2, номер 4, с. 60–67
<http://journal.azniirkh.ru>, www.azniirkh.ru
 ISSN 2618-8147 print, ISSN 2619-1024 online



Aquatic Bioresources & Environment
 2019, vol. 2, no. 4, pp. 60–67
<http://journal.azniirkh.ru>, www.azniirkh.ru
 ISSN 2618-8147 print, ISSN 2619-1024 online

УДК 597-556:35.575.17

ИЗУЧЕНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ СТРУКТУРЫ ПОПУЛЯЦИИ КАМБАЛЫ-КАЛКАН *SCOPHTHALMUS MAEOTICUS* (SCOPHTHALMIDAE) В АЗОВО-ЧЕРНОМОРСКОМ БАССЕЙНЕ

© 2019 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 344002, Россия
 E-mail: nabessonova79@gmail.com*

Аннотация. В Российской Федерации одним из наиболее важных для рыболовства и перспективных для отечественной практики искусственного воспроизводства и товарной аквакультуры 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 оценки уровня генетического разнообразия было проанализировано восемь микросателлитных локусов (STR) камбалы-калкан *Scophthalmus maeoticus*, которые тестировались на трех выборках (Крымский и Кавказский промысловые районы Черного моря, Азовское море). В качестве аутгруппы использовалась выборка камбалы-тюрбо из Балтийского моря. В результате анализа были определены величина средней ожидаемой гетерозиготности, число частных аллелей, изменчивость исследуемых локусов, отклонение от равновесия Харди-Вайнберга, а также уровень генетической дифференциации и процент мигрантов на одно поколение между четырьмя изучаемыми выборками, и была выяснена их генетическая дистанционность друг от друга.

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

INVESTIGATION OF THE GENETIC STRUCTURE OF THE BLACK SEA TURBOT *SCOPHTHALMUS MAEOTICUS* (SCOPHTHALMIDAE) POPULATION IN THE AZOV AND BLACK SEAS

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 344002, Russia
 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 and Azov Seas), were analyzed. A sample from the Baltic Sea was used as an out-group. As a result of the analysis, the value of average expected heterozygosity, the number of private alleles, the variability of the investigated loci, the deviation from the Hardy-Weinberg equilibrium, the level of genetic differentiation, and the percentage of migrants per one generation between the four studied samples have been determined, as well as their genetic distance from each other.

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

ВВЕДЕНИЕ

Одним из наиболее важных в мировом рыбоводстве и перспективных для отечественной практики 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 Российской Федерации такими видами являются камбала-калкан черноморская *Scophthalmus maeoticus* (Pallas, 1814) и камбала-калкан азовская, и именно они будут использоваться в ближайшее время для формирования ремонтно-маточных стад производителей и получения потомства. Однако азовская камбала-калкан (*S. maeoticus torosus*) считалась «сомнительным» подвидом и принималась некоторыми авторами идентичным *S. maeoticus* [1]. Зарубежные авторы не выделяют *S. maeoticus* в

отдельный вид: подробные филогенетические исследования семейства *Scophthalmidae* [2] показали, что *S. maeoticus* конспецифичен с *S. maximus*. Однако это таксономическое решение не было принято всеми исследователями, изучающими эти виды.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

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 четыре выборки, приуроченные к Кавказскому и Крымскому промысловым районам в Черном море и к Азовскому морю. В качестве аутгруппы была взята выборка *S. maximus* из Балтийского моря (рис. 1).

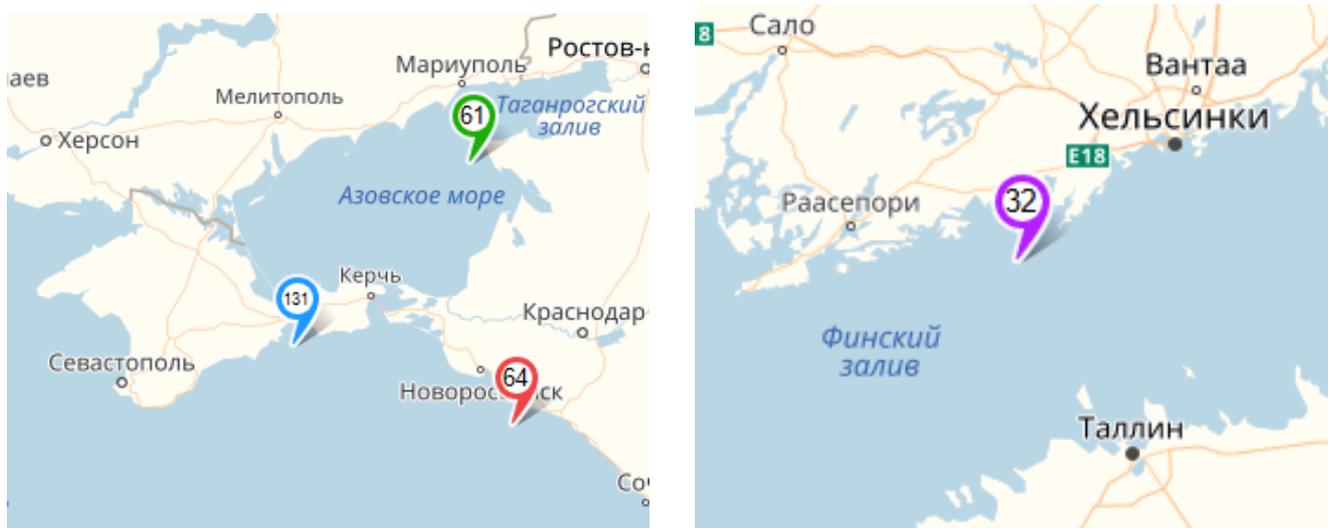


Рис. 1. Места отбора проб камбалы-калкан: 131 — Крымский р-н Черного моря (n=131), 64 — Кавказский р-н Черного моря (n=64), 61 — Азовское море (n=61), 32 — Балтийское море (n=32)

Fig. 1. Schematic map of turbot sampling sites: 131 — Crimean Region of the Black Sea (n=131), 64 — Caucasian Region of the Black Sea (n=64), 61 — Azov Sea (n=61), 32 — Baltic Sea (n=32)

Выделение ДНК проводили методом абсорбции на колонках (PALL) [3] из плавлеников, хранившихся в 96%-ном этаноле. STR-генотипирование проводили по 8 микросателлитным локусам (3/9CA15, Sma1-125INRA, Sma-02, Sma3-12INRA, Sma-USC26, Sma-E52, Sma-E79, Sma-E191) с ди-, три- и тетра-нуклеотидными повторяющимися последовательностями. Ранее они использовались при анализе камбалы-тюрко средиземноморской и атлантической популяций. Однако четыре из представленных локусов уже отрабатывались прежде на *S. maoticus* [4–9]. В табл. 1 указаны основные характеристики используемых локусов.

Для проведения ПЦР-амплификации локусы Sma1-125INRA, Sma-02, Sma3-12INRA и Sma-USC26 были объединены в мультиплекс, остальные локусы амплифицировали каждый по отдельности. 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, 1× Taq Turbo buffer Mg free (Evrogen), 2 mM MgCl₂ (ООО «НПФ Синтол»), 0,8 единиц HS Taq DNA Polymerase (Evrogen) и 0,2mM dNTP Mix (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 для секвенирования ДНК Нанофор05 (ЭЗАН, Россия). Полученные первичные данные обрабатывали с помощью программы «ДНК ФА» (ООО «НПФ Синтол»).

Используя программу GenAlEx v.6 [10], для каждой выборки подсчитывали среднее число аллелей на локус (A), число эффективных аллелей (AR), частоту встречаемости частных аллелей (rgA), наблюдаемую (Ho) и ожидаемую (He) гетерозиготность, Fis — коэффициент инбридинга, для объединенных данных выполняли анализ PCoA. 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].

Таблица 1. Характеристика микросателлитных локусов для генотипирования камбалы

Table 1. Characterization of microsatellite loci for the Black Sea turbot genotyping

Локус Locus	Последовательность праймеров (5'-3') Primer sequence (5'-3')	Метка Tag	Повторяющаяся копия Sequence repeat	Размерный диапазон, пн Size range, base pairs
3/9CA15	F: AGAGTGAAGAACGTACCTGC R: CAATGGAGAGGCAGTATCGG	HEX	(CA) ₁₅	217–263
Sma1-125INRA	F: CACACCTGACAAAGCTCAAC R: GCTGAACATTTTCATGTTGATAG	TAMRA	(TAGA) ₁₁ -(TG) ₄	118–148
Sma-02	F: GGAGGATGTATTGAAAGTGT R: AGAGCAGGTCATTATACAGC	FAM	(TG) ₁₆	93–151
Sma3-12INRA	F: CACAATTGAATCACGAGATG R: GCCACCACTGCGTAACAC	HEX	(TG) ₂₁	85–111
Sma-USC26	F: TCAAACCAACGGACTAACAACA R: CTTCAATTACCAGCCCATCAAAGT	TAMRA	(TATC) ₁₂	202–282
Sma-E52	F: CTCGATGATGTGCCAGAAGA R: GAGAGAGAAGCGGAACAGGA	FAM	(TAT) ₄	305–311
Sma-E79	F: GCAGCGACTTGCTTCTTCT R: GTCAGTTTGTGGTGTGTGGG	HEX	(GT) ₆ -(AT) ₁₄ - (GT) ₉ -(TA) ₇	227–317
Sma-E191	F: GGAGGGCGAAGAAGAAGAAG R: GCTGCTCCAGTCTGCGTT	FAM	(CGA) ₄	273–289

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Длины последовательностей аллелей микросателлитных локусов в исследовании показали соответствие с данными других исследований [4–9, 15], за исключением локуса 3/9CA15. Размеры аллелей локуса 3/5CA15 находятся в интервале

между 165 и 197 п.н. [15], однако в настоящем исследовании размеры аллелей локуса 3/9CA15 варьировались от 217 до 263 п.н.

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

Таблица 2. Показатели генетического разнообразия камбалы в Черном, Азовском и Балтийском морях

Table 2. Assessment of genetic diversity of the turbot populations in the Black, Azov and Baltic Seas

Район выборки Sampling area	Локус Locus	N	Na	Ne	Ho	He	F	Null
Черное море Кавказский the Black Sea, Caucasian	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
Черное море Крымский the Black Sea, Crimean	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	
Азовское море the Azov Sea	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	
Балтийское море the Baltic Sea	3/9CA15	32	7	2,897	0,688	0,655	-0,05	0,00000
	Sma1-125INRA	32	8	4,971	0,625	0,799	0,218	0,08889
	Sma-02	32	14	4,582	0,781	0,782	0,001	0,00000
	Sma3-12INRA	32	9	4,433	0,688	0,774	0,112	0,02810
	Sma-USC26	32	10	6,849	0,875	0,854	-0,025	0,00000
	Sma-E52	32	1	1	0	0	#Н/Д	0,00100
	Sma-E79	32	6	3,587	0,781	0,721	-0,083***	0,00000
Sma-E191	32	6	3,23	0,5	0,69	0,276	0,12513	

Примечания: N — размер выборки; Na — количество 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

Notes: N — sample size; Na — the number of different alleles; Ne — the number of effective alleles; Ho — observed heterozygosity; He — expected heterozygosity; F — fixation index (inbreeding coefficient); Null — frequency of null alleles; Level of confidence: * P < 0.05; ** P < 0.01; *** P < 0.001

У 288 особей камбалы из 4 популяций по 8 полиморфным локусам было зафиксировано 86 аллелей. Наиболее изменчивым оказался локус Sma-E79 с максимальным количеством аллелей (22), а наименее изменчивым — локус Sma-E52 с 3 аллельными вариантами. Минимальная длина аллеля (85 п.н.) выявлена в локусе Sma3-12INRA, максимальная длина (317 п.н.) — в локусе Sma-E79. Наибольший и наименьший размерные диапазоны аллелей характерны для локусов Sma-E79 (227–317 п.н.) и Sma-E52 (305–311 п.н.), соответственно. Локус Sma-E52 в выборке балтийской камбалы проявил себя как мономорфный с одним аллельным вариантом — 308 п.н.

Было выявлено большое число частных аллелей — 31 (рис. 2). Частота встречаемости, не превышающая порог 5 %, фиксируется у большинства частных аллелей (26). В балтийской выборке были зарегистрированы информативные аллели с частотой встречаемости выше 15 % (аллель 109 локуса Sma3-12INRA, аллель 246 локуса Sma-USC26). Частота встречаемости аллеля 281 локуса Sma-E79 превышает 40 % (рис. 2).

Все маркеры, за исключением Sma-E52, продемонстрировали высокий уровень ожидаемой гетерозиготности. 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 популяциях Азовского ($U_{He}=0,569\pm 0,089$) и Балтийского ($0,670\pm 0,098$) морей находились приблизительно на

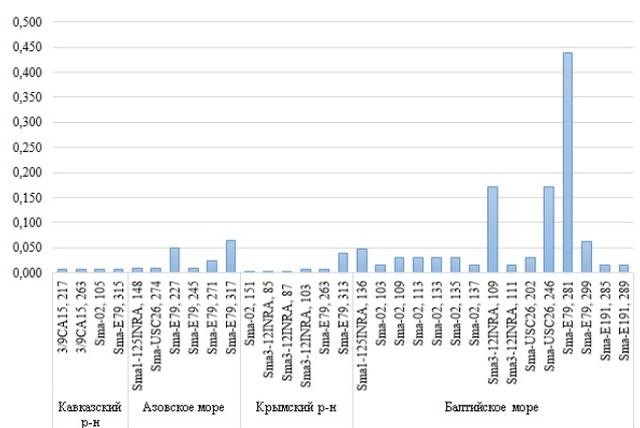


Рис. 2. Частота встречаемости частных аллелей в микросателлитных локусах у камбалы из различных популяций Черного, Азовского и Балтийского морей

Fig. 2. Frequency of occurrence of private alleles in microsatellite loci in various Black Sea turbot populations of the Black, Azov and Baltic Sea

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. Отмечающийся недостаток гетерозигот по локусу Sma-E79 в азовской популяции четко коррелирует с наличием нуль-аллелей, значения которых поддерживаются на высоком уровне 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]. Отклонение от равновесия Харди-Вайнберга по другим локусам может объясняться рядом причин: действие отбора, инбридинг, смесь нескольких популяций, в которых отличаются частоты аллелей.

Анализ РСoA (рис. 3) наглядно отражает характер дифференцировки исследованных выборок. Наиболее дистанцированными оказались выборки камбалы Азово-Черноморского региона от группы сравнения из Балтийского моря, наименее — выборки из кавказского и крымского районов Черного моря.

Дифференциация кавказской и крымской популяций очень низка; процент мигрантов на поколение, вычисленный при помощи GenAlEx 6 [10], составляет 42 %. В ситуации с популяциями Черного и Азовского морей уровень мигрантов на поколение составляет 15–18 %, а дифференциация между ними оценивается как незначительная, что подтверждается значениями F_{ST} (табл. 3). Для сравнения представлены аналогичные показатели по балтийской популяции. Уровень генетической дифференциации с популяциями Азово-Черноморского бассейна умеренный, мигранты составляют 2–3 %.

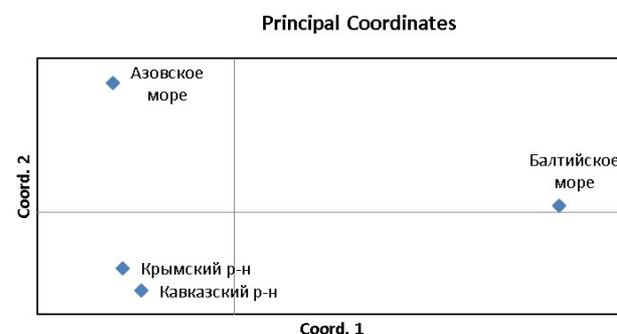


Рис. 3. РСoA-диаграмма в системе двух координат
Fig. 3. PCA diagram in a two-coordinate system

Таблица 3. Уровень генетической дифференциации и процент мигрантов на одно поколение**Table 3.** The level of genetic differentiation and the percentage of migrants per one generation

Pop1	Pop2	Fst (via Frequency)	Nm
Кавказский р-н the Black Sea, Caucasian Region	Азовское море the Azov Sea	0,015	15,961
Кавказский р-н the Black Sea, Caucasian Region	Крымский р-н the Black Sea, Crimean Region	0,006	42,995
Азовское море the Azov Sea	Крымский р-н the Black Sea, Crimean Region	0,014	18,004
Кавказский р-н the Black Sea, Caucasian Region	Балтийское море the Baltic Sea	0,064	3,677
Азовское море the Azov Sea	Балтийское море the Baltic Sea	0,08	2,884
Крымский р-н the Black Sea, Crimean Region	Балтийское море the Baltic Sea	0,072	3,212

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Исходя из полученных данных, можно сделать вывод, что исследуемые популяции дифференцируются между собой, однако между ними существует устойчивый поток генов. Уровня такой генетической дифференциации, вероятно, недостаточно для того, чтобы выделять азовскую камбалы-калкан в отдельный вид и даже подвид. Более того, определение валидности черноморской камбалы-калкан как вида тоже требует дополнительного изучения. В дальнейшем предстоит уточнение полученных предварительных выводов о систематическом взаимоотношении азовской камбалы-калкан, черноморской камбалы-калкан и камбалы-тюрбо на более репрезентативной выборке и с использованием разных генетических маркеров.

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 B. Interrelationships of scophthalmid fishes (Pleuronectiformes: Scophthalmidae) // *Cybum*. 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 // *Molecular Ecology Resources*. 2008. No. 8. 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., Donnelly P. Association mapping in structured populations // *American Journal of Human Genetics*. 2000. Vol. 67, no. 1. Pp. 170–181. doi: 10.1086/302939.
 14. Earl D.A., 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, no. 2. Pp. 359–361. doi: 10.1007/s12686-011-9548-7.
 15. Karan S., Doğdu S.A., Uyan A., Gürlek M., Ergüden D., Turan C. Microsatellite loci for Black Sea turbot *Scophthalmus maeoticus* // *Natural and Engineering Sciences*. 2016. Vol. 1, no. 3. Pp. 23–26. doi: 10.28978/nesciences.286266.
 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 *Locusta migratoria*, 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.
 2. Chanet B. Interrelationships of scophthalmid fishes (Pleuronectiformes: Scophthalmidae). *Cybiurn*, 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. *Molecular Ecology Resources*, 2008, no. 8, pp. 103–106.

REFERENCES

1. Marti Yu.Yu. Materialy k biologii chernomorskoy kambaly-kalkana (*Rhombus maeoticus* Pallas) [Materials on the biology of the flatfish *Rhombus maeoticus* Pallas]. In: *Sbornik, posvyashchenny nauchnoy deyatelnosti pochetnogo chlena Akademii nauk SSSR, zaslužennogo deyatela nauki i tekhniki, Nikolaya Mikhaylovicha Knipovicha (1885–1939)* [Collection of papers dedicated to the scientific activity of N.M. Knipovich (1885–1939)]. Moscow: AN SSSR [Academy of Sciences of the USSR] Publ., 1939, pp. 232–253. (In Russian).

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., Donnelly P. Association mapping in structured populations. *American Journal of Human Genetics*, 2000, vol. 67, no. 1, pp. 170–181. doi: 10.1086/302939.
14. Earl D.A., 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, no. 2, pp. 359–361. doi: 10.1007/s12686-011-9548-7.
15. Karan S., Doğdu S.A., Uyan A., Gürlek M., Ergüden D., Turan C. Microsatellite loci for Black Sea turbot *Scophthalmus maeoticus*. *Natural and Engineering Sciences*, 2016, vol. 1, no. 3, pp. 23–26. doi: 10.28978/nesciences.286266.
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 *Locusta migratoria*, 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.

Поступила 06.09.2019

Принята к печати 07.11.2019