



# РАЗРАБОТКА НАБОРА ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ САХАЛИНСКОГО ОСЕТРА *ACIPENSER MIKADOI* HILGENDORF, 1892 С ПОМОЩЬЮ ПЦР



С.В. Туранов

ФГБУН "Национальный научный центр морской биологии им. А.В. Жирмунского"  
Дальневосточного отделения Российской академии наук, 690041, Владивосток; ФГБОУ  
ВО «Дальрыбвтуз», 690087, Владивосток; e-mail: sturcoal@mail.ru

## Введение

Осетровые (сем. Acipenseridae) – ценные промысловые рыбы, а также объекты аквакультуры. Род *Acipenser* насчитывает около 20 видов, 12 из которых отмечены для российской территории (Парин и др., 2014; Nelson et al., 2016). Одним из наиболее редких является сахалинский осётр *A. mikadoi* Hilgendorf, 1892. В настоящее время численность его существенно подорвана, вид находится на грани исчезновения. Естественные популяции вида сохранились в р. Тумнин Хабаровского края и р. Виахту Сахалинской области (Золотухин, 2012; Кошелев, Колпаков, 2020). Ввиду малой численности редких и исчезающих видов рыб наиболее подходящими для мониторинга их видового и генетического разнообразия представляются неинвазивные подходы, в том числе использование ДНК из окружающей среды. Метод хорошо зарекомендовал себя в данной области и успешно апробирован для мониторинга нескольких видов редких и исчезающих осетров (Mizumoto et al., 2020; Schenekar et al., 2020; Pflieger et al., 2016; Anderson et al., 2018; Yusishen et al., 2020). В настоящей работе приводятся результаты разработки праймеров, специфичных для митохондриальной ДНК вида *A. mikadoi*.



Сахалинский осётр *A. Mikadoi Hilgendorf, 1892*



Нативный ареал вида *A. mikadoi* по данным ресурса [fishbase.org](https://www.fishbase.org)

## Материал и методы

Сформирована матрица из 15 последовательностей полных митохондриальных геномов от 3 видов осетровых рыб, ареалы которых могут пересекаться (Парин и др., 2014): *Acipenser mikadoi* (KX276658), *A. dauricus* (KJ402277) и *A. schrenckii* (MH973728- MH973734, KX276660, KX276659, KF150287, KC905169, KC820796). Также к анализу привлечён зелёный осётр *A. medirostris* (NC\_028405), который является генетически наиболее близким сахалинскому осетру. С помощью функции *slidingWindow* пакета Spider к матрице последовательностей был применён алгоритм скользящего окна с интервалом 25 нуклеотидов, формирующий на основе массива фрагменты длиной 100 нуклеотидов. Далее для сформированных фрагментов с помощью функции *dist.dna* пакета APE были рассчитаны средние значения генетических *p*-расстояний. По результатам анализа построен график, отражающий распределение значений дивергенции вдоль митохондриального генома осетров (Рисунок 1). На основе выбранных фрагментов в программе DECIPHER (Wright et al., 2014) выполнен поиск видоспецифичных праймеров – до 8 пар на каждый фрагмент. Далее на основе каждой пары праймеров проводили запуск алгоритма Primer-BLAST. В качестве референса отдельно в разных запусках использовали область GenBank, ограниченную таксоном Actinopterygii (лучепёрые рыбы), а также таксоном Acipenseridae (осетровые). Дополнительно была выполнена проверка праймеров с использованием локальных референсных последовательностей полного митохондриального генома от представителей рода *Acipenser*. Результаты оценки праймеров сведены в таблицу (Таблица 1).

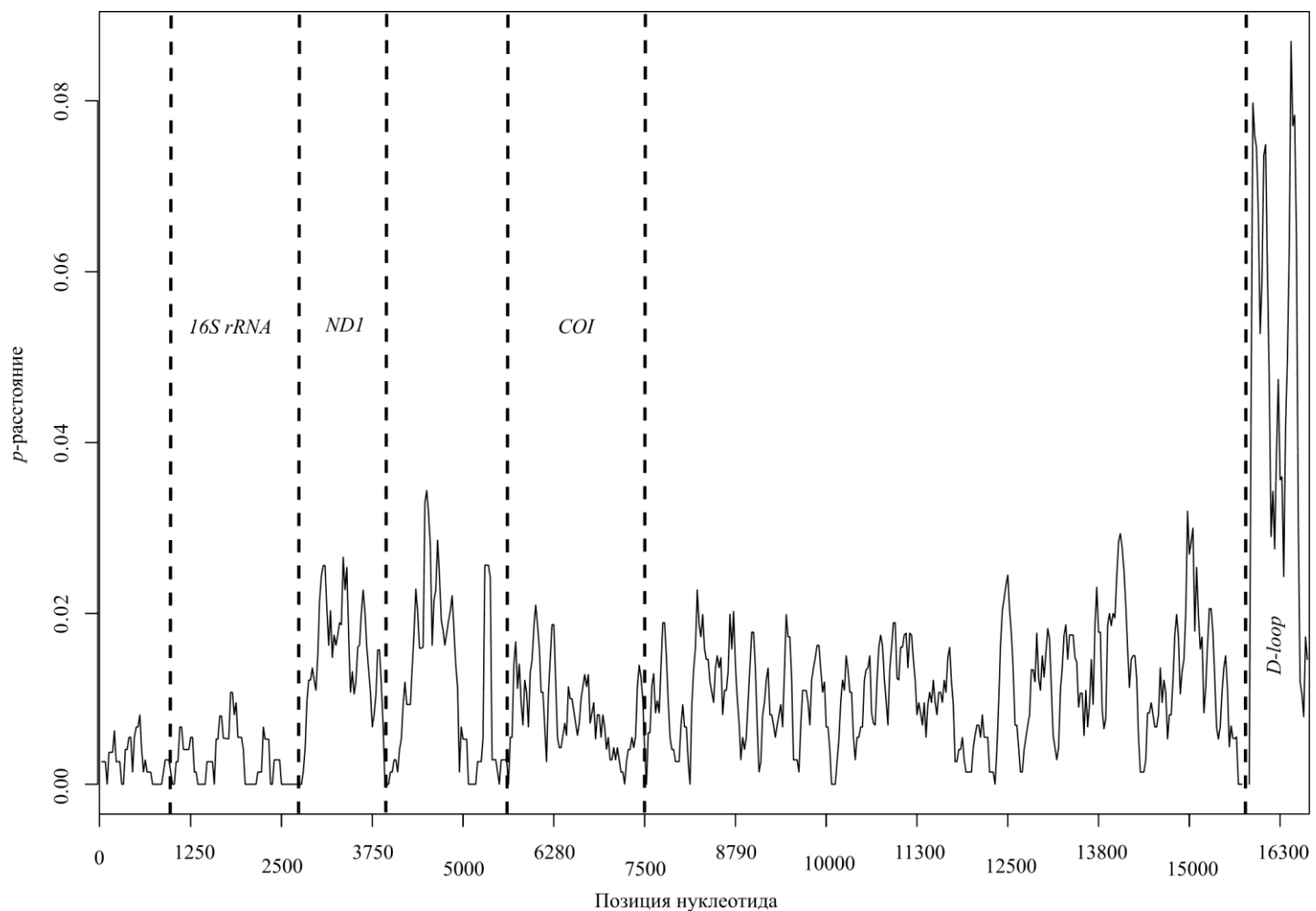


Рисунок 1. Распределение значений дивергенции (*p*-расстояние) вдоль 15 последовательностей митохондриального генома 4 видов осетров. Анализ выполнен с помощью алгоритма скользящего окна. Вертикальными прерывистыми линиями обозначены границы фрагментов, на основе которых выполнена разработка видоспецифичных праймеров.

## Результаты

Наибольшей специфичностью к *A. mikadoi* обладают праймеры, сформированные на основе фрагмента *D-loop*, который является источником наибольшего количества взаимных нуклеотидных различий среди рассматриваемых видов осетров (см. Рисунок 1, а также Шедько, 2017). Он не обнаруживает совпадений среди других таксонов лучепёрых рыб, при этом выявляя от 1 до 2 видов осетров помимо собственно сахалинского осетра. Именно этот фрагмент даёт единственное сочетание праймеров, которое позволяет не только отделить *A. mikadoi* от всех дальневосточных осетров, но и отличить его от наиболее близкого ему *A. medirostris*. Фрагмент *COI* выявляет только один неспецифичный вид – *A. medirostris*, однако ожидаемо обнаруживает огромное количество совпадений среди других лучепёрых рыб. В итоге наиболее удачным для безошибочной идентификации сахалинского осетра видится использование сочетания пар праймеров, разработанных на основе фрагментов *D-loop* и *COI*. Результаты экспериментальной проверки праймеров путём амплификации соответствующих фрагментов на основе тотальной ДНК сеголеток осетра из отхода Анюйского рыболовного завода приведены на рисунке 2.

Таблица 1.  $L_{amp}$  – длина амплифицируемого фрагмента, п.н.;  $T_m$  – температура плавления прямого и обратного праймеров, °C;  $S_{pn}$  – виды, обнаруживаемые по результатам поиска Primer-BLAST среди таксонов сем. Acipenseridae (не включая *A. mikadoi*);  $S_{pc}$  – количество гомологичных последовательностей, обнаруживаемых по результатам поиска Primer-BLAST среди таксонов класса Actinopterygii (не включая сем. Acipenseridae), шт.

Название Пары праймеров	Последовательности прямого и обратного праймеров, направление 5`-3`	$L_{amp}$	$T_m$	$S_{pn}$	$S_{pc}$
D-loop_114	CACTAACATGCGATTTCCTCGATACT / CAGTTGTGAATCCCTACAGTTGTT	114	56.9 / 55.2	<i>A. medirostris</i>	0
COI_219	ACTCGTCCCTAGATATTGTGCTT / GGCCTAGGAAATGTTGGGGAAAA	219	55.4 / 57.6	<i>A. medirostris</i>	379
D-loop_I	AAGGCCTGTCTAGAACATTAGGTT / CCATTCACTATTTCATTCCTCTGGGAG	308	59.46 / 60.97	–	0

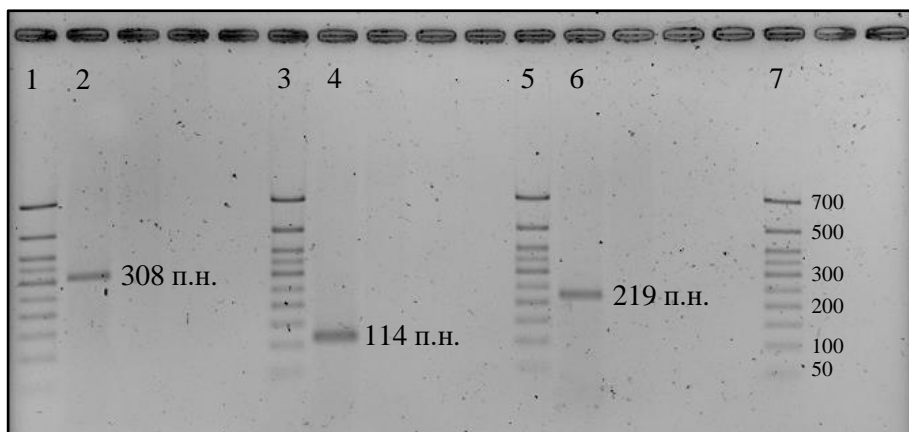


Рисунок 2. Результаты амплификации фрагментов *D-loop* (2 и 4 дорожки) и *COI* (6 дорожка) с использованием тотальной ДНК сахалинского осетра *A. mikadoi*. 1, 3, 5 и 7 дорожки – маркер длин ДНК 50+ bp DNA Ladder. Электрофорез выполнен в 2% агарозном геле, в растворе буфера TBE.

## Список литературы

- Парин Н.В., Евсеенко С.А., Васильева Е.Д. Рыбы морей России: аннотированный каталог. М.: Товарищество научных изданий КМК. 2014. 733 с.
- Nelson, J. S., Grande, T. C., & Wilson, M. V. Fishes of the World. John Wiley & Sons. 2016.
- Золотухин С.Ф. ДанныеХФТИНРО: сахалинский осетр *Acipenser mikadoi* Hilgendorf, 1892 в реке Тумнин вымирает // Бюллетень No. 7. Концепции изучения тихоокеанских лососей на Дальнем Востоке. ТИНРО. Владивосток. 2012. С. 220-221.
- Кошелев В. Н., Колпаков Н. В. Сахалинский осетр *Acipenser mikadoi* (Acipenseridae): результаты изучения и предлагаемые меры по сохранению вида // Известия ТИНРО. – 2020. – Т. 200. – №. 4. – С. 791-808.
- Mizumoto, H., Mitsuzuka, T., & Araki, H. An Environmental DNA Survey on Distribution of an Endangered Salmonid Species, *Parahucho perryi*, in Hokkaido, Japan. *Frontiers in Ecology and Evolution*, 2020. 8.
- Schenekar, T., Schletterer, M., & Weiss, S. J. Development of a TaqMan qPCR protocol for detecting *Acipenser ruthenus* in the Volga headwaters from eDNA samples. *Conservation Genetics Resources*, 2020. 1-3.
- Шедько, С.В. Низкий уровень различий митогеномов сахалинского осетра *Acipenser mikadoi* Hilgendorf, 1892 и зелёного осетра *A. medirostris* Ayeres, 1854 (Acipenseridae) свидетельствует об их недавней дивергенции. *Биология моря*, 2017. 43(2), 144-147.
- Anderson, J.T., Schumer, G., Anders, P.J., Horvath, K., & Merz, J.E. Confirmed Observation: A North American Green Sturgeon *Acipenser medirostris* Recorded in the Stanislaus River, California. *Journal of Fish and Wildlife Management*, 2018. 9(2), 624-630.
- Yusishen, M. E., Eichorn, F. C., Anderson, W. G., & Docker, M. F. Development of quantitative PCR assays for the detection and quantification of lake sturgeon (*Acipenser fulvescens*) environmental DNA. *Conservation Genetics Resources*, 2020. 12(1), 17-19.
- Wright, E. S., Yilmaz, L. S., Ram, S., Gasser, J. M., Harrington, G. W., & Noguera, D. R. Exploiting extension bias in polymerase chain reaction to improve primer specificity in ensembles of nearly identical DNA templates. *Environmental microbiology*, 2014. 16(5), 1354-1365.

## Благодарности

Исследование поддержано грантом Президента Российской Федерации (МК-305.2019.4). Благодарю сотрудников Анюйского рыболовного завода (Хабаровский край) за предоставленный материал в виде отхода сеголеток сахалинского осетра. Особая благодарность Сергею Макееву (Сахалинский филиал ФГБУ "Главрыбвод") за поддержку в развиваемом направлении.