УДК [577.113+502.5]:597.553.2(282.256.341)

АПРОБАЦИЯ МЕТОДА КОЛИЧЕСТВЕННОГО АНАЛИЗА ДНК ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ ДЛЯ ОЦЕНКИ ЗАПАСОВ И МОНИТОРИНГА ПОПУЛЯЦИЙ БАЙКАЛЬСКОГО ОМУЛЯ

Кирильчик С.В., Макаров М.М., Аношко П.Н., Астахова М.С., Смолин И.Н., Дзюба Е.В.*ФГБУН «Лимнологический институт» Сибирского отделения Российской академии наук,
Иркутск, e-mail: mmmsoft@hlserver.lin.irk.ru*

Байкальский омуль – основной промысловый вид озера Байкал, учет численности и биомассы которого является задачей рационального природопользования. Целью исследования являлась апробация метода анализа ДНК окружающей среды для оценки запасов и мониторинга популяций байкальского омуля. Запись акустических сигналов и отбор проб ДНКос проводили с ледового покрова озера синхронно на двух станциях: первая в районе м. Березовый, склоновая зона, над глубиной 400 м; вторая – в открытом Байкале над глубиной 800 м. Результаты количественного анализа показали, что основная масса ДНКос байкальского омуля сосредоточена в склоновой зоне озера, что согласуется с литературными и полученными в данном исследовании акустическими данными. В открытом Байкале максимальная концентрация ДНКос отмечена на глубине 300 м в зоне стабильной регистрации рыб. На глубинах 50 м и менее омуль не был зарегистрирован, а на глубинах свыше 350 м встречался крайне редко. Наличие ДНКос на данных глубинах может быть обусловлено вертикальным переносом водных масс, диффузным переносом и седиментацией органических взвесей. Разработка методов анализа ДНКос может служить основой исследования генетического полиморфизма рыб в скоплениях различного типа, а также в связи с их батиметрическим и пространственно-географическим распределением без необходимости проведения контрольных ловов. Таким образом, особенности распределения байкальского омуля позволяют использовать этот вид в качестве модельного для разработки методов анализа ДНКос, а также совершенствования гидроакустического метода ресурсных исследований.

Ключевые слова: гидроакустический метод, ДНК окружающей среды, *Coregonus migratorius*, оз. Байкал

TESTING METHOD QUANTITATIVE eDNA ANALYSIS FOR STOCK ASSESSMENT AND MONITORING OF BAIKAL OMUL POPULATIONS

Kirilchik S.V., Makarov M.M., Anoshko P.N., Astakhova M.S., Smolin I.N., Dzyuba E.V.*Limnological Institute, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Irkutsk,
e-mail: mmmsoft@hlserver.lin.irk.ru*

The Baikal omul is the main commercial fish species of Lake Baikal. Assessment of its stock size and distribution pattern is the important task of rational nature management. The aim of the study was the approbation of the environmental DNA (eDNA) method for estimating the stocks and monitoring the populations of the Baikal omul. Acoustic echosounding and water sampling were simultaneously carried out from the ice cover of the lake at two stations: the first in the area of Cape Berezovy, the slope zone with 400 m depth; the second – in the open Baikal with 800 m depth. Quantitative real-time PCR analysis showed a significantly higher level of Baikal omul eDNA concentration in the slope of the lake, which is consistent with previous publications and acoustic data obtained in this study. In the open Baikal, the maximal eDNA concentration was recorded at a depth of 300 m in the zone of stable fish registration. At depths of 50 m and less, the omul was not recorded, and at depths over 350 m it was registered extremely rare. The presence of eDNA at these depths may be due to vertical transport of water masses, diffuse transport and sedimentation of organic suspended matter. The development of methods for eDNA analysis can serve as a basis for studying genetic polymorphism of fish in various types of congestions, and also in connection with their bathymetric and spatial-geographical distribution without control fishing. Thus, the features of the Baikal omul distribution allows to use this species as demonstrative for the development of eDNA analysis methods, as well as for improving the hydroacoustic methods of research.

Keywords: hydroacoustic method, environmental DNA, *Coregonus migratorius*, Lake Baikal

В настоящее время в мировой науке активно развиваются методы обнаружения позвоночных животных (в частности, рыб) в пробах воды с использованием ДНК окружающей среды (environmental DNA) [1]. ДНК окружающей среды (ДНКос) представляет собой ДНК, выделенную из образцов воды, почвы, воздуха и пр. Предполагается, что основным источником ДНКос животных служат продукты жизнедеятельности. Использование этого инструмента особенно актуально при мониторинге ареала обитания редких и исчезающих видов

рыб и водных беспозвоночных. Кроме этого, потенциал применения данного метода заключается в повышении чувствительности обнаружения и эффективности оценок видового состава гидробионтов в полевых условиях в труднодоступных водоемах [2]. Таким образом, преимущество метода заключается также в том, что позволяет оперативно получать полную информацию о биоте водоема и необходимо при сжатых сроках выполнения полевых работ, ограничивающих тщательный облов рыб [3–5]. Метод активно развивается в трех направ-

лениях: обнаружение находящихся под угрозой исчезновения видов, отслеживание инвазивных видов и оптимизация методов в полевых и лабораторных условиях [6–8].

Байкальский омуль *Coregonus migratorius* (Georgi, 1775) занимает одно из центральных звеньев пелагической трофической цепи Байкала и является основным объектом промысла. Актуальность более тщательного исследования состояния запасов этого вида в современный период определяется снижением его численности. В связи с этим использование методов мониторинга, не требующих проведения отлова рыб, становится приоритетным. Наряду с гидроакустическим методом, для оценки биомассы гидробионтов в настоящее время активно развивается метод количественного анализа ДНКос [9, 10 и др.]. Мы полагаем, что сочетание использования этих методов позволит существенно расширить наши знания о современном состоянии популяций рыб озера Байкал.

Цель исследования: апробация метода анализа ДНК окружающей среды для оценки запасов и мониторинга популяций байкальского омуля.

Материалы и методы исследования

Экспериментальные работы проводились с 26 по 30 марта 2018 г. на акватории озера Байкал, разрез пос. Листвянка – пос. Танхой с ледового покрова. Запись акустических сигналов и отбор проб ДНКос Байкала проводили синхронно на двух станциях: первая в районе м. Березовый, склоновая зона, над глубиной 400 м (51.831680N, 104.884533E); вторая – в открытом Байкале над глубиной 800 м (51.787013N, 104.942853E). В работе использовали гидроакустический комплекс, выполненный на базе эхолота Furuno FCV1100 (Япония) с гидроакустическими антеннами типа «один луч». Параметры эхолота в период проведения съемки: длительность зондирующего импульса 3 мс, частота зондирования 2 Гц. Низкочастотная антенна: диаграмма направленности по уровню – 3 дБ 24° частота 28 кГц, высокочастотная антенна – 12°, частота 200 кГц. Калибровка эхолота проводилась по стандартной схеме с использованием калибровочных медных сфер [11].

Отбор проб и выделение ДНКос. Пробы воды (по 1 л каждая) на первой станции отбирались на горизонтах 25 и 250 м, на второй – 50, 300 и 400 м. Взятый объем воды фильтровали через стеклянный фильтр диаметром 47 мм и размером пор 0,7 мкм (Whatman, GE Healthcare Life Sciences). Выделение ДНКос из фильтров проводилось методом, предложенным ранее [12].

Полимеразная цепная реакция. Для проведения анализа использовали фрагмент гена NADH4 митохондриальной ДНК. Праймеры 10219CpelMtF 5'-ctatccctctgggcacttcaaat и 10341CpelMtR 5'-taacattgagaaggttgagct инициировали синтез ампликона 167 нуклеотидов. Количественную ПЦР (qPCR) проводили в 10 мкл реакционной смеси, содержащей 0,5U AmpliTaq Gold DNA Polymerase (Applied Biosystems),

1 x ПЦР буфер, 2 mM MgCl₂, 0,2 mM каждого dNTP, 0,2 uM R и F праймеры, 0,25 x EvaGreen и 0,5–20 нг ДНК. Амплификацию проводили на LightCycler® 96 (Roche Life Science). Режим амплификации: удержание – 95°C (10 мин); циклирование – 95°C (10 сек), 62°C (15 сек), 72°C (10 сек, детекция флуоресценции), 50 циклов; плавление – 62–95°C. Для проведения количественных оценок использовали 10-кратные разведения ДНК байкальского омуля. Максимальное разведение, при котором не было ампликона, принимали за 1 молекулу целевого фрагмента. Нуклеотидные последовательности полученных фрагментов ДНК определяли прямым секвенированием с помощью набора BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit на генетическом анализаторе 3500 Genetic Analyzer (Thermo Fisher Scientific). Контроль качества продукта амплификации осуществляли с помощью техники плавления с высоким разрешением (HRM).

Результаты исследования и их обсуждение

В работе представлены эхограммы, иллюстрирующие вечернее распределение байкальского омуля в подледный период (рис. 1 и 2). Ранее специальные исследования распределения байкальского омуля с применением гидроакустической техники с ледового покрова озера не проводились. На первой станции зарегистрированы скопления рыб в диапазоне глубин 50–100 м в склоновой зоне и единичные экземпляры на глубинах до 300 м (рис. 1). На второй станции, расположенной в открытом Байкале, были отмечены единичные особи байкальского омуля в диапазоне глубин 50–300 м (рис. 2).

По данным гидроакустических съемок, проводимых после распада льда, в период зимней температурной стратификации вод, также было отмечено наличие скоплений и более высоких концентраций рыб в присклоновой зоне и над возвышениями дна, в том числе на подводных банках [13].

Для зимне-весеннего распределения характерна концентрация байкальского омуля в присклоновой зоне на глубине 100–350 м, его рассредоточение в нижних горизонтах эпипелагиали и практическое отсутствие в верхнем 50 м слое как у берега, так и в открытых районах. Наличие плотных скоплений, свидетельствующих о реализации стайного поведения рыб в открытых водах, также было зафиксировано преимущественно на глубинах 50–100 м. В период весеннего прогрева прибрежных и поверхностных вод Байкала по данным гидроакустических съемок было отмечено наличие двуслойного распределения омуля в толще вод озера – в слоях 50–150 и 160–350 м, обусловленное морфо-экологической внутривидовой дифференциацией рыб [13].

Рис. 1. Скопления байкальского омуля в диапазоне глубин 50–100 м, на первой станции 26 марта 2018 г. Эхограмма построена по данным низкочастотного канала (28 кГц)

Рис. 2. Разреженное скопление байкальского омуля в диапазоне глубин 50–300 м, на второй станции 28 марта 2018 г. Эхограмма построена по данным низкочастотного канала (28 кГц)

Как показали результаты секвенирования с праймерами 10219CpелMtF и 10341CpелMtR, используемый фрагмент ДНК гомологичен фрагменту NADH4 байкальского омуля. Плавление с высоким разрешением показало, что среди проанализированных образцов присутствуют как мономорфные, так и полиморфные пробы ДНКос (рис. 3). Опреде-

ление нуклеотидных последовательностей показало, что полиморфные пробы представлены фрагментами с 1–3 вариабельными сайтами (G/C или A/T).

Генетический полиморфизм байкальского омуля определяется количеством речных систем, в которых он размножается, а также дифференциацией особей по протяженности

нерестовых миграций. Ранее анализ репродуктивной разобщенности, морфологической и биологической разнокачественности популяций байкальского омуля позволил объединить их в морфоэкологические группы (МЭГ): 1) пелагическая (многотычинковая), 2) прибрежно-пелагическая (среднетычинковая) и 3) придонно-глубоководная (малотычинковая) [14]. В зимне-весенний период (май – июнь) омуль всех МЭГ в местах основных скоплений обитает в придонных слоях воды. Однако часть его рассредоточена в открытых водах, в том числе над максимальными глубинами. Наличие среди проанализированных образцов как мономорфных, так и полиморфных проб ДНКос, возможно, подтверждает совместное обитание байкальского омуля разных МЭГ в зимний период. Результаты количественного анализа показали, что основная масса ДНКос омуля сосредоточена в склоновой зоне (рис. 4). При этом на глубинах выше 25 м концентрация ДНКос почти в два раза выше, чем на 250 м, что возможно в случае прохождения стаи рыб, либо апвеллинга генетического материала с потоком пузырьков газа, выделяемого омулем. В открытом Байкале, напротив – градиент концентрации соответствует зимнему батиметрическому распределению омуля: максимальное количество ДНКос сосредоточено на глубине 300 м в зоне стабильной регистрации рыб. На глубинах 50 м и менее омуль не был зарегистрирован, а на глубинах свыше 350 м встречался крайне редко. Наличие ДНКос на данных глубинах может быть обусловлено вертикальным переносом водных масс, диффузным переносом и седиментацией органических взвесей.

Проблемой определения численности байкальского омуля является мозаичность

распределения и динамичность скоплений в рыбопромысловых районах, где сосредоточены основные запасы. По результатам проведенных в 2000–2003 гг. гидроакустических съемок межгодовые колебания численности омуля на обследованных акваториях составляли от 183 до 448 экз/га, биомассы – 26–99 кг/га или в пересчете на всю обследованную акваторию – 2,9–13,3 тыс. т [15]. Колебания оценок численности в четыре раза могут объясняться методическими просчетами при планировании учетных работ. Байкальский омуль – активно мигрирующий вид со сложной внутривидовой структурой. Сезонное распределение и миграции различных МЭГ имеют свои особенности, которые тем не менее не являются строго специфичными. В скоплениях и рассредоточенной части популяции встречаются особи разных МЭГ. По данным гидроакустических съемок было установлено, что байкальский омуль присутствует повсеместно в зоне эпи- и мезопелагиали до глубин 350–400 м по всей акватории озера, включая центральные глубоководные части всех трех котловин. В зимне-весенний период байкальский омуль пространственно обособлен и практически не пересекается с другими видами пузырных рыб, обитающими в прибрежной зоне, преимущественно до изобаты 50 м. Эти специфичные особенности экологии делают его уникальным объектом для решения методических вопросов применения гидроакустики и анализа ДНКос с целью разработки методов мониторинга и оценки запасов рыб. Оба подхода дополняют друг друга и позволяют проводить корректировку в случае исследования активно мигрирующих видов.

Рис. 3. Результаты плавления с высоким разрешением. Красным и синим цветом обозначены полиморфные и мономорфные пробы соответственно

Рис. 4. Количество копий ДНКос байкальского омуля в пробах (копий ДНК целевого фрагмента на литр). Синим цветом обозначена присклонная зона над глубиной 400 м, красным – зона открытого Байкала над глубиной 800 м

Заклучение

Апробация метода анализа ДНК окружающей среды для оценки запасов и мониторинга популяций байкальского омуля показала, что выявленные при помощи гидроакустического метода особенности его распределения позволяют использовать этот вид в качестве модельного для разработки методов анализа ДНКос. Оба подхода дополняют друг друга и позволяют проводить корректировку в случае исследования активно мигрирующих видов. Разработка методов анализа ДНКос может служить основой исследования генетического полиморфизма рыб в скоплениях различного типа, а также в связи с их батиметрическим и пространственно-географическим распределением. В современный период использование методов мониторинга, не требующих проведения контрольных отловов, является приоритетным в связи со снижением численности байкальского омуля.

Работа выполнена в рамках темы 0345-2016-0002 (AAAA-A16-116122110066-1) «Молекулярная экология и эволюция живых систем Центральной Азии в условиях глобальных экологических изменений».

Список литературы

1. Ficetola G.F., Miaud C., Pompanon F., Taberlet P. Species detection using environmental DNA from water samples. *Biol. Lett.*, 2008, vol. 4, pp. 423–425.
2. Goldberg C.S., Strickler K.M., Pilliod D.S. Moving environmental DNA methods from concept to practice for monitoring aquatic macroorganisms. *Biological Conservation*, 2015, vol. 183, pp. 1–3.
3. Sigsgaard E.E., Carl H., Moller P.R., Thomsen P.F. Monitoring the near-extinct European weather loach *Misgurnus fossilis* in Denmark by combining traditional fishing surveys and environmental DNA from water samples. *Biol. Conserv.*, 2015, vol. 183, pp. 46–52.

4. Hanfing B., Handley L.L., Read D.S., Hahn C., Li J., Nichols P., Blackman R.C., Oliver A., Winfield I.J. Environmental DNA metabarcoding of lake fish communities reflects long-term data from established survey methods. *Mol. Ecol.*, 2016, vol. 25, no 13, pp. 3101–3119.

5. Yamamoto S., Minami K., Fukaya K., Takahashi K., Sawada H., Murakami H., et al. Environmental DNA as a 'Snapshot' of fish distribution: a case study of Japanese Jack Mackerel in Maizuru Bay, Sea of Japan. *PLoS One*, 2016, vol. 11, no 3, e0149786.

6. Mahon A.R., Jerde C.L., Galaska M., Bergner J.L., Chadderton W.L., Lodge D.M., Hunter M.E., Nico L.G. Validation of eDNA surveillance sensitivity for detection of Asian carps in controlled and field experiments. *PLoS One*, 2013, vol. 8, e58316.

7. Wilcox T.M., McKelvey K.S., Young M.K., Jane S.F., Lowe W.H., Whiteley A.R., Schwartz M.K. Robust detection of rare species using environmental DNA: the importance of primer specificity. *PLoS One*, 2013, vol. 8, e59520.

8. Barnes M.A., Turner C.R., Jerde C.L., Renshaw M.A., Chadderton W.L., Lodge D.M. Environmental conditions influence eDNA persistence in aquatic systems. *Environ. Sci. Technol.*, 2014, vol. 48, pp. 1819–1827.

9. Takahara T., Minamoto T., Yamanaka H., Doi H., Kawabata Z. Estimation of Fish Biomass Using Environmental DNA. *PLoS One*, 2012, vol. 7, no 4, e35868.

10. Thomsen P.F., Moller P.R., Sigsgaard E.E., Knudsen S.W., Jorgensen O.A., Willerslev E. Environmental DNA from Seawater Samples Correlate with Trawl Catches of Subarctic, Deepwater Fishes. *PLoS One*, 2016, vol. 11, no 11, e0165252.

11. Simrad EK60: Reference Manual. – SIMRAD, Norway. 2012. 253 p.

12. Miya M., Minamoto T., Yamanaka H., Oka S.I., Sato K., Yamamoto S., Sado T., Doi H. Use of a Filter Cartridge for Filtration of Water Samples and Extraction of Environmental DNA. *J. Vis. Exp.*, 2016, vol. 117. DOI: 10.3791/54741.

13. Гидроакустический учет ресурсов байкальского омуля / Н.Г. Мельник, Н.С. Смирнова-Залуи, В.В. Смирнов [и др.] / науч. ред. В.И. Кудрявцев, Е.В. Дзюба. – Новосибирск: Наука, 2009. – 244 с.

14. Смирнов В.В. Омули Байкала / В.В. Смирнов, И.П. Шумилов. – Новосибирск: Наука, 1984. – 160 с.

15. Кудрявцев В.И., Дегтев А.И., Соколов А.В. Об особенностях количественной оценки состояния запасов байкальского омуля гидроакустическим методом // Рыбное хозяйство. – 2005. – № 3. – С. 66–69.