



УДК 575.22

Промысловые виды и их биология

Апробация метода видовой идентификации тихоокеанских лососей р. *Oncorhynchus* по микросателлитным маркерам на рыбной продукции промышленного производства

А.Е. Лапшина¹, Д.А. Зеленина², Н.В. Колпаков¹

¹ Сахалинский филиал ГНЦ РФ ФГБНУ «ВНИРО» («СахНИРО»), ул. Комсомольская, 196, Южно-Сахалинск, 693023

² Всероссийский научно-исследовательский институт рыбного хозяйства и океанографии (ГНЦ РФ ФГБНУ «ВНИРО»), Окружной проезд, 19, Москва, 105187

E-mail: lapshinae@sakhniro.vniro.ru

SPIN-код: Лапшина А.Е. – 6972-5486; Зеленина Д.А. – 6220-3615; Колпаков Н.В. – 9889-6927

Цель работы: провести апробацию предложенной коллективом авторов под руководством Л.А. Животовского методики видовой идентификации тихоокеанских лососей рода *Oncorhynchus* по микросателлитным маркерам на рыбной продукции промышленного производства.

Материалы и методы: материалом для проведения исследования послужили образцы готовой продукции из тихоокеанских лососей, реализуемой в торговых точках острова Сахалин. Для контроля результатов микросателлитного анализа, видовую принадлежность исследуемых образцов проверяли с помощью ДНК-штрихкодирования.

Новизна: проведённые исследования показали применимость методики для определения видового происхождения различной продукции из тихоокеанских лососей: солёной, копчёной, вяленой, подвергшейся глубокой переработке (консервы), а также икры. Помимо этого, методика даёт возможность выявить видовой состав неструктурированной смеси (фарша и полуфабрикатов из него).

Результаты: успешно проведено видовое определение всех привлечённых к исследованию вариантов продукции из тихоокеанских лососей, включая продукцию глубокой переработки и смешанный фарш из нескольких видов рыб. Исключение составила продукция из радужной форели. Для наиболее ценных видов тихоокеанских лососей – нерки, симы, кижуча и чавычи – выявлен ряд случаев несоответствия принадлежности рыбной продукции заявленному продавцами виду. Интересно, что вся исследованная продукция из чавычи оказалась радужной форелью, и выявленная у неё триплоидность указывает на аквакультурное происхождение этих рыб.

Практическая значимость: в отличие от широко используемого ДНК-штрихкодирования, микросателлитный анализ применим для исследования практически всех возможных типов продукции из тихоокеанских лососей рода *Oncorhynchus* поскольку позволяет проводить детекцию образцов, содержащих сильно фрагментированную ДНК, а также смесь ДНК разных видов, что делает данный подход перспективным для применения в генетических лабораториях, осуществляющих анализ рыбной продукции.

Ключевые слова: микросателлитный анализ, ДНК-штрихкодирование, видовое определение, продукция из тихоокеанских лососей, фальсификат.

Evaluating a method for identifying Pacific salmon of the genus *Oncorhynchus* using microsatellite markers in industrial fish products

Anna E. Lapshina¹, Daria A. Zelenina², Nikolai V. Kolpakov¹

¹ Sakhalin branch of VNIRO («SakhNIRO»), 196, Komsomolskaya, Yuzhno-Sakhalinsk, 693023, Russia

² Russian Federal Research Institute of Fisheries and Oceanography («VNIRO»), 19, Okruzhnoy proezd, Moscow, 105187, Russia

The goal of this study is to assess a method for identifying salmon of the genus *Oncorhynchus* using microsatellite markers developed by a team led by L.A. Zhivotovsky. This method was applied to fish products intended for commercial sale.

Materials and Methods: The study utilized samples of processed salmon products available at retail outlets on Sakhalin Island. To verify microsatellite analysis, the species identity of the samples was confirmed using DNA barcoding.

Novelty: The studies conducted have shown that the method is effective in determining the species origin of various salmon products, including salted, smoked, dried, highly processed items (such as canned salmon) and caviar. Additionally, this method can identify the species composition of unstructured mixtures, such as minced meat and its semi-finished products.

Results: we successfully identified the species of all commercially produced Pacific salmon products analyzed in this study, including highly processed items and mixed minced meat from multiple fish species. However, we encountered difficulties with mislabeled rainbow trout products. We found several cases where the fish products did not match the species indicated by the sellers. This discrepancy was most notable among the valuable Pacific salmon species: sockeye salmon, masu salmon, coho salmon, and chinook salmon. It is important to highlight that all the chinook salmon products tested were found to be rainbow trout, and the triploidy detected in these samples suggests their origin is from aquaculture.

Practical significance: unlike the commonly used DNA barcoding method, microsatellite analysis can be applied to a wide range of products from Pacific salmon of the genus *Oncorhynchus*. This approach is particularly advantageous because it can detect samples with highly fragmented DNA as well as mixtures of DNA from different species. Therefore, microsatellite analysis shows promise for use in genetic laboratories that are analyzing fish products.

Keywords: microsatellite analysis, DNA barcoding, species identification, salmon products, mislabeled products.

ВВЕДЕНИЕ

ДНК-штрихкодирование (ДНК-баркодинг) прочно лидирует среди генетических методов видовой определения живых организмов в течение последних двух десятилетий. Годом его официального рождения можно считать 2003 год, когда была опубликована статья «Biological identifications through DNA barcodes» [Hebert et al., 2003], в которой было предложено использовать для видовой определения фрагмент последовательности митохондриального гена цитохромоксидазы I (COI) длиной около 650 п. н. Универсальность метода быстро и заслуженно привела к его массовому распространению.

Тем не менее, ДНК-баркодинг имеет и ряд ограничений в применении. Так, определяя вид с его помощью, невозможно, вследствие низкой внутривидовой изменчивости по локусу цитохромоксидазы I, узнать, принадлежат ли исследуемые образцы одной особи или нескольким [Rasmussen et al., 2009]. Фрагмент гена COI достаточной для определения вида длины не всегда удаётся получить из термически обработанной продукции, и тем более – из продукции глубокой переработки. Также не подходит данный метод и в случае, если исследуемый образец представлен неструктурированной смесью (фаршем) из представителей разных видов. В вышеперечисленных случаях анализ микросателлитных маркеров (или STR-маркеров; от англ. *Short tandem repeats*) оказывается более информативным.

В 2013 г. Л.А. Животовский, Е.Г. Шайхаев и М.В. Шитова опубликовали работу «Идентификация лососевых рыб по микросателлитным маркерам с использованием идентичного набора ПЦР-праймеров». Авторы предложили способ идентификации десяти видов лососевых, опробованный ими на биологических тканях рыб, не подвергавшихся промышленной переработке. Однако часто именно промышленная пере-

работка становится фактором, затрудняющим видовую идентификацию без привлечения молекулярно-генетических исследований. В этой связи мы сочли целесообразным апробировать данный метод на рыбной продукции промышленного производства, изготовленной различными способами, с целью выяснения возможности его применения в каждом случае. Для подтверждения достоверности полученных результатов каждый образец был также подвергнут ДНК-штрихкодированию.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Нами были проанализированы шесть образцов готовой продукции из кеты (*Oncorhynchus keta* (Walbaum, 1792)), включая икру, пять образцов продукции из горбуши (*O. gorbuscha* (Walbaum, 1792)), включая икру, шесть образцов продукции из нерки (*O. nerka* (Walbaum, 1792)), четыре образца продукции из кижуча (*O. kisutch* (Walbaum, 1792)), три образца продукции из чавычи (*O. tshawytscha* (Walbaum, 1792)), четыре образца продукции под неопределённым названием «Лосось», а также один образец сырого фарша промышленного производства, заявленный производителем как «Фарш из лососевых рыб». Таким образом, для осуществления молекулярно-генетического анализа была использована продукция промышленного производства из лососевых видов рыб, наиболее часто встречающаяся в торговых точках о. Сахалин. Аналогичному анализу были подвергнуты контрольные образцы биологических тканей горбуши, кеты, кижуча, сима (*O. masou* (Brevoort, 1856)), нерки и чавычи, представляющие собой фиксированные в 96%-ном этаноле фрагменты плавников, из «Биоресурсной коллекции эталонных генетических образцов водных биологических ресурсов (раздел лососевые) ГНЦ РФ ФГБНУ «ВНИРО» (УНУ «Биоресурсная коллекция ВБР ФГБНУ ВНИРО»).

Выделение и очистку ДНК осуществляли методом адсорбции на микроколонках AcroPrep™ 96 filter plate, 1 mL – 1.0 µm, glass fiber media (PALL, США) в соответствии с [Ivanova et al., 2006].

Микросателлитный анализ проводили по панели из 8 локусов, предложенной Животовским с соавторами [2013] для межвидовой дифференциации тихоокеанских лососей рода *Oncorhynchus*. В рамках данной работы праймеры были модифицированы путём присоединения флуоресцирующих меток. Амплификацию каждого локуса производили независимо, в дальнейшем смешивая ПЦР-продукты с метками разных цветов (по 4 в каждой микропробирке) в деионизированном формамиде перед загрузкой в генетический

плавление 92 °С – 10 с, отжиг праймеров 54 °С в первом цикле – 30 с, синтез ДНК 72 °С – 10 с; синтез ПЦР-продуктов (20 циклов): плавление 92 °С – 10 с, отжиг праймеров 56 °С – 30 с, синтез ДНК 72 °С – 10 с; окончательная достройка цепей: 72 °С – 5 мин. [Сошникова, Зеленина, 2023]. Данный протокол описывает так называемую ступенчатую ПЦР (touchdown PCR), и в данном случае он был удобен, так как позволял осуществлять одновременную амплификацию всех 8 локусов в одном 96-луночном планшете (12 образцов/8локусов).

Электрофоретическое разделение продуктов амплификации проводили посредством капиллярного электрофореза в генетическом анализаторе «НАНО-

Таблица 1. Праймерные последовательности для STR-анализа [Животовский и др., 2013] и выполненные нами модификации прямых праймеров

Table 1. Primer sequences for STR analysis [Zhivotovsky et al., 2013]

№ п/п	Локус	Последовательности праймеров	Флуоресцентная модификация F-праймера	Лит. источник
1	OtsG68	F: 5'-TATGAACTGCAGCTTGTATGTTAGTTTG-3' R: 5'-CATGTCGGCTGCTCAATGTATAA-3'	FAM	Williamson et al., 2002
2	Ots102	F: 5'-GGATCCAATAAGGAGTGATATAGTAG-3' R: 5'-TATCCCTTTACCATTTCCTTGCTA-3'	FAM	Nelson, Beachem, 1998
3	One103	F: 5'-AATGTTGAGAGCTATTTCAATCC-3' R: 5'-GATTGATGAATGGGTGGG-3'	TAMRA	Olsen et al., 2000
4	One109	F: 5'-GAGAGGGGAGAGAGTGTCTTTG-3' R: 5'-GTAGCATCAGCTCACTAATGGGAT-3'	TAMRA	
5	OMM1037	F: 5'-GAACGGCGACTGGATTTAATACT-3' R: 5'-CCGCTCACCTCGTCTCTTAA-3'	ROX	Rexroad III et al., 2002
6	OMM1050	F: 5'-ACCAACTGAACACAGCCTAAT-3' R: 5'-GCTGTAACATTTACAGGGATCAT-3'	ROX	
7	Oki10	F1: 5'-GAGTGCTGGACAGATTGGATT-3' R1: 5'-GGGAGCTACAGCTTTTACAATC-3'	R6G	Smith et al., 1998
8	Ssa197	F: 5'-GGGTTGAGTAGGGAGGCTTG-3' R: 5'-TGGCAGGGATTTGACATAAC-3'	R6G	O'Reilly et al., 1997

анализатор. Последовательности праймеров приведены в табл. 1.

Реакция амплификации проводилась в конечном объеме 10 мкл [67 мМ Трис-НСl (рН 8,8), 16,6 мМ (NH₄)₂SO₄, 2,5 мМ MgCl₂, 0,6 мМ dNTP, по 2 пМ каждого праймера, около 100 нг ДНК и 0,5 ед. Таq-полимеразы (Диалат)]. Для осуществления амплификации был применён следующий протокол ПЦР: предварительная денатурация ДНК 95 °С – 2 мин; синтез ПЦР-продуктов (30 циклов, в каждом из которых температура отжига праймеров снижалась на 0,2 °С): плавление 92 °С – 10 с, отжиг праймеров 60 °С в первом цикле – 30 с, синтез ДНК 72 °С – 10 с; синтез ПЦР-продуктов (10 циклов, в каждом из которых температура отжига праймеров повышалась на 0,2 °С):

ФОР 05» (Синтол, Россия), с применением маркеров молекулярного веса СД-450 и СД-600 (Синтол, Россия). Определение длин аллелей и генотипирование осуществляли с использованием программного обеспечения GeneMarker v.3.0.1 (SoftGenetics LLC)¹.

Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) в рамках ДНК-штрихкодирования осуществляли в конечном объеме 20 мкл [67 мМ Трис-НСl (рН 8,8), 16,6 мМ (NH₄)₂SO₄, 2,5 мМ MgCl₂, 0,6 мМ dNTP, 5 пМ каждого праймера, около 100 нг ДНК и 0,5 ед. Таq-полимеразы (Диалат)] в амплификаторе T100 (Bio-Rad, США) по следующей схеме: предварительная денатурация ДНК

¹ GeneMarker software. <https://www.softgenetics.com/products/genemarker/> 30.11.2025

Таблица 2. Набор праймеров проведения ДНК-штрихкодирования рыб [Ivanova et al., 2007]

Table 2. Primer set for fish DNA barcoding [Ivanova et al., 2007]

№ п/п	Локус	Последовательности праймеров	
1	VF2	TGTA AACGACGGCCAGTCAACCAACCACAAAGACATTGGCAC	
2	FishF2	TGTA AACGACGGCCAGTCGACTAATCATAAAGATATCGGCAC	Ward et al., 2005
3	FishR2	CAGGAAACAGCTATGACACTTCAGGGTGACCGAAGAATCAGAA	
4	FR1d	CAGGAAACAGCTATGACACCTCAGGGTGTCCGAARAAYCARAA	Ivanova et al., 2007
5	M13F	TGTA AACGACGGCCAGT	
6	M13R	CAGGAAACAGCTATGAC	Messing, 1983

95 °C – 2 мин.; синтез ПЦР-продуктов – 35 циклов (плавление 92 °C – 20 с, отжиг праймеров 48 °C – 30 с, синтез ДНК 72 °C – 1,5 мин.); окончательная достройка цепей: 72 °C – 10 мин. Для осуществления ПЦР использовали набор из четырёх праймеров [Ivanova et al., 2007] (табл. 2, №№ 1-4).

Результаты амплификации проверяли в 2%-ном агарозном геле.

Реакцию секвенирования проводили с использованием коммерческого набора Brilliant Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Nimagen, Нидерланды) по следующей схеме: предварительная денатурация ДНК 96 °C – 3 мин.; синтез ПЦР-продуктов – 40 циклов (плавление 94 °C – 10 с, отжиг праймеров 52 °C – 15 с, синтез ДНК 60 °C – 2,0 мин.). Для осуществления реакции секвенирования в каждую сторону использовали один из праймеров M13F или M13R (табл. 2, №№ 5-6).

Определение нуклеотидных последовательностей осуществляли на генетическом анализаторе «НАНО-ФОР-05». Хроматограммы анализировали в программе Mutation Surveyor v5.2.0.² Полученные последовательности сравнивали с уже имеющимися в международной системе Genbank с помощью биоинформатического инструмента Nucleotide BLAST³.

Байесовский кластерный анализ осуществляли в программе STRUCTURE 2.3.4 [Pritchard et al., 2000] при предполагаемом количестве генетически отличающихся групп (K) от 1 до 10.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

STR-анализ по всем предложенным Л.А. Животовским с соавторами [2013] локусам был успешно

осуществлён как для всех образцов продукции из тихоокеанских лососей, так и для контрольных образцов. Границы вариабельности размеров аллелей представлены в табл. 3, результаты апробации данного метода на продукции промышленного производства – в табл. 4.

В ряде случаев размеры аллелей вышли за указанные границы вариабельности (в табл. 3 и 4 они выделены полужирным шрифтом). Это объясняется тем, что в случае с каждым из исследованных видов авторы методики использовали для анализа рыбу из какой-либо одной реки. Так, вся исследованная ими кета была выловлена в р. Камчатка, горбуша – в р. Курилка, о. Итуруп и т. д., то есть, авторы не ставили цель охватить все возможные варианты размеров аллелей, встречающиеся по Дальнему Востоку, для каждого из видов. В этой связи появление дополнительных аллельных вариантов у рыб, выловленных в других районах или регионах, вполне закономерно.

Ещё одна причина появления дополнительных аллельных вариантов может заключаться в том, что авторы методики осуществляли анализ микросателлитных фрагментов, разделяя их в блоке неденатурирующего акриламидного геля, тогда как мы использовали для этих целей капиллярный электрофорез предварительно денатурированной ДНК. Как было показано ранее, при сравнении результатов STR-анализа, полученных при помощи генетического анализатора, с данными электрофореза в блоке полиакриламидного геля, могут наблюдаться небольшие расхождения в данных [Zelenina et al., 2005; Рубцова и др., 2016]. Результаты STR-анализа были успешно подтверждены ДНК-штрихкодированием во всех случаях, где применение этого метода было возможно. Штрихкодирование оказалось неуспешным в случае с консервированной продукцией и икрой. Очень важным является факт, что описанный анализ эффективен в случаях, когда баркодинг невозможен из-за сильной фрагментации ДНК ввиду глубокой переработки, как, например, в случае с консервированной продук-

² The Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&BLAST_SPEC=GeoBlast&PAGE_TYPE=BlastSearch 30.11.2025

³ Mutation Surveyor® DNA Variant Analysis Software. <https://www.softgenetics.com/products/mutation-surveyor/> 30.11.2025. The Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&BLAST_SPEC=GeoBlast&PAGE_TYPE=BlastSearch 30.11.2025

Таблица 3. Диапазоны размеров аллелей, п.н, согласно [Животовский и др., 2013], расширенные по результатам данной работы

Table 3. Variability of allele sizes, bp, according to [Zhivotovsky et al., 2013]

Вид	Локус							
	OMM1050	One109	Ssa197	One103	OMM1037	Ots102	OtsG68	Oki10
Кета	155- 159*	93-137	125-131	114-154	169-177	148-208	166-298	98-246
Горбуша	139	109-177	123-187	178-286- 294	173-185	224-392	138-222- 236	182-298
Нерка	152	105-149	105 -107	278-326	205-213	314	125-137	218-298
Кижуч	160-164	85	109	98-102- 106	189-193	148	170-270	102-178
Чавыча	152	89	171-291	102-110	185-193	194-330	187-255	170-342
Сима	177-317	81-109	101-125	106-142	177-209	116-224	120-212	94-194
Микижа	161-185	89	109-113	102-110	209-253	487-507	174-206	102-158
Радужная форель	167-259	89-101	105-127	106-150	193-257	350-516	164-260	110-138

Примечание. * полужирным шрифтом выделены наши данные.

Таблица 4. Результаты STR-анализа и ДНК-штрихкодирования образцов продукции из тихоокеанских лососей промышленного производства

Table 4. The results of STR analysis and DNA barcoding of industrial Pacific salmon products

№	Наименование продукта	Локусы																Вид; STR-анализ	Вид; баркодинг
		OMM1050	One109	Ssa197	One103	OMM1037	Ots102	OtsG68	Oki10										
Аллельные варианты, п. н.																			
1	Солёная горбуша в масле	139	139	125	137	145	157	234	294	173	177	254	254	152	168	246	246	Горбуша	Горбуша
2	Горбуша юкола	139	139	141	145	133	165	214	250	173	177	310	338	148	164	214	250	Горбуша	Горбуша
3	Горбуша в собств. соку, конс.	139	139	141	141	127	165	230	246	173	173	326	350	156	168	202	202	Горбуша	Не определён
4	Горбуша в томатном соусе, конс.	139	139	109	113	131	145	214	218	173	173	236	236	204	236	182	182	Горбуша	Не определён
5	Икра горбуши солёная *	139	139	117-145 (5)	141-161 (5)	198	238	173	181	350	354	164-172 (3)	186	186	Горбуша	Не определён	Горбуша	Не определён	
6	Горбуша, контроль	139	139	129	141	157	157	230	234	173	173	326	326	152	168	214	214	Горбуша	Горбуша
7	Кета холодного копчения	155	155	117	137	127	127	122	122	173	173	194	194	220	276	162	202	Кета	Кета
8	Кета горячего копчения	155	155	129	129	127	131	114	138	169	169	158	198	228	236	230	238	Кета	Кета
9	Кета вяленая	155	155	109	121	131	131	154	154	169	173	194	206	224	224	154	154	Кета	Кета
10	Юкола из кеты	155	155	109	125	127	131	114	146	169	173	176	204	176	204	182	198	Кета	Кета
11	Кета в собств. соку, конс.	155	159	117	121	127	127	114	142	169	169	206	206	168	172	134	138	Кета	Не определён
12	Икра кеты солёная	155	155	105	105	127	131	154	154	169	177	152	202	196	200	110	110	Кета	Не определён
13	Кета, контроль	155	155	105	125	131	131	122	154	169	173	154	158	194	194	218	222	Кета	Кета
14	Кижуч вяленый	155	155	109	117	131	131	138	150	169	173	194	194	168	220	162	170	Кета	Кета
15	Кижуч вяленый	155	155	105	117	127	127	130	146	169	173	194	206	168	232	162	234	Кета	Кета
16	Кижуч вяленый	160	164	85	85	109	109	106	106	189	189	148	148	186	270	118	130	Кижуч	Кижуч
17	Кижуч холодного копчения	155	155	117	127	127	131	138	142	169	169	206	206	168	276	182	182	Кета	Кета
18	Кижуч, контроль	160	160	85	85	109	109	102	106	189	189	148	148	182	270	130	146	Кижуч	Кижуч
19	Лосось слабосолёный	139	139	137	145	145	161	234	254	173	181	338	338	152	164	182	194	Горбуша	Горбуша

№	Наименование продукта	Локусы																Вид; STR-анализ	Вид; баркодинг
		OMM1050		One109		Ssa197		One103		OMM1037		Ots102		OtsG68		Oki10			
Аллельные варианты, п. н.																			
20	Лосось слабосоленый	293	293	97	97	115	125	126	126	189	193	194	202	128	164	138	178	Сима	Сима
21	Лосось вяленый	139	139	137	149	137	165	238	282	173	181	354	366	156	164	182	182	Горбуша	Горбуша
22	Лосось холодного копчения	279	279	89	101	115	123	114	118	185	189	206	222	128	148	146	154	Сима	Сима
23	Сима, контроль	249	249	89	97	115	123	114	118	189	189	224	224	128	152	138	150	Сима	Сима
24	Нерка копчено-вяленая	152	152	109	145	107	107	322	322	209	213	314	314	132	132	230	262	Нерка	Нерка
25	Юкола из нерки	152	152	113	113	107	107	278	290	205	205	314	314	132	136	258	290	Нерка	Нерка
26	Филе нерки под-копченое	152	152	133	137	107	107	278	306	205	205	314	314	132	132	238	270	Нерка	Нерка
27	Нерка солёная **	205	205	89	93	111-127 (3)	114	118	193	217	436-496 (3)	260	260	114-138 (3)	Не определён		Радужная форель		
28	Нерка вяленая	152	152	125	129	107	107	278	320	205	213	314	314	136	136	266	266	Нерка	Нерка
29	Нерка в собств. соку, конс.	164	164	85	85	105	109	102	106	189	189	148	148	204	204	122	170	Кижуч	Не определён
30	Нерка, контроль	152	152	141	149	107	107	322	322	205	213	314	314	132	136	230	230	Нерка	Нерка
31	Чавыча вяленая **	191-227 (3)	89	89	105	111	114	114	217	257	504	504	204	204	110-126 (3)	Не определён	Радужная форель		
32	Чавыча вяленая **	167-231 (3)	89	89	109	113	106-150 (3)	237	237	350	516	168	168	114	134	Не определён	Радужная форель		
33	Чавыча соленая **	167-259 (3)	89-101 (3)	109	113	106-150 (3)	233	237	496	504	164	164	114-134 (3)	Не определён	Радужная форель				
34	Чавыча контроль	152	152	89	89	269	269	106	110	185	185	214	214	196	212	290	298	Чавыча	Чавыча
35	Фарш из лососевых рыб ***	139	155	97-165 (17)	127	131	114-254 (25)	173	173	194-206 (3)	140-208 (19)	126-282 (28)	Кета, горбуша		Не определён				

Примечание. Если аллельных вариантов в образце по определённому локусу оказалось больше двух, в соответствующей ячейке через дефис обозначены аллели с минимальным и максимальным размерами, а в круглых скобках – общее число выявленных аллелей.

* в образце икры горбуши (№ 5) имеется до пяти аллельных вариантов по исследованному локусам, так как ДНК для анализа была выделена из нескольких икринок;

** у радужной форели три аллельных варианта по целому ряду локусов характерны для триплоидных аквакультурных форм (№№ 27, 31-33);

*** в образце «фарш из лососевых рыб» (№ 35) некоторые аллельные варианты закономерно исчисляются десятками, поскольку фарш изготовлен из большого числа экземпляров кеты и горбуши и гомогенизирован.

цией. Ещё одним очевидным плюсом метода является возможность определения видового состава неструктурированной смеси (фарша) из нескольких видов. Стандартная процедура баркодинга в этих случаях неприменима, и для генетической идентификации обычно используют метод ПЦР-РВ [Кузнецов и др., 2025; Шайдуллин и др., 2025] или секвенирование нового поколения – NGS [Фомина и др., 2022]. Оба метода требуют дополнительной приборной базы, и к тому же стоимость NGS-анализа существенно превышает такую у остальных.

Отдельного внимания заслуживают образцы, определить видовую принадлежность которых по микросателлитам оказалось невозможно, так как размерные варианты аллелей не попадали в предложен-

ные авторами диапазоны (табл. 3). ДНК-баркодинг показал, что все они принадлежат камчатской микиже (*O. mykiss* (Walbaum, 1792)) или её жилой форме – радужной форели. Хотя результаты только STR-анализа в данном случае не позволили осуществить видовую идентификацию, именно он выявил триплоидность данных рыб (рис. 1), проявившуюся в целом ряде локусов, что вкупе с результатами баркодинга позволяет отнести данные образцы к радужной форели аквакультурного происхождения.

Несмотря на то, что Л.А. Животовский с соавторами [2013] в своей работе указывают границы вариабельности длин аллелей для дикой камчатской микижи, в данном случае они оказались вне указанного диапазона, так как аквакультурная радужная форель

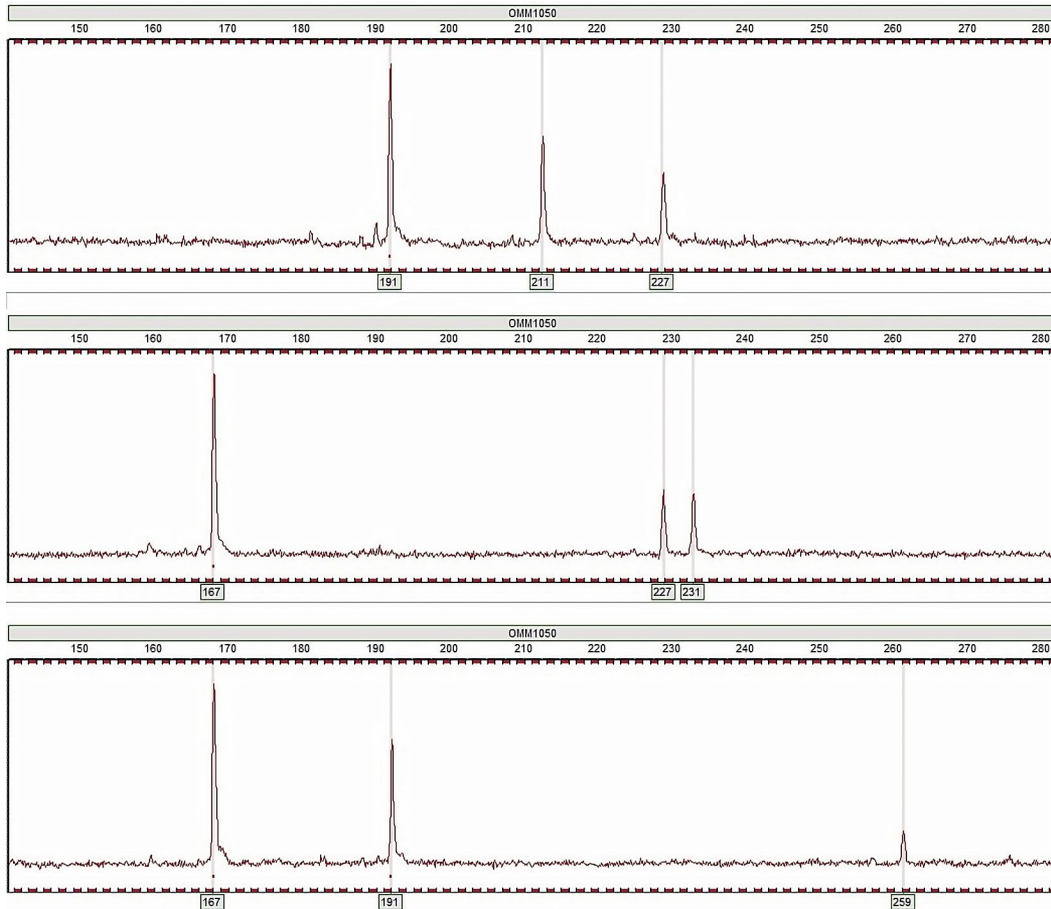


Рис. 1. Лocus OMM1050, радужная форель. Образцы 31-33 сверху вниз
Fig. 1. Locus OMM1050, rainbow trout. Samples 31-33 from top to bottom

имеет североамериканское, а не азиатское происхождение.

Апробированный метод позволил выявить небольшое количество фальсифицированных продуктов среди исследованных образцов (в табл. 4 название продукции выделено полужирным шрифтом). Фактически, фальсификат отсутствует лишь в продукции из горбуши и кеты – основных объектов промышленного вылова среди лососевых в Сахалинской области. Под неопределённым названием «Лосось» (или «Лосось вишнёвый») в торговых точках региона подразумевается сима, промышленный вылов которой запрещён, однако и среди четырёх образцов «лосося» два оказались принадлежащими горбуше.

Байесовский кластерный анализ, выполненный в программе STRUCTURE, показал, что применение тестируемой панели микросателлитных маркеров позволяет наиболее надёжно идентифицировать четыре самых массовых вида тихоокеанских лососей: горбушу (образцы 1-6, 19, 21), кету (7-15, 17), нерку (24-26, 28, 30) и кижуча (16, 18, 29): при $K=5$ образцы продукции каждого из этих видов формируют свой кластер,

в то время как образцы иной видовой принадлежности не дифференцируются и образуют единую группу. Следует подчеркнуть, что речь в данном случае идёт не о заявленной видовой принадлежности образцов, но о реальной. Увеличение количества предполагаемых кластеров до $K=7$ обеспечивает дальнейшее разделение, в результате которого внутри гомогенной ранее группы выделяются образцы сими (20, 22, 23), чавычи (34) и, с определёнными допущениями, радужной форели: два из четырёх образцов этого вида (32, 33) формируют свой кластер, в то время, как видовой принадлежность двух других (27, 31) неоднозначна.

Фальсификация продукции из лососевых видов рыб с заменой более дорогих видов на более дешёвые, а также рыб естественного происхождения – на аквакультурных, является достаточно распространённой не только в России. Так, коллектив авторов [García et al., 2024] описывает аналогичную ситуацию в Сиэтле, проанализировав посредством ДНК-баркодирования товары и блюда из лососей в суши-ресторанах и продуктовых магазинах. Имеется информация о фальсификации продукции из лососевых рыб в 10

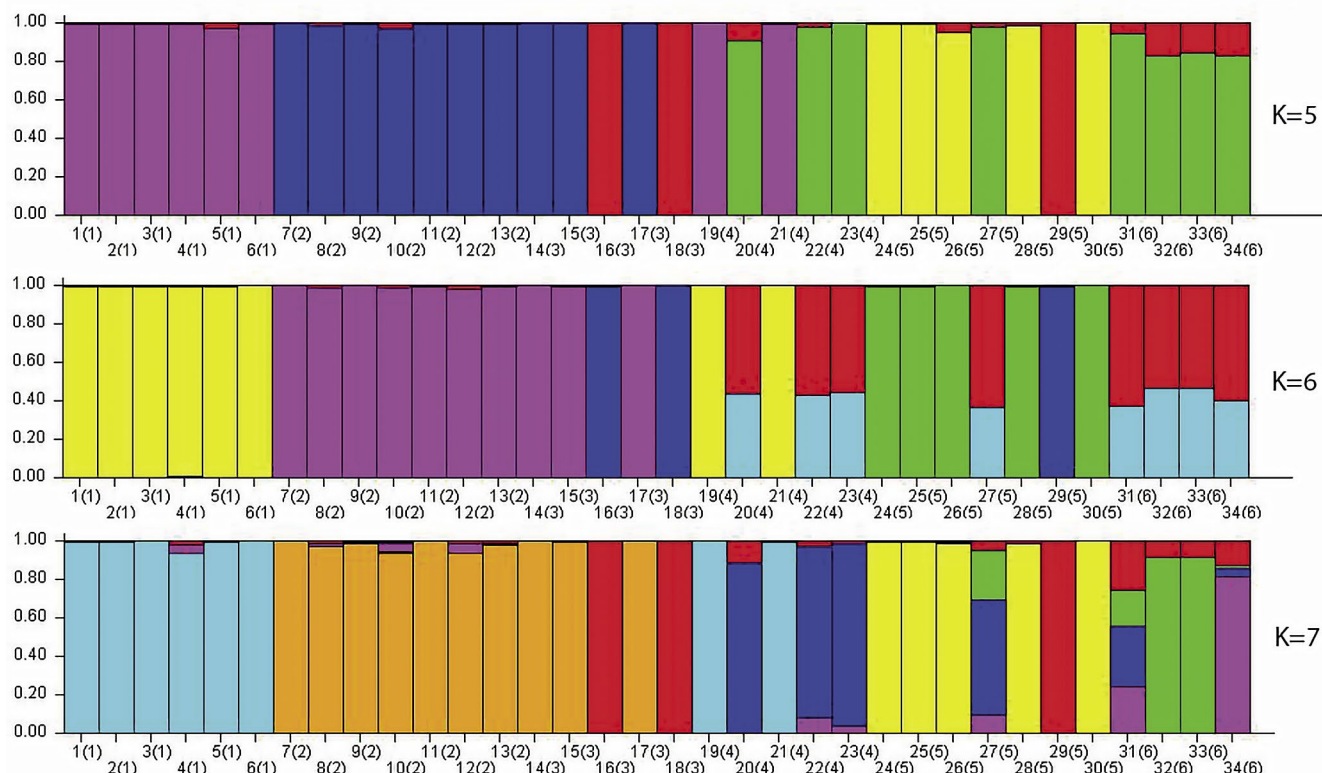


Рис. 2. Вероятность индивидуальной принадлежности 34 образцов тихоокеанских лососей к каждому из предполагаемых генетических кластеров, рассчитанная в программе STRUCTURE. Количество кластеров (K) указано справа от диаграмм. Номера образцов под диаграммами указаны в соответствии с табл. 4

Fig 2. The probability of 34 Pacific salmon samples belonging to each of the putative genetic clusters, calculated using the STRUCTURE program. The number of clusters (K) is indicated to the right of the diagrams. Sample numbers below the bar-plots are in concordance with Table 4

городах Чили, полученная в результате анализа полиморфизма длин рестрикционных фрагментов [Prida et al., 2020]. Также описаны масштабы фальсификации рыбной продукции в целом в США [Kroetz et al., 2020; Ahles, 2025] и в Европе [Mariani, 2015]. Часто выявить фальсификат без использования молекулярно-генетического анализа невозможно, и в этой связи разработка недорогих методов видовой идентификации имеет особое значение, поскольку делает саму идентификацию более доступной. STR-анализ продукции из тихоокеанских лососей может занять достойное место среди иных методов видовой идентификации и быть востребованным ввиду широкого распространения таковой продукции как в России, так и за её пределами.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Методика видовой идентификации тихоокеанских лососей посредством STR-анализа подходит для определения состава продукции из тихоокеанских лососей. В случае, когда в качестве фальсификата выступает радужная форель, для выяснения видовой принадлежности образца необходимо привлечение до-

полнительных генетических методов видовой идентификации.

Помимо этого, методика подходит для выяснения видового состава неструктурированных смесей из тихоокеанских лососей (фарша или полуфабрикатов из него), консервированной продукции и икры, что позволяет существенно снизить стоимость анализов этих видов продукции за счёт отказа от более дорогих методов видовой идентификации в пользу анализа микросателлитных маркеров.

Благодарности

Авторы выражают искреннюю благодарность за содействие в проделанной работе коллегам: Л.Н. Мюге, В.А. Сошниковой (ВНИРО), Е.В. Галаниной и Д.В. Беспалову (СахНИРО).

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм

Все применимые этические нормы соблюдены.

Финансирование

Работа выполнена в рамках бюджетного финансирования Сахалинского филиала ГНЦ РФ ФГБНУ «ВНИРО»

ЛИТЕРАТУРА

- Животовский Л.А., Шайхаев Е.Г., Шитова М.В. 2013. Идентификация биологических образцов лососевых рыб по микросателлитным маркерам с использованием идентичного набора ПЦР-праймеров // Биология моря. Т. 39. № 6. С. 459-466. ISSN: 0134-3475
- Кузнецов А.В., Царин С.А., Самотой Ю.В., Курпиченко С.А., Метелева Д.В., Пасеин С.Н. 2025. Генетическая экспертиза лососевых рыб из консервов // Новые технологии в медицине, биологии, фармакологии и экологии. Мат. Межд. конф. М.: ИИТ. С. 227-233. DOI 10.47501/978-5-6044060-5-2.227-233
- Рубцова Г.А., Пономарева Е.В., Афанасьев К.И., Шайхаев Е.Г., Холодова М.В., Павлов С.Д., Животовский Л.А. 2016. Выявление аллельных вариантов микросателлитных маркеров методами капиллярного и традиционного электрофореза // Генетика. Т. 52. № 4. С. 482-487. DOI 10.7868/S0016675816040081
- Сошнина В.А., Зеленина Д.А. 2023. Популяционно-генетическое разнообразие кижуча (*Oncorhynchus kisutch* Walbaum) на азиатской части ареала по результатам анализа микросателлитных локусов // Исследования водных биологических ресурсов Камчатки и северо-западной части Тихого океана. № 71. С. 23-33. DOI 10.15853/2072-8212.2023.71.23-33
- Тыщенко В.И., Терлецкий В.П. 2021. *Oncorhynchus mykiss* в аквакультуре: биотехнологические и генетические основы разведения и селекции // Международный научно-исследовательский журнал. № 7-1 (109). С. 141-144. DOI 10.23670/IRJ.2021.109.7.024
- Фомина Т.А., Кулешова М.Г., Минаев М.Ю., Коноров Е.А. 2022. Идентификация видов рыбы с помощью технологии секвенирования нового поколения (NGS) // Пищевые системы. Т. 5. № 2. С. 80-93. DOI 10.21323/2618-9771-2022-5-2-80-93
- Шайдуллин Р.Р., Тюлькин С.В., Гилемханов И.Ю., Садриев А.Р. 2025. Видовая идентификация мясной продукции методом ПЦР // Ученые записки Казанской академии ветеринарной медицины им. Н.Э. Баумана. Т. 261. № 1. С. 261-267. DOI 10.31588/2413_4201_1883_1_261_261
- Ahles S., Mireles DeWitt C.A., Hellberg R.S. 2025. A meta-analysis of seafood species mislabeling in the United States // Food Control. V. 171. DOI 10.1016/j.foodcont.2024.111110
- Garcia J.L., Gaspar Y.A., Djekoundade A., Dalere M., Al-awadi A.A., Allosogbe M. et al. 2024. Fishy business in Seattle: Salmon mislabeling fraud in sushi restaurants vs grocery stores // PLoS ONE. V. 19. N 11. DOI 10.1371/journal.pone.0311522
- Hebert P.D.N., Cywinska A., Ball S.L. 2003. Biological identifications through DNA barcodes // Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences. V. 270. N 1512. P. 313-321. DOI 10.1098/rspb.2002.2218.
- Ivanova N.V., de Waard J., Hebert P.D.N. 2006. An inexpensive, automation-friendly protocol for recovering high-quality DNA // Molecular Ecology Notes. V. 6. P. 998-1002. DOI 10.1111/j.1471-8286.2006.01428.x
- Ivanova N.V., Zemlak T.S., Hanner R.H., Hebert P.D.N. 2007. Universal primer cocktails for fish DNA barcoding // Molecular Ecology Notes. V. 7. N 4. P. 544-548. DOI 10.1111/j.1471-8286.2007.01748.x
- Kroetz K., Luque G.M., Gephart J.A., Donlan C.J. 2020. Consequences of seafood mislabeling for marine populations and fisheries management // Proceedings of the National Academy of Sciences. V. 117. N 48. P. 30318-30323. DOI 10.1073/pnas.2003741117
- Mariani S., Griffiths A.M., Velasco A., Kappel K. 2015. Low mislabeling rates indicate marked improvements in European seafood market operations // Frontiers in Ecology and Environment. V. 13. N 10. P. 536-540. DOI 10.1890/150119
- Messing J. 1983. New M13 vectors for cloning // Methods in Enzymology. N. 101. P. 20-78. DOI 10.1016/0076-6879(83)01005-8
- Nelson R.J., Beacham T.D. 1999. Isolation and cross species amplification of microsatellite loci useful for study of Pacific salmon // Animal Genetics. V. 30. P. 228-229. DOI 10.1046/j.1365-2052.1999.00404-4.x
- Olsen J.B., Wilson S.L., Kretschmer E.J., Jones K.C., Seeb J.E. 2000. Characterization of 14 tetranucleotide microsatellite loci derived from sockeye salmon // Molecular Ecology. V. 9. P. 2185-2187. DOI 10.1046/j.1365-294x.2000.105317.x
- O'Reilly P.T., Hamilton L.C., McConnell S.K., Wright J.M. 1996. Rapid analysis of genetic variation in Atlantic Salmon (*Salmo salar*) by PCR multiplexing of dinucleotide and tetranucleotide microsatellites // Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences. V. 53. N. 10. P. 2292-2298. DOI 10.1139/f96-192
- Prida V., Sepúlveda M., Quezada-Romegialli C., Harrod C., Gomez-Uchida D., Cid B., Canales-Aguirre C.B. 2020. Chilean salmon sushi: genetics reveals product mislabeling and a lack of reliable information at the point of sale // Foods. V. 9. N 11. DOI 10.3390/foods9111699
- Pritchard J.K., Stefens M., Donnelly P. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data // Genetics. V. 155. P. 945-959. DOI: 10.1093/genetics/155.2.945
- Rasmussen R.S., Morrissey M.T., Hebert P.D.N. 2009. DNA barcoding of commercially important salmon and trout species (*Oncorhynchus* and *Salmo*) from North America // Journal of Agricultural and Food Chemistry. N. 57. P. 8379-8385. DOI 10.1021/jf901618z
- Rexroad III C.E., Coleman R.L., Gustafson A.L., Hershberger W.K., Killefer J. 2002. Development of rainbow trout microsatellite markers from repeat enriched libraries // Marine Biotechnology. V. 4. N. 1. P. 12-16. DOI 10.1007/s10126-001-0058-6
- Smith C.T., Koop B.F., Nelson R.J. 1998. Isolation and characterization of coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*)

- microsatellites and their use in other salmonids // *Molecular Ecology*. V. 7. P. 1613-1621. DOI 10.1139/cjfas-53-4-833
- Ward R.D., Zemlak T.S., Innes B.H., Last P.R., Hebert P.D.N. 2005. DNA barcoding Australia's fish species // *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*. N. 360. P. 1847-1857. DOI 10.1098/rstb.2005.1716
- Williamson K.S., Cordes J.F., May B. 2002. Characterization of microsatellite loci in chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) and cross-species amplification in other salmonids // *Molecular Ecology Notes*. V. 2. P. 17-19. DOI 10.1046/j.1471-8286.2002.00129.x
- Zelenina D., Khrustaleva A., Volkov A., Habicht C., Smith C., Seeb J. 2005. A case study of two genetic markers for inter-laboratory collaboration: SNPs provide transportability without standardization. NPAFC Doc. No. 913. 14 p.
- REFERENCES**
- Zhivotovsky L.A., Shaikhaev E.G., Shitova M.V. 2013. Identification of salmonid fish using microsatellite markers with identical PCR-primers // *Russian Journal of Marine Biology*. T. 39. № 6. C. 447-454.
- Kuznetsov A.V., Tsarin S.A., Samotoy Yu.V., Kirpichenko S.A., Meteleva D.V., Pasein S.N. 2025. Genetic examination of canned salmon // *New technologies in medicine, biology, pharmacology and ecology. Proceedings of the International Conference*. Moscow: IIT. P. 227-233. DOI 227-233. 10.47501/978-5-6044060-5-2.227-233 (In Russ.).
- Rubtsova G.A., Ponomareva E.V., Afanasiev K.I., Shaikhaev E.G., Kholodova M.V., Pavlov S.D., Zhivotovsky L.A. 2016. A detection of allelic variants at microsatellite markers by using capillary and traditional electrophoresis // *Russian Journal of Genetics*. T. 52. № 4. C. 423-427. DOI: 10.1134/S1022795416040086
- Soshnina V.A., Zelenina D.A. 2023. Population genetic diversity of coho salmon (*Oncorhynchus kisutch* Walbaum) in the Asian part of its range based on the results of microsatellite loci analysis // *The researches of the aquatic biological resources of Kamchatka and the North-West Part of the Pacific Ocean*. N. 71. P. 23-33. DOI: 10.15853/2072-8212.2023.71.23-33. (In Russ.).
- Tyshchenko V.I., Terletsky V.P. 2021. *Oncorhynchus mykiss* in aquaculture: biotechnological and genetic foundations of breeding and selection // *International Research Journal*. № 7-1 (109). P. 141-144. DOI 10.23670/IRJ.2021.109.7.024 (In Russ.).
- Fomina T.A., Kuleshova M.G., Minaev M.Yu., Konorov E.A. 2022. Identification of fish species using next-generation sequencing (NGS) technology // *Food Systems*. V. 5. N. 2. P. 80-93. DOI 10.21323/2618-9771-2022-5-2-80-93. (In Russ.).
- Shaidullin R.R., Tyulkin S.V., Gilemkanov I.Yu., Sadriev A.R. 2025. Species identification of meat products using the PCR method // *Scientific Notes of the Kazan Academy of Veterinary Medicine named after N.E. Bauman*. V. 261. No 1. P. 261-267. DOI 10.31588/2413_4201_1883_1_261_261. (In Russ.).
- Ahles S., Mireles DeWitt C.A., Hellberg R.S. 2025. A meta-analysis of seafood species mislabeling in the United States // *Food Control*. V. 171. DOI 10.1016/j.foodcont.2024.111110
- Garcia J.L., Gaspar Y.A., Djekoundade A., Dalere M., Al-awadi A.A., Allossogbe M. et al. 2024. Fishy business in Seattle: Salmon mislabeling fraud in sushi restaurants vs grocery stores // *PLoS ONE*. V. 19. N 11. DOI 10.1371/journal.pone.0311522
- Hebert P.D.N., Cywinska A., Ball S.L. 2003. Biological identifications through DNA barcodes // *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*. V. 270. N 1512. P. 313-321. DOI 10.1098/rspb.2002.2218.
- Ivanova N.V., de Waard J., Hebert P.D.N. 2006. An inexpensive, automation-friendly protocol for recovering high-quality DNA // *Molecular Ecology Notes*. V. 6. P. 998-1002. DOI 10.1111/j.1471-8286.2006.01428.x
- Ivanova N.V., Zemlak T.S., Hanner R.H., Hebert P.D.N. 2007. Universal primer cocktails for fish DNA barcoding // *Molecular Ecology Notes*. V. 7. N 4. P. 544-548. DOI 10.1111/j.1471-8286.2007.01748.x
- Kroetz K., Luque G.M., Gephart J.A., Donlan C.J. 2020. Consequences of seafood mislabeling for marine populations and fisheries management // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. V. 117. N 48. P. 30318-30323. DOI 10.1073/pnas.2003741117
- Mariani S., Griffiths A.M., Velasco A., Kappel K. 2015. Low mislabeling rates indicate marked improvements in European seafood market operations // *Frontiers in Ecology and Environment*. V. 13. N 10. P. 536-540. DOI 10.1890/150119
- Messing J. 1983. New M13 vectors for cloning // *Methods in Enzymology*. N. 101. P. 20-78. DOI 10.1016/0076-6879(83)01005-8
- Nelson R.J., Beacham T.D. 1999. Isolation and cross species amplification of microsatellite loci useful for study of Pacific salmon // *Animal Genetics*. V. 30. P. 228-229. DOI 10.1046/j.1365-2052.1999.00404-4.x
- Olsen J.B., Wilson S.L., Kretschmer E.J., Jones K.C., Seeb J.E. 2000. Characterization of 14 tetranucleotide microsatellite loci derived from sockeye salmon // *Molecular Ecology*. V. 9. P. 2185-2187. DOI 10.1046/j.1365-294x.2000.105317.x
- O'Reilly P.T., Hamilton L.C., McConnell S.K., Wright J.M. 1996. Rapid analysis of genetic variation in Atlantic Salmon (*Salmo salar*) by PCR multiplexing of dinucleotide and tetranucleotide microsatellites // *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*. V. 53. N. 10. P. 2292-2298. DOI 10.1139/f96-192
- Prida V., Sepúlveda M., Quezada-Romegialli C., Harrod C., Gomez-Uchida D., Cid B., Canales-Aguirre C.B. 2020. Chilean salmon sushi: genetics reveals product mislabeling and a lack of reliable information at the point of sale // *Foods*. V. 9. N 11. DOI 10.3390/foods9111699
- Pritchard J.K., Stefens M., Donnelly P. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data // *Genetics*. V. 155. P. 945-959. DOI: 10.1093/genetics/155.2.945
- Rasmussen R.S., Morrissey M.T., Hebert P.D.N. 2009. DNA barcoding of commercially important salmon and trout

- species (*Oncorhynchus* and *Salmo*) from North America // Journal of Agricultural and Food Chemistry. N. 57. P. 8379-8385. DOI 10.1021/jf901618z
- Rexroad III C.E., Coleman R.L., Gustafson A.L., Hershberger W.K., Killefer J. 2002. Development of rainbow trout microsatellite markers from repeat enriched libraries // Marine Biotechnology. V. 4. N. 1. P. 12-16. DOI 10.1007/s10126-001-0058-6
- Smith C.T., Koop B.F., Nelson R.J. 1998. Isolation and characterization of coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) microsatellites and their use in other salmonids // Molecular Ecology. V. 7. P. 1613-1621. DOI 10.1139/cjfas-53-4-833
- Ward R.D., Zemlak T.S., Innes B.H., Last P.R., Hebert P.D.N. 2005. DNA barcoding Australia's fish species // Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences. N. 360. P. 1847-1857. DOI 10.1098/rstb.2005.1716
- Williamson K.S., Cordes J.F., May B. 2002. Characterization of microsatellite loci in chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) and cross-species amplification in other salmonids // Molecular Ecology Notes. V. 2. P. 17-19. DOI 10.1046/j.1471-8286.2002.00129.x
- Zelenina D., Khrustaleva A., Volkov A., Habicht C., Smith C., Seeb J. 2005. A case study of two genetic markers for inter-laboratory collaboration: SNPs provide transportability without standardization. NPAFC Doc. No. 913. 14 p.

Поступила в редакцию 24.11.2025 г.
Принята после рецензий 23.12.2025 г.