

Елена Викторовна Четвертакова^{1✉}, Владимир Анатольевич Заделенов²,
Елена Александровна Алексеева³, Анна Владимировна Заделенова⁴,
Елена Александровна Денисенко⁵

^{1,2,3,4}Красноярский государственный аграрный университет, Красноярск, Россия

²Красноярский филиал ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт рыбного хозяйства и океанографии», Красноярск, Россия

⁵АО «Красноярскагроплем», п. Солонцы, Красноярский край, Емельяновский район, Россия

^{1,5}e-ulman@mail.ru

²zadelenov58@mail.ru

³alexeeva0503@yandex.ru

⁴zadelenova@mail.ru

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОЕ ТЕСТИРОВАНИЕ ГОЛЬЦА ПО ГИПЕРВАРИАБЕЛЬНЫМ ЛОКУСАМ ГЕНОМА

Цель работы – подтверждение видовой принадлежности гольцов, обитающих в озере Мелкое. Задачи исследования: вылов гольцов в оз. Мелкое, взятие биоматериала для ПЦР-теста, определение фрагментов ДНК, характерных для вида. Вылов гольцов проводился на оз. Мелкое бассейна реки Пясины в сентябре–октябре 2022 г. ставными жилковыми сетями с ячеей 30–55 мм, длиной 30 м и высотой в посадке 2 м на глубинах от 9 до 14 м. Время экспозиции 12 часов. Температура воды – 6–7 °С. Биоматериал (мышцы хребта) в количестве семи образцов (в двух повторностях) был зафиксирован в 95 %-м этаноле, реакция проводилась в лаборатории АО «Красноярскагроплем». Перед выделением ДНК мышечную ткань вымачивали в буферном растворе трис-гидрохлорида. Для выделения ДНК из образцов биоматериала использовали набор реагентов «Экстран-2» производства фирмы ООО «НПФ Синтол», Россия. Для получения ISSR-фрагментов ДНК были использованы микросателлитные инвертированные праймеры (СТС)6G – СТС-СТС-СТС-СТС-СТС-СТС-G; (AGC)6G – AGC-AGC-AGC-AGC-AGC-AGC-G; (GAG)6C – GAG-GAG-GAG-GAG-GAG-GAG-C; (ACC)6G – ACC-ACC-ACC-ACC-ACC-ACC-G. ПЦР проводили в режиме горячий старт – 3 мин/95 °С. Далее 35 циклов в режиме: 1 мин/94 °С – денатурация; отжиг праймеров – 1 мин/60 °С; синтез ДНК – 1 мин/72 °С; достройка – 5 мин/72 °С. Результаты молекулярно-генетического анализа свидетельствуют, что распределение длин и частота встречаемости фрагментов ДНК являются характерными признаками генома гольца. Специфическими для гольца Дрягина являются фрагменты ДНК длиной от 200 до 1050 п.н. Полученные результаты будут использованы для определения видовой систематической принадлежности гольца при внедрении в аквакультуру Красноярского края.

Ключевые слова: голец Дрягина, *Salvelinus drjagini*, молекулярно-генетическое тестирование, геном, ДНК, полимеразная цепная реакция, ядерная ДНК

Для цитирования: Молекулярно-генетическое тестирование гольца по гипервариабельным локусам генома / Е.В. Четвертакова [и др.] // Вестник КрасГАУ. 2022. № 12. С. 175–180. DOI: 10.36718/1819-4036-2022-12-175-180.

Благодарности: работа выполнена при поддержке Краевого государственного автономного учреждения «Красноярский краевой фонд поддержки научной и научно-технической деятельности» в рамках выполнения научных исследований и разработок по проекту «Разработка технологии формирования ремонтно-маточных стад ценных видов рыб для их введения в аквакультуру». Код заявки: 2022020408041.

Elena Viktorovna Chetvertakova^{1✉}, Vladimir Anatolievich Zadelenov²,
Elena Alexandrovna Alekseeva³, Anna Vladimirovna Zadelenova⁴,
Elena Alexandrovna Denisenko⁵

^{1,2,3,4}Krasnoyarsk State Agrarian University, Krasnoyarsk, Russia

²Krasnoyarsk branch of the All-Russian Research Institute of Fisheries and Oceanography, Krasnoyarsk, Russia

⁵JSC Krasnoyarskagropem, Solontsy, Krasnoyarsk Region, Yemelyanovsky District, Russia

^{1,5}e-ulman@mail.ru

²zadelenov58@mail.ru

³alexeeva0503@yandex.ru

⁴zadelenova@mail.ru

MOLECULAR GENETIC TESTING OF CHAR BY HYPERVARIABLE GENOME LOCI

The purpose of the work is to confirm the species affiliation of the char living in Lake Melkoe. Objectives of the study: catching charrs in the Lake Melkoe, taking biomaterial for PCR-test, determination of DNA fragments characteristic of the species. The catch of char was carried out on Lake Melkoe basin of the Pyasina River in September–October 2022 with fixed vein networks with a mesh of 30–55 mm, 30 m long and 2 m high at a depth of 9 to 14 m. The exposure time is 12 hours. Water temperature is 6–7 °C. The biomaterial (muscles of the ridge) in the amount of seven samples (in duplicate) was fixed in 95 % ethanol, the reaction was carried out in the laboratory of AO Krasnoyarskagropem (joint-stock company). Before DNA isolation, muscle tissue was soaked in a buffer solution of tris hydrochloride. To isolate DNA from biomaterial samples, a set of reagents Ekstran-2 manufactured by OOO NPF Syntol (limited liability company), Russia, was used. Microsatellite inverted primers (CTC) were used to obtain ISSR DNA fragments (CTC)6G – CTC-CTC-CTC-CTC-CTC-CTC-G; (AGC)6G – AGC-AGC-AGC-AGC-AGC-AGC-G; (GAG)6C – GAG-GAG-GAG-GAG-GAG-GAG-C; (ACC)6G – ACC-ACC-ACC-ACC-ACC-ACC-G. PCR was performed in the hot start mode – 3 min/95 °C. Then 35 cycles in the mode: 1 min/94 °C – denaturation; primer annealing – 1 min/60 °C; DNA synthesis – 1 min/72 °C; completion – 5 min/72 °C. The results of molecular genetic analysis indicate that the length distribution and frequency of occurrence of DNA fragments are characteristic features of the char genome. DNA fragments from 200 to 1050 bp long are specific for Dryagin char. The results obtained will be used to determine the species systematic affiliation of the char when introduced into the aquaculture of the Krasnoyarsk Region.

Keywords: Dryagin's char, *Salvelinus drjagini*, molecular genetic testing, genome, DNA, polymerase chain reaction, nuclear DNA

For citation: Molecular genetic testing of char by hypervariable genome loci / E.V. Chetvertakova [et al.] // Bulliten KrasSAU. 2022;(12): 175–180. (In Russ.). DOI: 10.36718/1819-4036-2022-12-175-180.

Acknowledgments: the work has been supported by the Krasnoyarsk Regional State Autonomous Institution "Krasnoyarsk Regional Foundation for the Support of Scientific and Scientific and Technical Activities" as part of research and development under the project "Development of technology for the formation of brood stocks of valuable fish species for their introduction into aquaculture." Application code: 2022020408041.

Введение. Современный этап развития аквакультуры характеризуется поиском перспективных видов рыб, обладающих высокой пищевой ценностью, для внедрения в аквакультуру. В Красноярском крае к таким рыбам относятся представители осетровых и лососевых.

Из семейства лососевых наибольший интерес представляет голец, формирующий множество пресноводных и анадромных (миграционных) видов, объединенных родовым именем *Salvelinus*. Независимо от образа жизни и био-

логических особенностей все виды гольца являются источником красной икры и мяса с повышенной пищевой ценностью [1].

Среди озерно-речных гольцов выделяется голец Дрягина (*Salvelinus drjagini*). Впервые как вид эта форма гольца описана М.В. Логашевым в 1940 г. [2]. Он отличается от других видов (форм) крупными размерами и массой до 16 кг, что делает его привлекательным для введения в аквакультуру (рис. 1).



Рис. 1. Гольец Дрягина (фото авторов)

Как отмечалось выше, среди гольцов отмечается много видов и форм, что требует идентификации выловленных рыб при внедрении в аквакультуру [3].

Метод молекулярного тестирования по гипервариабельным локусам генома широко используется для выявления видовой и внутривидовой генетической изменчивости, идентификации популяций, пород, типов и линий животных вплоть до индивидуального генотипирования [4–7].

Цель исследования – подтверждение видовой принадлежности гольцов, обитающих в озере Мелкое.

Задачи: вылов гольцов в оз. Мелкое; взятие биоматериала для ПЦР-теста; определение фрагментов ДНК, характерных для вида.

Материалы и методы. Отлов гольцов проводился на оз. Мелкое бассейна реки Пясины в сентябре-октябре 2022 г. (рис. 2). Отлавливали ставными жилковыми сетями ячеей 30–55 мм, длиной 30 м и высотой в посадке 2 м на глубинах от 9 до 14 м. Время экспозиции 12 ч. Температура воды – 6–7 °С.

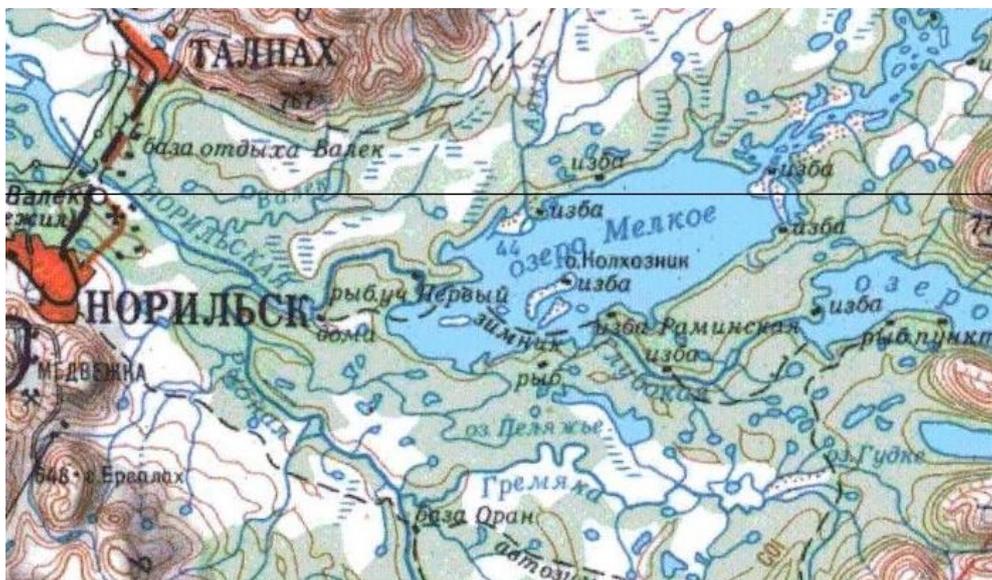


Рис. 2. Географическое положение озера Мелкое

Для проб был взят биоматериал (мышцы хребта) в количестве семи образцов (в двух повторностях), его фиксировали в 95 %-м этаноле. Исследование биоматериала было проведено в г. Красноярске в лаборатории определения качества молока и иммуногенетики АО «Красноярскгроплем».

Перед выделением ДНК мышечную ткань вымачивали в буферном растворе трис-гидрохлорида. Для выделения ДНК из образцов был использован набор реагентов «Экстран-2» производства фирмы ООО «НПФ Синтол», Россия. В протокол выделения входило: 1) внесение образцов; 2) лизис клеток; 3) осаждение

белков; 4) осаждение ДНК; 5) промывка и растворение ДНК. Хранили выделенную ядерную ДНК при температуре минус 20 °С.

При проведении ISSR-анализа был использован ряд олигонуклеотидных праймеров (затравок) для синтеза фрагментов ДНК. Праймеры представляли собой различные последовательности микросателлитов:

- (CTC)₆G – CTC-CTC-CTC-CTC-CTC-CTC-G;
- (AGC)₆G – AGC-AGC-AGC-AGC-AGC-AGC-G;
- (GAG)₆C – GAG-GAG-GAG-GAG-GAG-GAG-C;
- (ACC)₆G – ACC-ACC-ACC-ACC-ACC-ACC-G.

Были поставлены четыре варианта реакций ПЦР. В реакционную смесь добавляли один из вышеуказанных олигонуклеотидов, который служил в качестве прямого и обратного (инвертированного) праймера. В каждом случае были обнаружены в геноме и синтезированы локусы ДНК, находящиеся между указанными микросателлитными последовательностями.

ПЦР проводили в режиме горячий старт – 3 мин/95 °С. Далее 35 циклов в режиме: денатурация – 1 мин/94 °С; отжиг праймеров – 1 мин/60 °С; синтез ДНК – 1 мин/72 °С; достройка – 5 мин/72 °С.

В результате ПЦР было амплифицировано большое число фрагментов. Разделение продуктов амплификации ДНК проводили в 2,5 %

агарозном геле в присутствии интеркалирующего флуоресцентного красителя этидиум бромида (C₂₁H₂₀BrN₃). Результаты реакции визуализировали в УФ-свете с использованием тест-системы «Bio-Rad» и документировали в электронном виде. Межмикросателлитные локусы ДНК представлены на электрофореграмме дискретными полосами (ISSR-фингерпринтинг). Длины фрагментов рассчитывали с помощью компьютерного анализа с использованием программы «MS Excel» и маркера длин ДНК 100 bp + 1,5 Kb + 3 Kb (НПО «Сибэнзим») в качестве референта.

Результаты и их обсуждение. Методом ПЦР с использованием микросателлитных праймеров (CTC)₆G, (AGC)₆G, (GAG)₆C, (ACC)₆G были исследованы пробы мышечной ткани семи особей гольца. По результатам электрофоретического разделения фрагментов в агарозном геле наибольшее количество фрагментов ДНК было получено с использованием микросателлитного тринуклеотидного праймера (AGC)₆G.

В результате генетического анализа с помощью праймера (AGC)₆G у семи особей были зарегистрированы на электронных снимках всего 35 фрагментов длиной от 200 до 2000 п.н., визуально различимых и формирующих выраженные пики при компьютерном сканировании гелей (рис. 3).

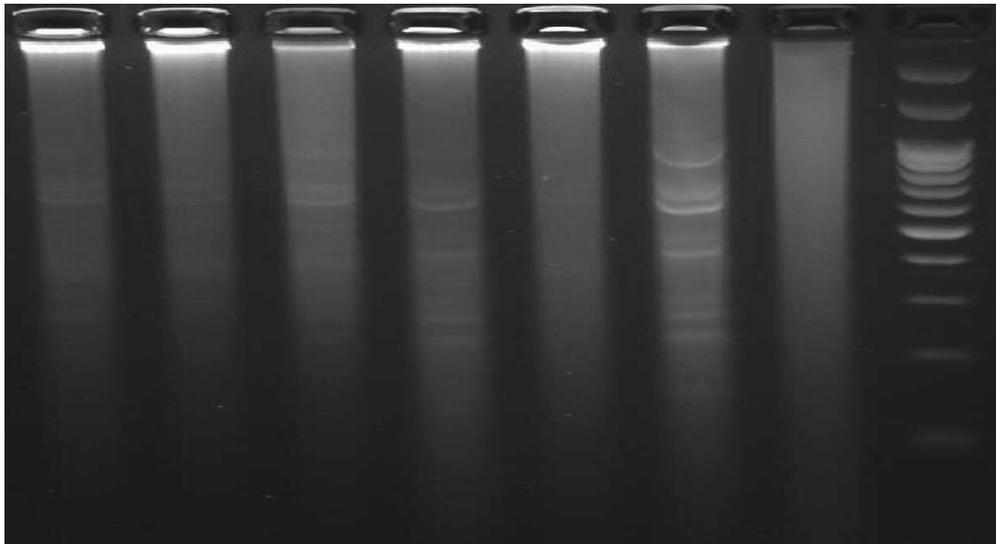


Рис. 3. Межмикросателлитные фрагменты ДНК гольца (на дорожке 8 (справа) находится маркер длин ДНК 100 bp + 1,5 Kb + 3 Kb (НПО «Сибэнзим»)

Во всех образцах встречаются семь маркерных фрагментов ДНК длиной от 200 до 1000 п.н.

Распределение длин маркерных фрагментов приведено в таблице.

Распределение длин маркерных ISSR-фрагментов ДНК у гольца

Интервал длин фрагментов	Количество фрагментов	Длина фрагментов
1000–1100	1	1050
700–600	2	660, 700
500–400	1	450
200–300	3	200, 260, 300

Распределение длин и частота встречаемости фрагментов ДНК являются характеристикой генома гольца.

Заключение. Для получения ISSR-фрагментов ДНК были использованы микросателлитные инвертированные праймеры, которые позволяют амплифицировать участки ДНК, расположенные между микросателлитными повторами. Метод анализа полиморфизма межмикросателлитных участков ДНК, основанный на полимеразной цепной реакции, позволил охарактеризовать множественные локусы генома гольца.

Полученные результаты молекулярно-генетического анализа представленных образцов мышечной ткани хребта гольцов свидетельствуют о том, что распределение длин и частота встречаемости фрагментов ДНК являются характерными признаками генома гольца.

Специфическими для гольца Дрягина являются фрагменты ДНК длиной от 200 до 1050 п.н.

Полученные результаты будут использованы для определения видовой систематической принадлежности гольца при внедрении в аквакультуру Красноярского края.

Список источников

1. Генетическая структура популяций северных оленей о. Колгуев Ненецкого автономного округа / Т.М. Романенко [и др.] // Достижение науки и техники АПК. 2014. № 4. С. 68–70.
2. Голец Дрягина *Salvelinus Drjagini Logashev* озера Собачьего (плато Путорана) / В.А. Заделенов [и др.] // Рыболовство и рыбное хозяйство. 2022. № 10. С. 661–672.
3. Жвакина А.Р., Ельсукова И.А., Легкобит А.П. Анализ аллелофонда кроликов отечественных пород методом ISSR-PCR //

Достижение науки и техники АПК. 2016. Т. 30, № 1. С. 72–74.

4. Кол Н.В., Лазебный О.Е. Полиморфизм ISSR-PCR-маркеров в тувинской популяции северного оленя // Генетика. 2006. Т. 42. С. 1731–1734.
5. Логашев М.В. Озеро Мелкое и его рыбохозяйственное использование // Тр. Института полярного земледелия, животноводства и промыслового хозяйства. Сер. Промысловое хозяйство. 1940. № 11. С. 7–72.
6. Тимошкина Н.Н., Водолажский Д.И., Усатов А.В. Молекулярно-генетические маркеры в исследовании внутри- и межвидового полиморфизма осетровых рыб (*Acipenseriformes*) // Экологическая генетика. 2010. Т. 8. № 1. С. 12–24.
7. Hartley S.E., Davidson W.S. Distribution of satellite DNA sequences isolated from Arctic char, *Salvelinus alpinus*, in the genus *Salvelinus* // Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences. 1994. Т. 51, № S1. С. 277–283.

References

1. Geneticheskaya struktura populyacij severnyh oleney o. Kolguev Neneckogo avtonomnogo okruga / T.M. Romanenko [i dr.] // Dostizhenie nauki i tehniki APK. 2014. № 4. S. 68–70.
2. Golec Dryagina *Salvelinus Drjagini Logashev* ozera Sobach'ego (plato Putorana) / V.A. Zadelenov [i dr.] // Rybolovstvo i rybnoe hozyajstvo. 2022. № 10. S. 661–672.
3. Zhvakina A.R., El'sukova I.A., Legkobit A.P. Analiz allelofonda krolikov otechestvennyh porod metodom ISSR-PCR // Dostizhenie nauki i tehniki APK. 2016. Т. 30, № 1. S. 72–74.
4. Kol N.V., Lazebnyj O.E. Polimorfizm ISSR-PCR-markerov v tuvinskoj populyacii severnogo olenya // Genetika. 2006. Т. 42. S. 1731–1734.

5. *Logashev M.V.* Ozero Melkoe i ego rybohozyajstvennoe ispol'zovanie // Tr. Instituta polyarnogo zemledeliya, zhivotnovodstva i promyslovogo hozyajstva. Ser. Promyslovoe hozyajstvo. 1940. № 11. S. 7–72.
6. *Timoshkina N.N., Vodolazhskij D.I., Usatov A.V.* Molekulyarno-geneticheskie markery v issledovanii vnutri- i mezhhvidovogo polimorfizma osetrovyyh ryb (*Acipenseriformes*) // `Ekologicheskaya genetika. 2010. T. 8. №. 1. S. 12–24.
7. *Hartley S.E., Davidson W.S.* Distribution of satellite DNA sequences isolated from Arctic char, *Salvelinus alpinus*, in the genus *Salvelinus* // Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences. 1994. T. 51, № S1. S. 277–283.

Статья принята к публикации 08.11.2022 / The article accepted for publication 08.11.2022.

Информация об авторах:

Елена Викторовна Четвертакова¹, профессор, заведующая кафедрой разведения, генетики, биологии и водных биоресурсов, доктор сельскохозяйственных наук, доцент

Владимир Анатольевич Заделенов², профессор кафедры разведения, генетики, биологии и водных биоресурсов; старший научный сотрудник; доктор биологических наук, профессор

Елена Александровна Алексеева³, доцент кафедры разведения, генетики, биологии и водных биоресурсов, кандидат сельскохозяйственных наук

Анна Владимировна Заделенова⁴, аспирант кафедры разведения, генетики, биологии и водных биоресурсов

Елена Александровна Денисенко⁵, заведующая лабораторией качества молока и иммуногенетики, кандидат биологических наук

Information about the authors:

Elena Viktorovna Chetvertakova¹, Professor, Head of the Department of Breeding, Genetics, Biology and Aquatic Bioresources, Doctor of Agricultural Sciences, Associate Professor

Vladimir Anatolievich Zadelenov², Professor at the Department of Breeding, Genetics, Biology and Aquatic Bioresources; Senior Researcher; Doctor of Biological Sciences, Professor

Elena Alexandrovna Alekseeva³, Associate Professor at the Department of Breeding, Genetics, Biology and Aquatic Bioresources, Candidate of Agricultural Sciences

Anna Vladimirovna Zadelenova⁴, Postgraduate Student, Department of Breeding, Genetics, Biology and Aquatic Bioresources

Elena Alexandrovna Denisenko⁵, Head of the Laboratory of Milk Quality and Immunogenetics, Candidate of Biological Sciences

