

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение
высшего образования
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

Институт фундаментальной биологии и биотехнологии

институт

Кафедра водных и наземных экосистем

кафедра

УТВЕРЖДАЮ
Заведующий кафедрой

подпись инициалы, фамилия

« ____ » _____ 20 __ Г

ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА

06.03.01 - Биология

Генетическая изменчивость байкальского хариуса (*Thymallus*
arcticus baicalensis) среднего течения р. Енисей и его притоков

Тема

Руководитель

подпись, дата

доцент, к.б.н.

должность, ученая степень

И.В. Зуев

инициалы, фамилия

Выпускник

подпись, дата

Ю.И Трубчанинов

инициалы, фамилия

Красноярск, 2023

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	3
1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	4
1.1. Общие закономерности формирования ихтиофауны в реках ...	4
1.2. Трофическая характеристика и структура популяций байкальского хариуса в реке Енисей и ее притоках	8
1.3. Методы изучения миграций популяций рыб	10
1.3.1. Методы, основанные на отлове рыб	10
1.3.2. Методы, не требующие отлова рыб	14
2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	17
2.1. Район и объекты исследования.....	17
2.2. Выделение ДНК	17
2.3. Постановка ПЦР.....	18
2.4. Статистическая обработка данных	20
2.4.1. Анализ главных компонент	20
2.4.2. ISSR-PCR анализ.....	20
3. РЕЗУЛЬТАТЫ	22
3.1. Подбор ISSR-праймеров и концентрации компонентов ПЦР-смеси.....	22
3.2. Анализ изменчивости популяций р.Енисей и его притоков ...	24
4.ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ	33
ВЫВОДЫ.....	38
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ	39

ВВЕДЕНИЕ

После зарегулирования реки Енисей с помощью Красноярской гидроэлектростанции в 1967-1971 годах температурный режим реки подвергся изменениям: средние температуры в весенне-летний период понизились, а осенне-зимние повысились по сравнению с тем что было до строительства ГЭС (Андрущенко и др., 2022; Космаков, 2001; Shaparev, 2019). Исходя из этого, коллективом авторов было выдвинуто предположение, что байкальский хариус может круглогодично обитать в русле реки Енисей, не заходя в его притоки (Андрущенко и др., 2022).

Также, исходя из данной гипотезы, ожидается, что популяции байкальского хариуса, находящиеся в притоках будут изолированы от популяции, обитающей в реке Енисей. Следствием данной изоляции, с течением времени, могут быть изменения в анатомии, морфологии и генетике (Андрущенко и др., 2022).

В рамках работы П. Ю. Андрущенко и соавторов (2022) данная гипотеза была проверена с помощью структурного анализа чешуи. Результаты их работы показали, что популяции из р.Березовка и некоторых участков р.Кача являются относительно изолированными от р.Енисей. Данная работа призвана изучить данный вопрос с помощью методов генетического анализа, а именно с помощью ISSR-PCR анализа, на основе ДНК, выделенной из хвостового плавника хариуса.

Целью данной работы является проведение сравнительного генетического анализа для популяций байкальского хариуса из р.Енисей и его притоков с использованием ISSR-PCR маркеров.

Задачи:

1. Подобрать оптимальные ISSR-праймеры и концентрацию компонентов ПЦР-смеси для байкальского хариуса
2. Сравнить популяций из р.Енисей и его притоков по результатам ISSR-PCR-анализа;
3. Дать биологическую интерпретацию полученным результатам.

1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Общие закономерности формирования ихтиофауны в реках

Реки являются одним из основных типов водоемов во внутренних водах по всему миру, наряду с озерами и водохранилищами. Их отличием от последних являются особые условия разных физических, биологических, экологических составляющих. Также реки, на всем своем протяжении, могут иметь обособленные участки, со своими особенностями и соответственно с разным видовым составом животных и растений (Sleen, Albert, 2021).

На формирование ихтиофауны в реках может влиять множество факторов, например: гидрологический режим, температурный режим, гидрохимический режим, обилие кормовой базы для рыб, а также наличие чужеродных видов и рыбный промысел (Коткин, 2012; Рафиков и др., 2015). Все эти факторы вкуче могут определять ихтиологический состав и разнообразие в реках (Sleen, Albert, 2021; Liu et al., 2021).

Гидрологический режим является одним из основных факторов формирования ихтиофауны. В реках на всем ее протяжении, как уже было сказано ранее, могут наблюдаться разные гидрологические режимы на отдельных участках. Как правило скорость течения в реках уменьшается от истока к устью (Sleen, Albert, 2021; Коткин, 2012). Данная особенность связана с тем, что, в основном, истоки рек берут свое начало в горных районах и соответственно скорость водного потока, за счет ландшафта, на данных участках, на порядок больше, чем на участках, которые локализуются на устьях рек и имеют более пологий ландшафт. Также на общий водоток может влиять ширина русла реки и ее глубина, количество и объем ее заводей и т.д. В итоге, на участках рек, где скорость потока относительно высока, могут фиксироваться реофильные виды, способные противостоять течению, посредством адаптаций к данным условиям, например, имеющие более обтекаемую форму тела или колбочкообразные образования на нем для

прикрепления к субстрату и т.д. (Sleen, Albert, 2021). Изменение гидрологического режима реки случайно (паводки) или вследствие антропогенного вмешательства (искусственное изменение направления русла рек, строительство ГЭС и т.д.) может отрицательно повлиять на данные виды, помимо очевидного уменьшения скорости водотока, существуют и другие проблемы, например, уменьшение общего количества кислорода на участках, что может привести к массовому замору реофильных видов, требовательных к кислороду, зарастание водоемов водной растительностью и общее эвтрофирование водоемов (Рафиков и др., 2015). Также стоит отметить, что общий объем и длина рек положительно коррелирует с ее видовым разнообразием (Sleen, Albert, 2021).

Также к факторам формирования ихтиофауны рек относят их температурный режим, который, в естественных условиях, также, как и гидрологический режим, может изменяться по направлению от истока к устью реки (Sleen, Albert, 2021). Наблюдается тенденция к увеличению средней температуры на участках от истока к устью реки, что связано с разностью гидрологического режима на данных участках (у истока скорость течения выше, соответственно участок не успевает нагреваться, если исток выше по высоте над уровнем моря, то не только температура воды, но и воздуха может быть ниже, чем у участках на устье), также средняя глубина и соответственно объем на участках могут влиять на среднюю температуру (глубокие места хуже прогреваются). Данная зональность по температуре формирует разные ихтиоценозы, с особыми режимами обитания, размножения и т.д. и вследствие этого, нарушение данных температурных режимов может сказаться на жизнедеятельности рыб, обитающих в данных ценозах, начиная с изменений в поведении рыб, заканчивая их гибелью. Все это приведет к изменению структуры ценозов. Также строительство плотин, ГЭС и других сооружений, влияющих на температурный режим водоемов, может привести к нарушениям температурной стратификации водоема, что может привести к нарушению сезонных перемешиваний и к отсутствию покровительственных

льдов на поверхности реки, которые в свою очередь, несут теплоизоляционную функцию (Sleen, Albert, 2021; Коткин, 2012; Рафиков, 2015; Решетников и др., 2015).

Не менее важным фактором для ихтиофауны является гидрохимическая составляющая реки, к ней относят общую жесткость воды (обычно измеряется объемом соединений кальция), общую минерализацию воды, количество биогенных элементов, общий уровень pH (Овсяный, Орехова, 2017). В естественном виде, физико-химическое состояние рек определяется составом горных пород, прилегающих к речной системе. Также, при движении вниз по течению данные условия могут меняться, так как вода подвержена перемешиванию. Помимо прилегающих горных пород, свой вклад в гидрохимическую составляющую реки могут вносить «второстепенные реки», что впадают в «первостепенную», а также сток, принесенный с поверхностных вод, подземные воды, выпадение осадков. Как уже говорилось ранее, гидрохимическая составляющая реки, как и температурная может быть прямым отражением гидрологического режима (Турсунов, 2011). Антропогенная нагрузка на реку, на данный момент является основным фактором изменения гидрохимических показателей реки (Турсунов, 2011; Родионов и др., 2019). Изменение в гидрологическом режиме, вызванное гидротехническими сооружениями, может привести к значительному изменению гидрохимического состава реки. Некоторые авторы выделяют несколько типов рек по антропогенной нагрузке на гидрохимический режим реки (Турсунов, 2011): реки с условно-естественным внутригодовым гидрохимическим режимом – малые или труднодоступные реки без каких-либо гидротехнических сооружений, имеющие либо высокий коэффициент самоочищения, либо способные самостоятельно нивелировать вредное воздействие загрязняющих веществ; реки с частично нарушенным внутригодовым гидрохимическим режимом – водотоки, сохраняющие основные гидрохимические параметры, сравнимые с естественными, но имеющие искажения в них, из-за хозяйственной деятельности человека. При

этом, как отмечают авторы, меняется не только их внутригодовой режим, но и процентное соотношение растворенных веществ (Турсунов, 2011). Также выделяют реки с полностью нарушенным гидрохимическим режимом – реки, в которых, часто, содержание химических веществ полностью зависит от хозяйственной деятельности человека. Зачастую это малые реки с полностью зарегулированным стоком.

Вселение чужеродных видов, как случайно, так и умышленно, на данный момент, является одной из наиболее актуальных проблем для ихтиоценоза любого водоема (Дгебуадзе, 2013). Переселение видов может привести к экологическому кризису, который, в свою очередь, может привести к ущербу промысловой деятельности человека, а также к снижению биологического разнообразия видов для некоторых экосистем (Кабанов, 2015; Болдырев, 2020). По данным Коткина (2012), уже на момент 2012-ого года, доля рыб-вселенцев в Красноярском вдхр. составляла 21,7%, Новосибирском – 15,4%, Кармановском - 17,9%, Зейском – 8%, Куйбышевском – 40,5%, Вилюйском – 13,6%.

Алимов и Богуцкая в своей книге «Биологические инвазии в водных и наземных экосистемах» (2004) говорят о том, что биологические инвазии, начиная с 20 века увеличивают свои количественные и качественные характеристики. Это связано прежде всего с антропогенным воздействием, которое увеличивается параллельно с индустриальными успехами человечества. Также они выделяют ряд причин, по которым могут происходить данные инвазии:

1. Естественное расширение ареалов по типу диффузии;
2. Перемещения, связанные с какими-либо климатическими факторами, геологическими факторами, или флюктуационными изменениями численности;
3. Антропогенная нагрузка на ареалы, в ходе которой идет преобразования границ ареалов;

4. Специальное расселения видов “полезных” с антропогенной точки зрения;

5. Случайные заносы, получившиеся при интенсивном освоении территорий человеком (расселение видов с импортом “полезных” интродуцентов).

Одной из основных проблем, связанных с биологическими инвазиями – непредсказуемость экономических и экологических последствий, к которым может привести интродукция чужеродного вида. Зачастую, вселение инвазивного вида может привести к возникновению его конкурентных отношений с аборигенным видом, занимающим ту же экологическую нишу, что может привести к вытеснению последнего, а значит и качественному изменению самой экосистемы, которое часто может привести к уменьшению биоразнообразия в ней (Карабанов и Кодухова, 2015).

Также стоит отметить, что помимо прямого вреда экосистеме инвазионные виды могут принести и косвенный. Вид-вселенец, не представляющий угрозы для аборигенных видов с точки зрения конкурентных отношений, может нести в себе патогенную угрозу для обитателей экосистемы, которые могут быть к ней попросту не готовы (Copp et al., 2016; Махаров и др., 2014; Дяченко, 2014; Жгарева и др., 2009; Лопарева и др., 2015; Фролова, Тарбеев, 2017).).

1.2. Трофическая характеристика и структура популяций байкальского хариуса в реке Енисей и ее притоках

На момент 2006 года (Шадрин, 2006), в реке Енисей и некоторых ее притоках авторы выделяют следующий спектр питания байкальского хариуса (на тот момент – сибирского хариуса): личинки ручейников, веснянок и поденок для рек Чуня, Камо, М.Нирунга, Агул, Ю.Пит и Сисим) и бокоплав

для рек Ангара и Енисей в некоторых ее районах. Данные группы составляют доминирующую часть в спектре питания хариуса. Также, дополнительно, он может дополняться алохтонной органикой, а именно воздушными насекомыми, дождевыми червями и даже млекопитающими. Также хариус способен потреблять молодь и мелкую промысловую рыбу, которые в свою очередь могут потреблять мелкие виды и формы зообентоса. Автор акцентирует внимание на том, что группы в пищевом спектре уменьшают свою численность пропорционально антропогенной нагрузке, помимо общей численности в спектре питания, группы претерпевают и качественное отличие, так в зонах не подверженных антропогенной нагрузке в пищевом комке хариуса преобладают реофильные формы личинок хирономид, поденок и ручейников, а в зоне с антропогенной нагрузкой – пелофильные личинки хирономид и поденок (Шадрин, 2006).

Также автор отмечает, что в реке Енисей и некоторых ее притоках имеются различия в темпах роста, что подтверждают и более свежие работы (Шадрин, 2006; Андрущенко и др., 2022). Так в притоках, которые подвержены антропогенной нагрузке (рр. Ангара и Енисей) популяции хариуса могут превосходить по росту «карликовую» форму из рек, не подверженных этому, на 31-32% в возрасте полового созревания и 16-19% в возрасте полового созревания. Исходя из этого, автор выделяет три вида популяций для байкальского хариуса реки Енисей и ее притоков: Короткоцикловая – популяция, возникающая при большой антропогенной нагрузке и при изменении кормности водоемов в лучшую сторону. Так, в уловах (р.Енисей) преобладает хариус 3+ лет (Шадрин, 2006); Среднецикловая популяция получается при увеличении биомассы бентоса в водоемах с короткоцикловыми популяциями; Длинноцикловая же форма популяций характерна для небольших по длине водности и продуктивности водоемов (Шадрин,2006).

1.3. Методы изучения миграций популяций рыб

Методы изучения распределения популяций рыб – являются инструментами для наблюдения популяций рыб в определенной акватории для различных целей в которых требуется последующий анализ структуры популяции и его распределение по акватории. Данные методы достаточно разнообразны в своем исполнении и в своей сложности могут быть достаточно разнообразны. Так, в некоторых работах может применяться метод контрольных уловов (Гадинов, Долгих, 2008), который может характеризовать как пространственное распределение рыб, так и ее видовой состав, а в других может быть использован метод мечения рыб радиоактивными изотопами, призванный уже отслеживать конкретную популяцию рыб и, например, отделять половозрелых особей от молоди (Богоявленская, 1961; Вельтищева, 1961). Данные методы можно подразделить на методы, требующие отлова рыб и соответственно, не требующие отлова рыб (Lucas et al., 2008).

1.3.1. Методы, основанные на отлове рыб

Данные методы регистрации распределения рыб в водоеме подразумевают предварительный вылов рыб и последующие мероприятия, направленные либо на изучение видового состава, либо на изучение пространственного распределения рыб на исследуемом участке. Данные методы достаточно разнообразны в своем исполнении, в данном обзоре будут присутствовать следующие методы изучения миграции рыб, основанных на их отлове: метод контрольных уловов, различные методы мечения рыб, а также методы изучения генетического разнообразия (Lucas et al., 2008).

К методам контрольных уловов можно отнести расчет численности рыб для отдельных участков методом площадей. Суть метода заключается в том, что во время исследования на определенной площади, с помощью различных орудий лова, производятся контрольные выловы рыбы, выловленные рыбы

подвергаются определению, а также вычисляется их численность для определенного участка по формуле:

$$N(Q) = S \times N_i(Q_i) / C \times g,$$

Где $N(Q)$ – средняя абсолютная численность и биомасса рыб на исследованном участке, экз., кг; S – площадь, занимаемая исследуемым видом рыб, га; $N_i(Q_i)$ – Средний улов на промысловое усилие, экз/га, кг/га; C – площадь облавливаемого участка, га; g – коэффициент уловитости орудия лова.

Далее полученные результаты заносятся в таблицы, которые описывают количество и видовой состав определенных рыб на единицу площади (Гадинов, Долгих, 2008). По мнению автора, плюсы данного метода заключаются в том, что для его исполнения не требуется дорогостоящее оборудование, по сути данный метод требует лишь орудий лова и вложение человеческих ресурсов. К минусам же можно отнести то, что метод не позволяет отследить конкретные популяции рыб, это может потребоваться, например, при отслеживании популяций рыб, выращенных на хозяйствах и выпущенных для стабилизации популяции в целевой акватории.

К методам мечения рыб, в первую очередь стоит отнести относительно простые методы мечения, которые включают в себя мечение проволочными метками и пластиковыми бирками. Суть первого заключается в том, что рыбу, содержащуюся в лабораторных или нативных условиях подвергают инъекции проволочной меткой (например, в спинную мышцу под спинным плавником) с помощью специального инжектора и после удостоверения в том, что рыба успешно перенесла данную процедуру, она проверяется на регистрацию данной метки с помощью детектора и может быть отпущена обратно в среду обитания (Зуев, Парыгина, 2020). Для мечения пластиковыми метками используются метки с выжженным лазером шрифтом. Метки крепятся с помощью специальных скрепок и пистолета в область рядом со спинным плавником. Также, при успешной инъекции, рыбы отпускаются обратно в водоем и отлавливаются либо самими исследователями, либо

предоставляются местными рыбаками, т.к. помимо пятизначного номера на метке также написано наименование научного центра, проводящего исследование и его номер телефона (Колпаков, Милованкин, 2009).

Также к методам мечения стоит отнести методы мечения рыб флуоресцентными красителями и радиоактивными метками. В первом случае для мечения используют инсулиновые шприцы, либо другие инъекторы, подходящие для этих целей, инъекция может проводиться в грудные мышцы, около одного из грудных плавников. По составу могут быть использованы различные жидкости, либо сами собой представляющие флуоресцентную краску, либо составы вперемешку с ней. После процедуры инъекции и успешной выживаемости, рыбы снова могут быть отпущены в нативную среду. Детекцию меток в данном методе возможно осуществить при помощи излучения, способного на возбуждение флуоресценции, например, с помощью УФ-фонаря (Зуев, Зуева, 2015). При мечении с помощью радиоактивных меток используются радиоактивные изотопы различных элементов, например, существуют работы по мечению осетров Ca^{45} , P^{32} , S^{35} , Sr^{89} . Также существует несколько способов транспорта данных изотопов в тело рыбы, например, через корм, через воду (путем экспозиции рыб в растворе с радиоактивными изотопами) и путем инъекции. Исследования показывают, что первые два способа являются наиболее эффективными (Богоявленская, 1961). Дальнейшая детекция меченых рыб в данном случае происходит при помощи приборов, способных улавливать радиоактивное излучение (Богоявленская, 1961; Вельтищева, 1961).

Обсуждая мечение рыб также стоит упомянуть и о методах «натурального» мечения рыб, к которым относится метод теплового мечения склеритов рыб. Механизм мечения основан на взаимосвязи между температурным режимом и ростом рыбы, который можно измерить через анализ склеритограмм чешуи рыбы, а именно по расстоянию между склеритами. В лабораторных условиях возможно изменять температуру воды, в которой проживает рыбы, тем самым увеличивая или уменьшая данное

расстояние. Таким образом, возможно программировать свой температурный режим для получения определенного рисунка на чешуе рыбы и соответственно для формирования своего, уникального рисунка для каждой интересующей популяции. Плюсом данного метода является тот факт, что на рыбу не оказывается никакого влияния, кроме температурного и механического при сборе чешуи, а также данный метод является относительно дешевым в своем исполнении (Маврин и др., 2020; Фурсенко, 2021).

Отдельного внимания также заслуживают исследования генетического разнообразия популяций рыб. Для этого не обязательно проводить летальные исследования, при помощи анализа ДНК из мышечной ткани, возможно использование плавников и чешуи, содержащих эпителий рыб, что не приведет к смерти рыбы. Для исследования используется не весь геном, а лишь микросателлитные повторности, консервативные либо для некоторых родов рыб, либо для всех эукариотических организмов. Для этого из материала выделяется ДНК (в основном методом солевой экстракции), амплифицируется с помощью праймеров, нацеленных на участки ДНК с определенными повторностями, после чего проводится гель-электрофорез и анализ полученных электрофореграмм. Данный метод позволяет очень точно разделить даже близкородственные группы рыб и является относительно недорогим методом, т.к. не нуждается в дорогих методах полного секвенирования геномов (Козлова и др., 2013). Данный метод также широко используется в исследовании видовой структуры популяции рыб (Hesham, Yousof, 2020; Sevan et al., 2020; Sabry et al., 2015; Labastida et al., 2015; Saad et al., 2012; Mohammadabadi et al., 2021; Yiping et al., 2011; Шпигальская и др., 2012).

Так как в рамках данной работы применяется ISSR-PCR-анализ, то отдельно хотелось бы выделить SSR и ISSR методы, как методы изучения генетического разнообразия в популяциях. SSR (Short sequence repeat) и ISSR (Inter sequence short repeats) являются методами фрагментного изучения генетического полиморфизма, также существуют полногеномные методы

изучения полиморфизма, но из-за своей себестоимости и высоких требований к навыкам исследователя, данные методы не вошли в данную работу.

Давно известно, что геномы эукариот имеют большое количество tandemных повторностей, состоящих из отрезков от 1 до 4 последовательностей (Braaten, 1988). Данное свойство позволяет исследовать геномы эукариотических организмов, основываясь лишь на этих последовательностях. Суть методов SSR и ISSR как раз заключается в том, что для исследования полиморфизма подбираются праймеры, содержащие короткие tandemные повторности, являющиеся консервативными для большинства эукариотических организмов (Таблица 1). Главное отличие SSR метода от ISSR метода заключается в том, что для первого необходимо знать и специфическую последовательность, которая идет перед SSR участком. Далее, после подбора праймеров и амплификации ДНК с данными праймерами с помощью полимеразной цепной реакции, разделения полученных образцов происходит в гель-электрофорезе, после чего происходит анализ полученных электрофореграмм с помощью соответствующих программ (Morgante et al., 1993). ISSR анализ работает по такой же схеме, что SSR анализ, за исключением того, что для ISSR не требуется знание генома исследуемого объекта, что позволяет применять данный метод для изучения объектов, чьи геномы еще не изучены. Также преимущество данного метода заключается в том, что данный метод не требует большой себестоимости, а также способен выдать достаточный выход продуктов реакции, достаточный для последующего анализа (Zietkiewicz et al., 1994).

1.3.2. Методы, не требующие отлова рыб

Как следует из названия, данные методы изучения миграций рыб подразумевают анализ пространственного распределения рыб непосредственно на месте их обитания. К данным методам можно отнести:

Визуальное наблюдение за миграцией рыб, методы использующие детекторы удельного сопротивления и биоэлектрических сигналов рыб, а также гидроакустический метод (Lucas et al., 2008)

Метод визуального наблюдения подразумевает регистрацию скоплений рыб либо непосредственно исследователем, либо с помощью соответствующей аппаратуры для фото и видеосъемки. Например, Никифоров и соавторы (2013) в своей работе, направленной на мониторинг производителей горбуши в нерестовых реках о.Сахалина, использовали беспилотный летательный аппарата квадрокоптерного вида для регистраций скопления рыб, в ходе работы исследователи получили фотографии скоплений рыб, а также телеметрические показатели, в данной работе авторы подмечают некоторые плюсы данного вида съемки, по сравнению с пешим учетом: нивелирование индивидуальных ошибок исследователя, такие как, например, завышение или занижение численности скоплений, невозможность объективной оценки тотального учета рыб, а также невозможность единовременной оценки численности рыб на протяжении всего русла реки. Также авторы подмечают и минусы данного метода: погодные условия, препятствующие съемке (туман, ветер), общая мутность воды, сложный для полета характер долины реки, обильная растительность, которая может перекрывать русло. Также в некоторых случаях, даже по фотографии сложно оценить численность скопления рыб, из-за его плотности (Никифоров и др., 2013).

Метод, основанный на детекции удельного сопротивления рыб основан на принципе того, что удельное сопротивление самой рыбы, меньше, чем удельное сопротивление воды, соответственно, при прохождении рыбы через два электрода на детекторе будет фиксироваться пик проводимости, что в свою очередь позволяет произвести подсчет всех рыб, проходящих через данные электроды (Forbes et al., 2000). По схожему принципу действует и метод биоэлектрической детекции, за исключением того, что при этом

фиксируется не пики проводимости между двумя электродами, а пики, связанные с биоэлектрическими показателями рыб (Lucas et al., 2008).

Суть гидроакустического метода заключается в эхолокации, то есть улавливании приборами звуковых волн, отраженных от объектов, находящихся в водоемах. Данный метод при достаточном техническом обеспечении может быть использован даже в любительской рыбалке. Данный метод использует активную эхолокацию, то есть непрерывное излучение в водную среду звуковых волн и последующий прием рассеянного сигнала, существует так же пассивная эхолокация, где не происходит излучение звуковых волн, а лишь их прием. Данный метод имеет ряд плюсов по сравнению с другими методами изучения распределения. Первый из них заключается в том, что исследование популяции происходит в нативных для нее условиях, соответственно это нивелирует субъективные факторы, а достоверность оценки количества и распределения можно свести к минимуму, правильно распланировав съемку. Также данный метод способен на месте обозреть большие площади и характеризовать не только горизонтальное, но и вертикальное распределение популяций, не требуя при этом больших затрат по энергии. Также при должном разрешении данный метод позволяет детально проинспектировать макроструктуру отдельного скопления рыб. К минусам можно причислить то, что помимо фиксации только интересующих нас популяций рыб эхолот может фиксировать также шум от судна, на котором производится исследования. Также минусом является реакция рыб на звук судна, которая может помешать достоверности измерения распределения рыб на интересующей площади (Кузнецов 2013).

2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Район и объекты исследования

Для исследования были отобраны хвостовые плавники байкальского хариуса из таких водоемов как: река Ангара (ТВА), среднее течение реки Березовка (ТВВМ), верхнее течение реки Березовка (ТВВU), река Кача, возле села Творогово (ТВК), река Кача, в деревне Сухое (ТВКВ), река Крутая Кача (ТВКК), Река Енисей около села Хлоптуново (ТВУН), река Енисей около села Овсянка (ТВУО), ручей Тамасул, находящийся около поселка Кедровый (ТВТ). Всего в выборках было от 3 до 10 плавников, за исключением плавника из реки Качи около села Творогово, представленного в единственном экземпляре. После отбора материал хранился в пластиковых пробирках, объемом 20 мл, в 90% этиловом спирте.

2.2. Выделение ДНК

Для дальнейшей амплификации и постановки гель-электрофореза ДНК было выделено методом солевой экстракции (Aljanabi, Martinez, 1997).

Протокол выделения:

1. Вырезать кусочек животной ткани (объемом 0,5 см³), измельчить, поместить в пробирку и добавить 500 мкл лизирующего буфера и 5 мкл протеинкиназы К.
2. Пробирку инкубировать в микротермостате при температуре 65°C в течение 1 часа, периодически перемешивая содержимое.
3. По окончании инкубации в пробирку добавить 300 мкл 6М NaCl.
4. Содержимое пробирки перемешать на вортексе в течение 30 сек., затем пробирку нужно центрифугировать 20 мин. при 12000 об/мин.

5. 500 мкл супернатанта (верхнюю фазу) переносят в чистую пробирку и добавляют двойной объем этилового спирта, предварительно охлажденного до -20°C .
6. Пробирку поместить в морозильную камеру, где необходимо продержать ее 15 мин. при температуре в -20°C .
7. После инкубации содержимое пробирки центрифугировать 20 мин. При 14000 об/мин и при 4°C .
8. Супернатант полностью удалить. Добавить 200 мкл 70% этилового спирта.
9. Центрифугировать 10 мин при 14000 об/мин.
10. Супернатант полностью удалить. Осадок высушить в открытых пробирках в течение 5-7 мин.
11. К высушенному осадку добавить 30-100 мкл деионизированной воды и оставить растворяться в холодильнике. Хранить при -20°C .

2.3. Постановка ПЦР

После процедуры выделения, ДНК в пробирках разводилось деионизированной водой до концентрации ~ 20 нг/мкл. Для измерения концентрации ДНК использовался флуориметр. Для дальнейшего исследования был проведен подбор праймеров, дающих наибольшее количество бэндов на электрофореграмме. Эмпирическим путем были выяснены оптимальные концентрации компонентов смеси амплификации, она проводилась в 20 мкл реакционной смеси, состоящей из 2 мкл ДНК, 0,6 мкл праймера, 7,4 мкл дистиллированной воды и 10 мкл готового PCR-смеси (ООО «Биолабмикс», Новосибирск).

Программа амплификации:

1. 95°C (5 минут) – денатурация белковых комплексов для активации Таq-полимеразы;

2. 13 циклов: 95°C (20 секунд) – «плавление» ДНК, 55°C (45 секунд, понижение температуры на 0,7°C в каждом последующем цикле) – отжиг праймеров, 72°C (90 секунд) – элонгация цепи;
3. 25 циклов: 95°C (20 секунд) – «плавление» ДНК, 44°C (30 секунд) – отжиг праймеров, 72°C (90 секунд) – элонгация цепи; 72°C (7 минут) – достройка всех цепей.

Все использованные праймеры представлены в таблице 1.

Таблица 1. Последовательности праймеров, использованных в подборе (Saad et al., 2012)

Название	Последовательность
17899А	5'-CAC-ACA-CAC-ACA-AG-3'
17899В	5'-CAC-ACA-CAC-ACA-GG-3'
НВ8	5'-GAG-AGA-GAG-AGA-GG-3'
НВ9	5'-GTG-TGT-GTG-TGT-GG-3'
НВ10	5'-GAG-AGA-GAG-AGA-CC-3'
НВ11	5'-GTG-TGT-GTG-TGT-CC-3'
НВ12	5'-CAC-CAC-CAC-GC-3'
НВ13	5'-GAG-GAG-GAG-GC-3'
НВ14	5'-CTC-CTC-CTC-GC-3'
НВ15	5'-GTG-GTG-GTG-GC-3'
844А	5'-CTC-ТСТ-CTC-ТСТ-CTC-ТАС-3'
844В	5'-CTC-ТСТ-CTC-ТСТ-CTC-TGC-3'
814	5'-CTC-ТСТ-CTC-ТСТ-CTC-TTG-3'

Разделение продуктов амплификации происходило в 2%-ом агарозном геле в электрофорезной камере Bio-Rad Sub-cell GT при напряжении 200V и в течение 1 часа 30 минут. При приготовлении геля в качестве красителя был добавлен бромид этидия. После электрофореза гели были сфотографированы в проходящем ультрафиолетовом свете. Для дальнейшей работы были

отобраны праймеры: HB10, HB12, HB14, как показавшие наибольшее количество локусов для байкальского хариуса. Анализ полученных электрофореграмм проводился в программе *GelAnalyzer*.

2.4. Статистическая обработка данных

2.4.1. Анализ главных компонент

Дальнейшая обработка данных состояла в переводе результатов электрофореза в матрицу, где «1» означала присутствие локуса, а его отсутствие – «0». Готовые матрицы загружались в программу *Rstudio*, где с помощью библиотеки под названием *factoextra* был проведен многомерный анализ главных компонент.

2.4.2. ISSR-PCR анализ

Также, помимо анализа главных компонент, матрица была загружена в программу PopGene v.1.32 (Yeh, 1999), где производились расчеты по последующим показателям:

- P – количество полиморфных локусов;
- H_e – генетическое разнообразие Нэя (Nei, 1972);
- G_{st} – коэффициент подразделенности популяции

В данном случае коэффициент подразделенности при значениях от 0 до 0,05 – соответствует низкому уровню подразделенности, от 0,05 до 0,15 – среднему уровню подразделенности, от 0,15 до 0,25 – высокому уровню подразделенности, от 0,25 и выше – очень высокому уровню подразделенности (Nei, 1972).

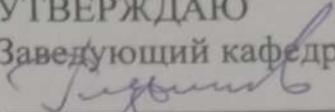
Дальнейший анализ происходил в программе TFPGA (Tools for Population Genetic Analysis) (Miller, 1997), в которой была построена

дендрограммы сходства популяций. Расчет расстояний для дендрограммы производился по формуле Нея (1972). Всего, кластеризация происходила за 1000 циклов.

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение
высшего образования
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

Институт фундаментальной биологии и биотехнологии
институт

Кафедра водных и наземных экосистем
кафедра

УТВЕРЖДАЮ
Заведующий кафедрой

подпись инициалы, фамилия

« ____ » _____ 20 __ г

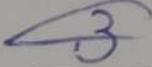
ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА

06.03.01 - Биология

Генетическая изменчивость байкальского хариуса (*Thymallus*
arcticus baicalensis) среднего течения р. Енисей и его притоков

Тема

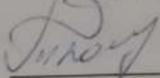
Руководитель

 28.06.23
подпись, дата

доцент, к.б.н.
должность, ученая степень

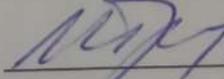
И.В. Зуев
инициалы, фамилия

Выпускник

 28.06.23
подпись, дата

Ю.И Трубчанинов
инициалы, фамилия

Рецензент

 28.06.23
подпись, дата

М.Ю. Трусова
инициалы, фамилия

Красноярск, 2023