

Сәкен Сейфуллин атындағы Қазақ агротехникалық зерттеу университетінің Ғылым жаршысы: пәнаралық = Вестник науки Казахского агротехнического исследовательского университета имени Сакена Сейфуллина: междисциплинарный. – Астана: С. Сейфуллин атындағы Қазақ агротехникалық зерттеу университеті, 2025. -№ 3 (127). - Р.71-80. - ISSN 2710-3757, ISSN 2079-939X

doi.org/10.51452/kazatu.2025.3(127).1996

ӘОЖ 574.5 [595.36: 57.088.1]

Зерттеу мақаласы

Қазақстанның әртүрлі су айдындарындағы гаммарустардан *Gammarus* spp. (Crustacea: Amphipoda) ДНҚ бөліп алу тиімділігі мен сапасын бағалау

Адырбекова К.Б.¹ , Пангереев Б.С.^{1,2} , Фефелов В.В.¹ , Искеков Қ.Б.¹ 

¹«Балық шаруашылығы ғылыми-өндірістік орталығы» ЖШС, Алматы, Қазақстан,

²Әл-Фараби атындағы Қазақ ұлттық университеті, Алматы, Қазақстан

Корреспондент-автор: Пангереев Б.С.: pangereyev.berik@gmail.com

Бірлескен авторлар: (1: КА) adyrbekova@fishrpc.kz; (2: ВФ) fv1980@mail.ru;

(3: ҚБ) isbekov@mail.ru

Қабылданған күні: 01.07.2025 **Қабылданды:** 25.08.2025 **Жарияланды:** 30.09.2025

Түйін

Алғышарттар мен мақсат. *Gammarus* spp. туысының амфиподтары Солтүстік жартышардың тұщы су экожүйелерінде кең таралған және экологиялық, токсикологиялық және молекулярлық зерттеулерде модельді организмдер ретінде жиі қолданылады. Алайда, гаммарустарды морфологиялық сәйкестендіру түрішілік өзгергіштіктің жоғары дәрежесіне және криптикалық түрлердің морфологиялық жағынан іс жүзінде ажыратылмайтын, бірақ генетикалық және экологиялық жағынан ерекшеленетін түрлер болуына байланысты қиындық туғызады. Бұл митохондрияльды ДНҚ-ны (мысалы, *COI* генін) талдауға негізделген молекулярлық тәсілдерді таксономиялық тексеру және биоалуантүрлілікті бағалау үшін ерекше маңызды. Бұл жұмыстың мақсаты – Қазақстанның түрлі су қоймаларынан алынған гаммарус түрлерінен (*Gammarus* spp.) ДНҚ алу тиімділігін және оның сапасын бағалау, сондай-ақ, кейіннен үлгілерді генетикалық идентификациялау үшін ПТР әдісімен *COI* генінің амплификациясының қайта өндірілуін тексеру.

Материалдар мен әдістер. Зерттеу барысында солтүстік, оңтүстік және шығыс Қазақстанның түрлі тұщы су қоймаларынан гаммарус үлгілері (*Gammarus* spp.) жиналды. Бұл зерттеудің мақсаты - Қазақстанның әртүрлі су айдындарындағы гаммарустардан ДНҚ-ны бөлу әдістерінің тиімділігі мен сапасын бағалау. Экстракция әдістемесі амфиподалар ұлпаларының ерекшеліктерін ескере отырып бейімделді.

Нәтижелер. Алынған ДНҚ үлгілері таза және концентрациясы бойынша қанағаттанарлық көрсеткіштерді көрсетті, бұл сәтті ПТР-амплификациясын қамтамасыз етті. Барлық сынамаларда 1,69-дан 2,00-ге дейінгі диапазондағы A260/A280 мәндерімен ДНҚ тазалығының қанағаттанарлық көрсеткіштері байқалды, бұл ақуыздық қоспалардың жоқтығын көрсетеді. Нуклеин қышқылдарының концентрациясы 191,6-дан 232,0 нг/мкл аралығында өзгерді, бұл ПТР-амплификациясы үшін талаптарға сай келеді. Нәтижелер жасалған әдістің Қазақстанның су қоймаларында гаммарус түрлерін молекулярлық-генетикалық талдау және идентификациялау үшін қолайлы екенін растайды.

Қорытынды. Жүргізілген зерттеу Қазақстанның тұщы су қоймаларынан жиналған гаммарустардан ДНҚ экстракциялау әдістемесін оңтайландыруға мүмкіндік берді, бұл ПТР-амплификациясы үшін сәйкес келетін ДНҚ тазалығы мен концентрациясының қанағаттанарлық көрсеткіштерін қамтамасыз етіп, агароздық гельде *COI* генінің амплификацияланған фрагментін сәтті визуализациялауды қамтамасыз етті, бұл өңірдегі амфиподтарды одан әрі популяциялық-генетикалық зерттеу үшін негіз қалады.

Кілт сөздер: ПТР; ДНҚ бөліп алу; гаммарус; агарозды гель; электрофорез.

Кіріспе

Амфиподалар (шаянтәрізділер) – қоңыржай ендіктердегі тұщы су экожүйелерінің ең маңызды организмдер тобының бірі болып табылады. Бұл шаянтәрізділер көбінесе тұщы су ағындарының көптеген экожүйелеріндегі макрозоопланктон биомассасының негізгі бөлігін құрайды [1]. *Gammarus* туысы – амфиподтардың ең бай түрлерінің бірі, олардың көпшілігі тұщы суда мекендейді [2]. Еуразия құрлығында гаммаридтердің филогенетикалық және географиялық жағынан өте алуан топтары таралған [3]. Гаммарус өсімдік қалдықтарының ыдырауына қатысады және екінші реттік тұтынушылар үшін қорек көзі ретінде қызмет етеді. Сонымен қатар, гаммарус су объектілерінің экологиялық жағдайын бағалау үшін пайдалануға мүмкіндік беретін химиялық стресс факторларының әсеріне сезімтал болғандықтан индикатор ретінде қарастырылады [4].

Гаммаридтердің таксономиясы күрделі мәселе болып табылады, өйткені олардың түр деңгейінде морфологиялық идентификациясы жоғары біліктілікті қажет етеді. Дегенмен, қазіргі молекулярлық әдістер морфологиялық кешендердің ішінде жасырын түрлерді анықтауға мүмкіндік береді. Мысалы, бірқатар жағдайларда гаммарус жыныстық диморфизммен және елеулі онтогенетикалық айырмашылықтармен сипатталады, бұл олардың түрін дәл анықтауды қиындатады. Сондықтан экологиялық зерттеулерде нақты түр идентификациясының орнына *Gammarus* spp. белгісі жиі қолданылады [5]. Орталық Азияның амфиподылары туралы генетикалық деректер аз зерттелген; таралуы жайлы үзінді деректер ғана кездеседі [6-8].

Ең танымал әрі кең таралған түрі – *Gammarus lacustris*, ол тұщы және тұзды суда кездеседі. Оның генетикалық алуан түрлілігі экологиялық факторларға, мысалы, судың температурасы, тұздылығы және қоректің қолжетімділігіне, сондай-ақ популяциялардың географиялық оқшаулануына айтарлықтай байланысты. Табиғи тосқауылдар, мысалы, биік таулы су қоймалар мен климаттық өзгерістер, осы популяциялардың генетикалық алуан түрлілігінің құрылымына үлкен әсер етеді, бұл экстремалды жағдайларға бейімделген тұрақты жергілікті генотиптердің пайда болуына әкеледі [9, 10].

Митохондриялық *COI* генінің маркері гидробионттарды идентификациялау үшін әмбебап штрихкод ретінде кеңінен қолданылады [11, 12], сондай-ақ, осы ген арқылы, оның ішінде, гаммарус үшін де белгілі ДНҚ деректері алынады [13-17]. Бұл молекулярлық идентификация әдісі ДНҚ-дағы қысқа нуклеотидтік тізбектер арқылы организмнің белгілі бір таксономиялық топқа жататындығын анықтауға мүмкіндік береді [9]. Омыртқасыз гидробионттарды генетикалық баркодтау үшін митохондрияльды цитохромоксидаза I генінің шамамен 650 негіз жұбынан тұратын учаскесі қолданылады. Молекулярлық маркерлерді қолданудың арқасында популяциялар арасындағы филогенетикалық байланыстарды дәлірек анықтау және тек морфологиялық белгілер негізінде ажырату қиын болатын жасырын түрлерді нақты анықтау мүмкін болды [7, 18].

Бұл жұмыстың мақсаты – Қазақстанның түрлі су қоймаларынан алынған гаммарус түрлерінен (*Gammarus* spp.) ДНҚ алу тиімділігін және оның сапасын бағалау, сондай-ақ, кейіннен үлгілерді генетикалық идентификациялау үшін ПТР әдісімен *COI* генінің амплификациясының қайта өндірілуін тексеру.

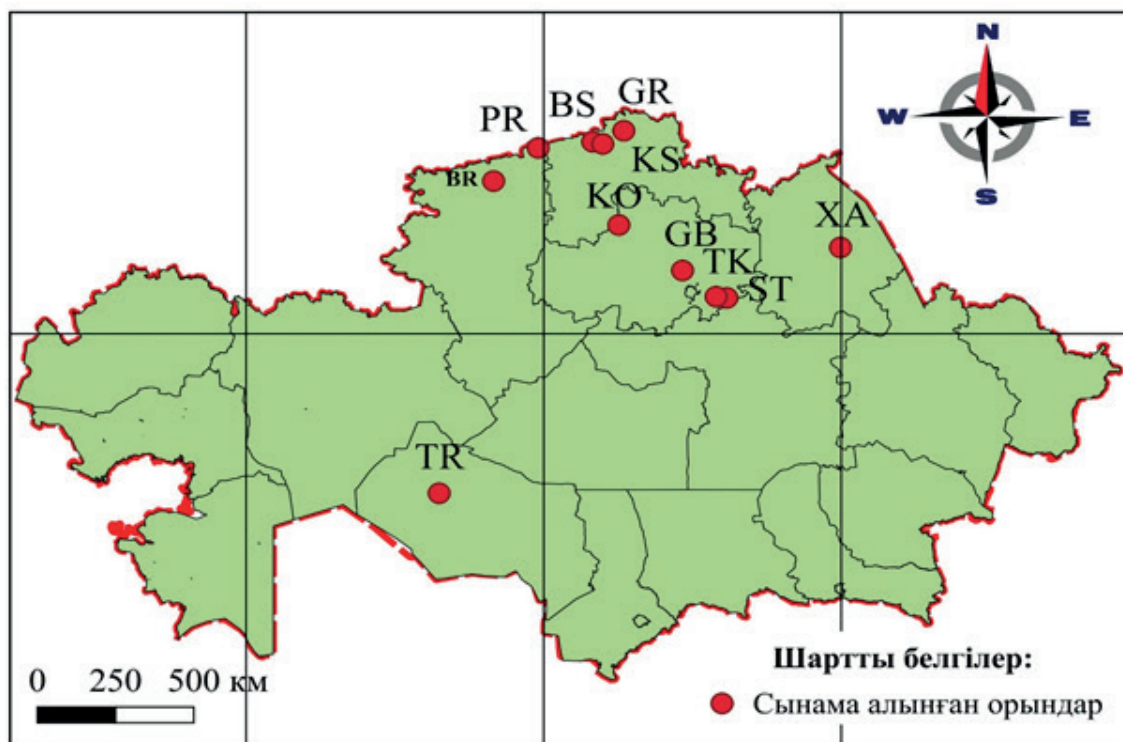
Материалдар мен әдістер

Гаммарус үлгілері (*Gammarus* spp., *Amphipoda*) Ақмола, Қостанай, Қызылорда, Павлодар және Солтүстік Қазақстан облыстарындағы жергілікті маңызы бар су қоймаларынан № 10-12 газды сүзгі көмегімен жиналды. Су қоймалары әртүрлі көлемдегі көлдер мен тоғандар, олардың ауданы 20-1282 га дейінгі аралықта, бұл әртүрлі гидрологиялық және экологиялық сипаттамалары бар әртүрлі экожүйелерді қамтуға мүмкіндік береді. Су айдындарына Грунькино болото (20 га) сияқты ұсақ су айдындары да, Горькое көлі (1282 га) сияқты ірі су айдындары да зерттелді. 1-кестеде зерттелген су қоймаларының көрсеткіштері көрсетілген.

1-кесте – *Gammarus* - ДНҚ үлгілері жиналған орындар

№	Сукойма	Орналасқан облысы	Үлгі атауы	Ауданы, га	Ендік координаттары	Бойлық координаталары
1	Хомутино	Павлодар	ХА	27	52.227064°	76.966817°
2	Большие сливки	Солтүстік Қазақстан	BS	74	54.699632°	67.804946°
3	Козьявочное	Солтүстік Қазақстан	КО	57	52.764577°	68.773096°
4	Қосағаш	Солтүстік Қазақстан	KS	102	54.650137°	68.179050°
5	Горькое	Солтүстік Қазақстан	GR	1282	54.948807°	68.955616°
6	Прудок	Қостанай	PR	61	54.559247°	65.792506°
7	Боровское	Қостанай	BR	190	53.796511°	64.142647°
8	Сейтенское	Ақмола	ST	55	50.995735°	72.767090°
9	Тоқсары	Ақмола	TK	326	51.025957°	72.367227°
10	Грунькино болото	Ақмола	GB	20	51.668648°	71.127045°
11	Төртқұлақ	Қызылорда	TR	76	45.906583°	62.131617°

Осы зерттеу жұмысы шеңберінде Қазақстанның түрлі тұщы су қоймаларынан гаммарус (*Gammarus* spp.) үлгілері молекулярлық-генетикалық талдау үшін жиналды. Материалдарды жинау 2024 жылдың жаз-күз айларында, негізінен Қазақстанның солтүстік, оңтүстік және шығыс аймақтарында жүргізілді (1-сурет).



1-сурет – Қазақстан аумағындағы гаммарустың (*Gammarus* spp.) сынамалары алынған орындар

ДНҚ деградациясын болдырмау үшін барлық дарақтар жиналған соң бірден геномдық ДНҚ алынғанға дейін екі рет ауыстырылған 96% этанолға орналастырылды.

Геномдық ДНҚ экстракциясы үшін көлеміне қарай 5-10 мг гаммарус ұлпалары (организмдер толықтай немесе олардың фрагменттері) пайдаланды. Дарақтарды экстракциялау алдында балласт заттарының құрамын азайту және таза ДНҚ-ның шығуын жақсарту үшін сыртқы хитин қабатын қолмен алып тастады. Геномдық ДНҚ алу коммерциялық жинақтаған реагенттер «ДНҚ-Экстран-2» (Синтол, Ресей) арқылы жүргізілді, бұл жиынтық жануарлардың ұлпаларынан ДНҚ экстракциялау үшін арналған. Бұл әдіс клеткаларды тізбектеп лиздеу, ақуыздар мен ДНҚ-ны тұндыру, жуу және ДНҚ элюациялау арқылы жүзеге асырылады, бұл процесте косымша тұндыру ретінде гликоген пайдаланылады.

Нұсқаулықтағы өзгерістерге сәйкес (2-меркаптоэтанол алынып тасталды): 2 мл көлеміндегі түтікке 5-10 мг ұлпа салынып, 300 мкл лизирлеуші ерітінді және 10 мкл протеиназа К қосылды, содан кейін 56 °C температурада түні бойы инкубацияланды. Ақуыздарды тұндыру үшін 100 мкл тұндыру ерітіндісі қосылып, вортесте 20 с. бойы араластырылды, содан соң 13 000 айн/мин жылдамдықпен 5 минут бойы центрифугаланды.

Супернатант құрамында 2 мкл гликоген бар жаңа түтікке ауыстырылды, 300 мкл тұндыру ерітіндісі қосылып, ДНҚ тұнбасын көрінгенше араластырылды. Содан соң 13 000 айн/мин жылдамдықпен 5 минут бойы центрифугаланды, супернатант алып тасталынды, түтік сүзгі қағазбен сүртілді. Кейін 400 мкл жуу ерітіндісі қосылып, 2 мин. бойы центрифугаланды, сұйықтықты алып тастап, түтікті 37 °C температурада 10 мин. бойы кептірді. Осыдан кейін 50 мкл элюациялау ерітіндісі қосылып, 65 °C температурада 5 мин. бойы толық ерігенше қыздырылды.

Бөлінген ДНҚ сапасы мен тазалығы NanoDrop One (Thermo Fisher Scientific, АҚШ) наноспектротометрін пайдалана отырып, 260 және 280 нм толқын ұзындықтарында оптикалық тығыздықтың арақатынасы бойынша спектрофотометриялық бағаланды. Орташа мәні A260/A280 1,9 болды, бұл алынған ДНҚ-ның жақсы сапасын көрсетеді және ақуыздық ластану мөлшерінің аз екенін білдіреді. Омыртқасыз гидробионттар үшін екі арнайы праймер қолданылды (LCO1490 және HCO2198) [19]. Тікелей F (5'-тен 3'-ке): GGTCACAACAATCATAAAGATATTGG және кері R (3'-тен 5'-ке): TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAAATCA.

ПТР реакциялары 10-100 нг матрициялық ДНҚ (3 µL), 1 µL тұзу және кері праймерлер, 11 µL ионсыздандырылған су және 10 µL коммерциялық ПТР-Микс реагенттер жиынтығын (Синтол, Ресей) қамтитын 25 µL соңғы көлемінде жүргізілді. ПТР-Микс құрамы: дезоксинуклеозидтрифосфаттар, ПТР буфері, MgCl, Тақ ДНҚ полимераза.

Жиналған ПТР-реакциясы 13 000 айн/мин жылдамдықпен 2 минут бойы центрифугаланды, содан кейін түтіктер Bio-Rad T100 Thermal Cycler (Bio-Rad, АҚШ) термоциклеріне, жылыту қақпағымен, орналастырылды (2-кесте).

2-кесте – Гаммарустарда (*Gammarus* spp.) COI гендерінің ПТР-амплификациясының температуралық жағдайлары мен көрсеткіштері

Кезең	Температура (°C)	Уақыт	Циклдар саны
Алдын ала денатурация	96	2 мин	1
Денатурация	96	10 с	35
Праймерлерді күйдіру	54	30 с	35
Тізбектерді ұзарту	72	60 с	35
Соңғы ұзарту	72	5 мин	1
Салқындату	12	үнемі	-

ПТР-дің сәттілігін 1,4% агарозды гельде гель-электрофорез әдісімен бағалады, ол SYBR Green I интеркалirлеуші бояғышымен боялған. Гельге 8 µL амплификат пен молекулалық массалар маркері қолданылды. Визуализацияны УФ-трансиллюминатор Vilber (Vilber Lourmat, Франция) көмегімен жүргізілді.

Нәтижелер және талқылау

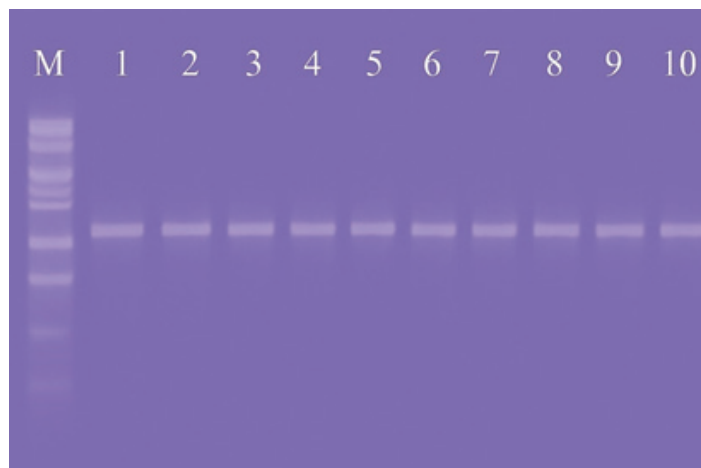
Жүргізілген молекулярлық-генетикалық талдау нәтижелері бойынша гаммарус үлгілерінің ДНҚ/ақуыз қатынасы көрінетін диапозонда наноспектрофотометр көмегімен есептелді, орташа мәні 1,9 болды, бұл ДНҚ-ның жақсы сапасын көрсетеді (3-кесте).

3-кесте – Спектрофотометриялық өлшем деректері және гаммарус үлгілерінің ДНҚ концентрациясы

№	Үлгі атауы	Нуклеин қышқылдары (ng/uL)	A260/A280
1	XA	191,6	1,924
2	BS	218,3	1,692
3	KO	232,0	1,711
4	KS	191,9	1,994
5	GR	200,7	1,986
6	PR	192,6	1,934
7	BR	193,6	1,944
8	ST	201,7	1,976
9	TK	221,4	2,005
10	GB	221,4	2,005
11	TR	194,5	1,964

Барлық үлгілерде ДНҚ тазалығының қанағаттанарлық көрсеткіштері байқалды, A260/A280 қатынасы 1,69 бен 2,00 аралығында болды, бұл ақуыздық қоспалардың айтарлықтай болмағандығын көрсетеді. Нуклеин қышқылдарының концентрациясы 191,6 нг/мкл мен 232,0 нг/мкл аралығында өзгерді, бұл кейінгі ПТР-амплификациясы үшін талаптарға сай келеді. Алынған деректер Қазақстанның түрлі су қоймаларынан алынған гаммарус үлгілерінен ДНҚ экстракциясының бейімделген әдісінің тиімділігін растайды.

Гаммарус үлгілерінен алынған ПТР өнімдерінің болуы мен сапасы гель-электрофорез әдісімен расталды (2-сурет).



2-сурет – 1,4% агарозды геледегі ПТР өнімдерінің электрофореграммасы: М - молекулалық масса маркері (100 б.к. қадаммен 100-800 б.б.); 1-11 - митохондриялық COI генінің амплифицирленген фрагменті бар гаммарус үлгілері

Алынған гаммарус үлгілерінің электрофореграммасы және ПТР өнімдерінің 1,4% агарозды геледе визуализациясы шамамен 600 негіз жұбы ұзындықтағы амплификацияланған фрагменттердің бар екенін растады, бұл фрагменттер 100 негіз жұбы қадаммен маркер арқылы анықталды. Жүргізілген ПТР-амплификация кезеңі реакцияның жоғары тиімділігін көрсетті және зерттелетін үлгілерді одан әрі молекулярлық-генетикалық сәйкестендіруге негіз болды.

Mamos et al. (2014) [20] және Hebert et al. (2003) [21] жүргізген жұмыстары гаммаридтер мен басқа су организмдерін анықтау үшін ДНҚ баркодингі мен ПТР қолдану тиімділігін растайды. Мысалы, Mamos et al. (2014) *Gammarus balcanicus* және басқа амфиподтардағы жасырын түрлерді оқшаулау үшін молекулалық маркерлердің маңыздылығын атап көрсетеді, бұл біздің зерттеуімізде алынған нәтижелерге сәйкес келеді. Біздің зерттеуімізде алынған деректер осындай күрделі үлгілермен жұмыс істеу үшін ДНҚ экстракциясы мен ПТР амплификациясы әдісінің жоғары тиімділігін растайды.

Сонымен қатар, жұмыс нәтижелері Chaumont et al. (2015) [4], олар гаммаридтерді су сапасының көрсеткіштері ретінде қарастырады, экологиялық бақылауда амфиподтардың маңыздылығын көрсетеді. Молекулалық әдістерді қолдану түрлерді дәлірек анықтауға мүмкіндік береді, бұл биоәртүрліліктің өзгеруіне сезімтал экожүйелерді бақылау жүйелерін құру үшін маңызды.

Әртүрлі су қоймаларынан алынған гаммарус үлгілерінің молекулярлық-генетикалық зерттеуі нәтижесінде бөлінген ДНҚ-ның тазалығы мен концентрациясы сәтті анықталды, тұрақты ПТР өнімдері алынды және олар агарозды геле визуализацияланды. Сонымен қатар, омыртқасыз гидробионттар ұлпаларын еңбекті көп қажет ететін лизисінің ерекшеліктерін ескеретін экстракция әдісі оңтайландырылды, бұл кейінгі талдау кезеңдерінің қайта өндірілуін жақсартады.

Қорытынды

Зерттеу барысында Солтүстік, Шығыс және Оңтүстік Қазақстанның әртүрлі су қоймаларынан (жазық көлдер, жайылмалы қарттар мен тоғандар) гаммарустардың үлгілері жиналды. Токсары көлі (326 га) мен Горький көлі (1282 га) қоспағанда, басқа зерттелген су қоймалардың ауданы 20-102 га аралығында болды.

Жүргізілген зерттеу Қазақстанның тұщы су қоймаларында жиналған гаммарус үлгілерінен ДНҚ бөліп алу әдісін тиімді бейімдеуге мүмкіндік берді. Алынған нәтижелер Қазақстанның әртүрлі су айдындарында жиналған гаммарус үлгілерінен ДНҚ-ны экстракциялаудың бейімделген әдістемесінің жоғары тиімділігін растады. Барлық сынамалар ДНҚ тазалығының қанағаттанарлық көрсеткіштерін атап өтті (A260/A280 1,69-2,00 диапазонында). Нуклеин қышқылдарының концентрациясы 191,6-дан 232,0 нг/мкл дейін өзгерді, бұл кейінгі ПТР амплификация талаптарына сәйкес келеді. *COI* генінің амплифицирленген фрагменті агарозды геле сәтті көрінді, бұл алынған материалдың жоғары сапасын көрсетеді. Ұсынылған нәтижелер Қазақстанның су айдындарын мекендейтін амфиподалардың популяциялық-генетикалық зерттеулеріне негіз болады.

Авторлардың қосқан үлесі

АК, ҚИ: зерттеудің тұжырымдамасын жасады және жобалады, жиналған деректерді талдап, қолжазбаның жобасын жасады. БС: жан-жақты әдебиеттерді іздестірді, қолжазбаның соңғы редакциясын және коррекциясын орындады. ВВ: бастапқы зерттеу материалын жинады және іздестірді. Барлық авторлар қолжазбаның соңғы редакциясын оқып, қарап, бекітті.

Қаржыландыру туралы ақпарат

Зерттеу жұмыстары BR23591095 – «Су биологиялық ресурстарын сақтау және орнықты пайдалану үшін су айдындарының әлеуетін бағалау және қордың динамикасын модельдеу негізінде кешенді зерттеу» ғылыми техникалық бағдарламасының 2024-2026 жылдарға арналған бағдарламалық-нысаналы қаржыландыру шеңберінде жүргізілді.

Әдебиеттер тізімі

- 1 MacNeil, C., Prenter, J., Briffa, M., Fielding, NJ, Dick, JT, Riddell, GE, Dunn, AM. (2004). The replacement of a native freshwater amphipod by an invader: roles for environmental degradation and intraguild predation. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 61(9), 1627-1635.
- 2 Costa, FO, Henzler, CM, Lunt, DH, Whiteley, NM, Rock, J. (2009). Probing marine Gammarus (Amphipoda) taxonomy with DNA barcodes. *Systematics and Biodiversity*, 7(4), 365-379. DOI: 10.1017/S1477200009990120.

- 3 Hou, Z., Sket, B. (2016). A review of Gammaridae (Crustacea: Amphipoda): the family extent, its evolutionary history, and taxonomic redefinition of genera. *Zoological journal of the Linnean society*, 176(2), 323-348. DOI:10.1111/zoj.12318.
- 4 Chaumot, A., Geffard, O., Armengaud, J., Maltby, L. (2015). *Gammarids as reference species for freshwater monitoring*. In *Aquatic ecotoxicology*. Academic Press. 253-280.
- 5 Katouzian, AR, Sari, A., Macher, JN, Weiss, M., Saboori, A., Leese, F., Weigand, AM. (2016). Drastic underestimation of amphipod biodiversity in the endangered Irano-Anatolian and Caucasus biodiversity hotspots. *Scientific Reports*, 6(1), 22507.
- 6 Karaman, GS, Pinkster, S. (1977). Freshwater Gammarus species from Europe, North Africa and adjacent regions of Asia (Crustacea-Amphipoda). Part I. Gammarus pilex-group and related species. *Bijdragen tot de Dierkunde*, 47(1), 1-97.
- 7 Sidorov, D., Hou, Z., Sket, B. (2018). Three new remarkable amphipod species (Crustacea: Gammaridae) from springs and subterranean waters of Central Asia. *Zootaxa*, 4444(4), 437-461.
- 8 Sket, B., Sidorov, D., Hou, Z. (2019). What happened to the genus Gammarus (Crustacea: Amphipoda) in Central Asia. *Acta Biologica Slovenica*, 62(2), 45-66.
- 9 Väinölä, R., Witt, JDS, Grabowski, M., Bradbury, JH, Jazdzewski, K., Sket, B. (2007). Global diversity of amphipods (Amphipoda; Crustacea) in freshwater. *Hydrobiologia*, 595(1), 241-255. DOI:10.1007/s10750-007-9024-1.
- 10 Alther, R., Fronhofer, EA, Altermatt, F. (2021). Dispersal behaviour and riverine network connectivity shape the genetic diversity of freshwater amphipod metapopulations. *Molecular Ecology*, 30(24), 6551-6565.
- 11 Hebert, PD, Ratnasingham, S., De Waard, JR. (2003). Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 270(suppl_1), S96-S99.
- 12 Kress, WJ, Erickson, DL. (2008). DNA barcodes: genes, genomics, and bioinformatics. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(8), 2761-2762.
- 13 Kwon, SY, Kim, MS, Heo, JH, Kim, YH. (2020). A new Gammarus species (Crustacea, Amphipoda, Gammaridae) from Northwestern Islands, South Korea. *Zootaxa*, 4896(4), zootaxa-4896.
- 14 Zhao, S., Meng, K., Hou, Z. (2017). Two new Gammarus species and a new name (Crustacea: Amphipoda: Gammaridae) from Northwest China. *Zootaxa*, 4273(2), 195-215.
- 15 Zhang, K., Wang, J., Ge, Y., Ma, J., Zhou, Q. (2022). A new Gammarus species from Xinjiang Uygur Autonomous Region (China) with a key to Xinjiang freshwater gammarids (Crustacea, Amphipoda, Gammaridae). *ZooKeys*, 1090, 129.
- 16 Hou, ZE, Li, S., Morino, H. (2002). Three new species of the genus Gammarus (Crustacea, Amphipoda, Gammaridae) from Yunnan, China. *Zoological science*, 19(8), 939-960.
- 17 Baytaşoğlu, H., Aksu, İ., Özbek, M. (2024). Gammarus sezgini sp. nov. (Arthropoda, Amphipoda, Gammaridae), a new amphipod species from the Eastern Black Sea region of Türkiye. *Zoosystematics & Evolution*, 100(3).
- 18 Eme, D., Zagmajster, M., Delić, T., Fišer, C., Flot, JF, Konecny-Dupré, L., Malard, F. (2018). Do cryptic species matter in macroecology? Sequencing European groundwater crustaceans yields smaller ranges but does not challenge biodiversity determinants. *Ecography*, 41(2), 424-436.
- 19 Folmer, O., Black, M., Hoeh, W., Lutz, R., Vrijenhoek, R. (1994). DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.*, 3, 294-299.
- 20 Mamos, T., Wattier, R., Majda, A., Sket, B., Grabowski, M. (2014). Morphological vs. molecular delineation of taxa across montane regions in Europe: The case study of Gammarus balcanicus. *J. Zool. Syst. Evol. Res.*, 52, 237-248.
- 21 Hebert, PD, Cywinska, A., Ball, SL, DeWaard, JR. (2003). Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 270(1512), 313-321.

References

- 1 MacNeil, C., Prenter, J., Briffa, M., Fielding, NJ, Dick, JT, Riddell, GE, Dunn, AM. (2004). The replacement of a native freshwater amphipod by an invader: roles for environmental degradation and intraguild predation. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 61(9), 1627-1635.
- 2 Costa, FO, Henzler, CM, Lunt, DH, Whiteley, NM, Rock, J. (2009). Probing marine Gammarus (Amphipoda) taxonomy with DNA barcodes. *Systematics and Biodiversity*, 7(4), 365-379. DOI:10.1017/S1477200009990120.
- 3 Hou, Z., Sket, B. (2016). A review of Gammaridae (Crustacea: Amphipoda): the family extent, its evolutionary history, and taxonomic redefinition of genera. *Zoological journal of the Linnean society*, 176(2), 323-348. DOI:10.1111/zoj.12318.
- 4 Chaumot, A., Geffard, O., Armengaud, J., Maltby, L. (2015). *Gammarids as reference species for freshwater monitoring*. In Aquatic ecotoxicology. Academic Press. 253-280
- 5 Katouzian, AR, Sari, A., Macher, JN, Weiss, M., Saboori, A., Leese, F., Weigand, AM. (2016). Drastic underestimation of amphipod biodiversity in the endangered Irano-Anatolian and Caucasus biodiversity hotspots. *Scientific Reports*, 6(1), 22507.
- 6 Karaman, GS, Pinkster, S. (1977). Freshwater Gammarus species from Europe, North Africa and adjacent regions of Asia (Crustacea-Amphipoda). Part I. Gammarus pilex-group and related species. *Bijdragen tot de Dierkunde*, 47(1), 1-97.
- 7 Sidorov, D., Hou, Z., Sket, B. (2018). Three new remarkable amphipod species (Crustacea: Gammaridae) from springs and subterranean waters of Central Asia. *Zootaxa*, 4444(4), 437-461.
- 8 Sket, B., Sidorov, D., Hou, Z. (2019). What happened to the genus Gammarus (Crustacea: Amphipoda) in Central Asia. *Acta Biologica Slovenica*, 62(2), 45-66.
- 9 Väinölä, R., Witt, JDS, Grabowski, M., Bradbury, JH, Jazdzewski, K., Sket, B. (2007). Global diversity of amphipods (Amphipoda; Crustacea) in freshwater. *Hydrobiologia*, 595(1), 241-255. DOI:10.1007/s10750-007-9024-1.
- 10 Alther, R., Fronhofer, EA, Altermatt, F. (2021). Dispersal behaviour and riverine network connectivity shape the genetic diversity of freshwater amphipod metapopulations. *Molecular Ecology*, 30(24), 6551-6565.
- 11 Hebert, PD, Ratnasingham, S., De Waard, JR. (2003). Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 270(suppl_1), S96-S99.
- 12 Kress, WJ, Erickson, DL. (2008). DNA barcodes: genes, genomics, and bioinformatics. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(8), 2761-2762.
- 13 Kwon, SY, Kim, MS, Heo, JH, Kim, YH. (2020). A new Gammarus species (Crustacea, Amphipoda, Gammaridae) from Northwestern Islands, South Korea. *Zootaxa*, 4896(4), zootaxa-4896.
- 14 Zhao, S., Meng, K., Hou, Z. (2017). Two new Gammarus species and a new name (Crustacea: Amphipoda: Gammaridae) from Northwest China. *Zootaxa*, 4273(2), 195-215.
- 15 Zhang, K., Wang, J., Ge, Y., Ma, J., Zhou, Q. (2022). A new Gammarus species from Xinjiang Uygur Autonomous Region (China) with a key to Xinjiang freshwater gammarids (Crustacea, Amphipoda, Gammaridae). *ZooKeys*, 1090, 129.
- 16 Hou, ZE, Li, S., Morino, H. (2002). Three new species of the genus Gammarus (Crustacea, Amphipoda, Gammaridae) from Yunnan, China. *Zoological science*, 19(8), 939-960.
- 17 Baytaşoğlu, H., Aksu, İ., Özbek, M. (2024). Gammarus sezgini sp. nov. (Arthropoda, Amphipoda, Gammaridae), a new amphipod species from the Eastern Black Sea region of Türkiye. *Zoosystematics & Evolution*, 100(3).
- 18 Eme, D., Zagmajster, M., Delić, T., Fišer, C., Flot, JF, Konecny-Dupré, L., Malard, F. (2018). Do cryptic species matter in macroecology? Sequencing European groundwater crustaceans yields smaller ranges but does not challenge biodiversity determinants. *Ecography*, 41(2), 424-436.
- 19 Folmer, O., Black, M., Hoeh, W., Lutz, R., Vrijenhoek, R. (1994). DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.*, 3, 294-299.

20 Mamos, T., Wattier, R., Majda, A., Sket, B., Grabowski, M. (2014). Morphological vs. molecular delineation of taxa across montane regions in Europe: The case study of *Gammarus balcanicus*. *J. Zool. Syst. Evol. Res.*, 52, 237-248.

21 Hebert, PD, Cywinska, A., Ball, SL, DeWaard, JR. (2003). Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 270(1512), 313-321.

Оценка эффективности выделения и качества ДНК у гаммарусов *Gammarus* spp. (Crustacea: Amphipoda) из различных водоёмов Казахстана

Адырбекова К.Б., Пангереев Б.С., Фёфелов В.В., Исбеков Қ.Б.

Аннотация

Предпосылки и цель. Амфиподы рода *Gammarus* широко распространены в пресноводных экосистемах Северного полушария и часто используются в качестве модельных организмов в экологических, токсикологических и молекулярных исследованиях. Однако, морфологическая идентификация гаммарусов затруднена из-за высокой степени внутривидовой изменчивости и наличия криптических видов. Это делает молекулярные подходы, основанные на анализе митохондриальной ДНК (например, гена *COI*), особенно важными для таксономической верификации и оценки биоразнообразия. Цель настоящей работы – оценить эффективность выделения ДНК и её качества у гаммарусов (*Gammarus* spp.) из различных водоёмов Казахстана, а также протестировать воспроизводимость амплификации гена *COI* методом ПЦР для последующей генетической идентификации образцов.

Материалы и методы. В ходе работы были собраны образцы гаммарусов (*Gammarus* spp.) из различных пресноводных водоёмов северного, южного и восточного Казахстана. Целью данного исследования является оценка эффективности и качества методов выделения ДНК из гаммарусов в различных водоёмах Казахстана. Методика экстракции была адаптирована с учётом специфики тканей амфипод.

Результаты. Полученные образцы ДНК демонстрировали удовлетворительные показатели чистоты и концентрации, обеспечившие успешную ПЦР-амплификацию. Во всех пробах наблюдались удовлетворительные показатели чистоты ДНК, со значениями A260/A280 в диапазоне от 1,69 до 2,00, что указывает на отсутствие значительных белковых примесей. Концентрация нуклеиновых кислот варьировала от 191,6 до 232,0 нг/мкл, что соответствует требованиям для последующей ПЦР-амплификации. Результаты подтверждают применимость разработанного подхода для последующего молекулярно-генетического анализа и идентификации гаммарусов в водоёмах Казахстана.

Закключение. Проведённое исследование позволило оптимизировать методику экстракции ДНК из гаммарусов, собранных в пресноводных водоёмах Казахстана, обеспечив удовлетворительные показатели чистоты и концентрации ДНК, подходящей для ПЦР-амплификации, с успешной визуализацией амплифицированного фрагмента гена *COI* на агарозном геле, что создаёт основу для дальнейших популяционно-генетических исследований амфипод в регионе.

Ключевые слова: ПЦР; выделение ДНК; гаммарус; агарозный гель; электрофорез.

Assessment of DNA extraction efficiency and quality in *Gammarus* spp. (Crustacea: Amphipoda) from various water bodies of Kazakhstan

Kamila B. Adyrbekova, Berik S. Pangereyev, Viktor V. Fefelov, Kuanysh B. Isbekov

Abstract

Background and Aim. Amphipods of the genus *Gammarus* are widely distributed in freshwater ecosystems of the Northern Hemisphere and are commonly used as model organisms in ecological, toxicological, and molecular studies. However, morphological identification of *Gammarus* is complicated

due to the high degree of intraspecific variability and the presence of cryptic species. This makes molecular approaches based on mitochondrial DNA analysis (e.g., the *COI* gene) particularly important for taxonomic verification and biodiversity assessment. This study aimed to assess the efficiency of DNA extraction and its quality in *Gammarus* (*Gammarus* spp.) from various water bodies in Kazakhstan, and to test the reproducibility of *COI* gene amplification using PCR for subsequent genetic identification.

Materials and Methods. *Gammarus* spp. samples (*Gammarus* spp.) were collected from various freshwater bodies in northern, southern, and eastern Kazakhstan.

The DNA extraction protocol was adapted to account for the specific characteristics of amphipod tissues.

Results. The extracted DNA samples demonstrated satisfactory purity and concentration, ensuring successful PCR amplification. All samples showed satisfactory DNA purity, with A260/A280 ratios ranging from 1.69 to 2.00, indicating the absence of significant protein contamination. The nucleic acid concentration varied from 191.6 to 232.0 ng/μL, which meets the requirements for subsequent PCR amplification. The results confirm the applicability of the optimized approach for molecular-genetic analysis and identification of *Gammarus* in the water bodies of Kazakhstan.

Conclusion. This study successfully optimized a DNA extraction protocol for *Gammarus* samples collected from freshwater bodies in Kazakhstan, yielding DNA of satisfactory purity and concentration suitable for PCR amplification. The successful visualization of the amplified *COI* gene fragment on an agarose gel provides a foundation for further population-genetic studies of amphipods in the region.

Keywords: PCR; DNA extraction; *Gammarus*; agarose gel; electrophoresis.