

ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО НАУЧНЫХ ОРГАНИЗАЦИЙ

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
ЮЖНЫЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК (ФГБУН ЮНЦ РАН)

УДК 57(047.31)
№ госрегистрации АААА-А17-117101140018-5
Инв. №

«УТВЕРЖДАЮ»
Председатель ЮНЦ РАН
доктор географических наук
академик



Г.Г. Матишов

20.12.2017

ОТЧЕТ

О НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОЙ РАБОТЕ

Программа фундаментальных научных исследований
государственных академий наук на 2013–2020 годы

52. Биологическое разнообразие

СОХРАНЕНИЕ И РАЗВИТИЕ БИОРЕСУРСНОЙ КОЛЛЕКЦИИ РЕДКИХ
И ИСЧЕЗАЮЩИХ ВИДОВ РЫБ ЮНЦ РАН

(заключительный)

Номер проекта в ИСГЗ ФАНО 0256-2017-0001

Протокол Ученого совета
№ 05 от 20.12.2017 г.

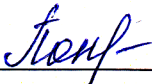

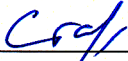

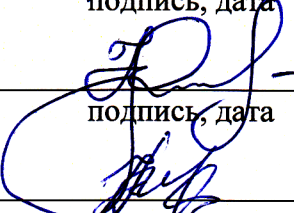
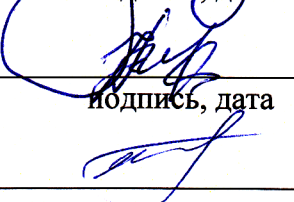
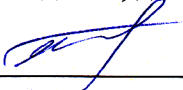
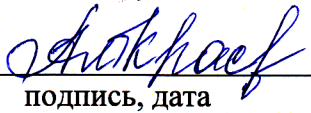


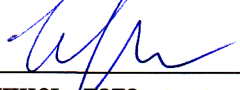
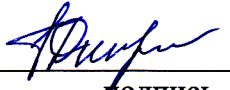
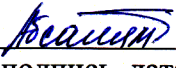
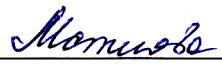
Научный руководитель
д-р геогр. наук, проф.,
академик

A handwritten signature in blue ink, written over a horizontal line. Below the line is the text "подпись, дата" (signature, date).

Г.Г. Матишов

Ростов-на-Дону 2017

СПИСОК ИСПОЛНИТЕЛЕЙ

Руководитель темы, гл. н. с., д-р биол. наук	 _____ подпись, дата	Е.Н. Пономарева
Исполнители темы гл. н. с., д-р биол. наук	 _____ подпись, дата	И.В. Корниенко
в.н. с., канд. биол. наук	 _____ подпись, дата	В.В. Стахеев
в.н.с., канд. биол. наук	 _____ подпись, дата	В.А. Григорьев
с.н.с., канд. техн. наук	 _____ подпись, дата	Ю.И. Юрасов
с.н.с., канд. биол. наук	 _____ подпись, дата	М.В. Коваленко
н.с., канд. биол. наук	 _____ подпись, дата	М.А. Махоткин
н.с., канд. биол. наук	 _____ подпись, дата	А.А. Красильникова
м. н. с.	 _____ подпись, дата	М.Г. Тютякина
м. н. с.	 _____ подпись, дата	Д.А. Чеботарев
м. н. с.	 _____ подпись, дата	В.С. Герасюк
м. н. с.	 _____ подпись, дата	Д.С. Тажбаева
м. н. с.	 _____ подпись, дата	Р.Б. Абсальямов
нормоконтролер	 _____ подпись, дата	Е.С. Матишова

РЕФЕРАТ

Отчет 39 с., 1 рис., 12 табл., 10 источников, 9 прил.

ПОЛИМОРФНЫЕ НУКЛЕОТИДЫ, МОЛЕКУЛЯРНО ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МАРКЕРЫ, МИТОХОНДРИАЛЬНАЯ ДНК, ХОЗЯЙСТВЕННО ЦЕННЫЙ ПРИЗНАК, СТЕРЛЯДЬ, СТЕРБЕЛ, ЖИВАЯ КОЛЛЕКЦИЯ

Объект исследования – биоресурсная коллекция «Коллекционный фонд редких и исчезающих видов рыб».

Цель работы – поддержание биоресурсной коллекции «Коллекционный фонд редких и исчезающих видов рыб».

Результаты. В рамках выполнения государственного задания были проведены следующие работы:

- 1) Создан технологический паспорт «Коллекционный фонд редких и исчезающих видов рыб» ЮНЦ РАН, включающий в себя: а) описание полного списка стандартных операционных процедур (СОПов), обеспечивающих поддержание и развитие коллекционного фонда; б) Научно-техническое обоснование смет стандартных операционных процедур коллекции ЮНЦ РАН. 2) Сформирован технологический паспорт «Коллекционный фонд редких и исчезающих видов рыб» и размещен на сайте ЮНЦ РАН. 3) Выполнены в рамках верификации СОПов: а) оценка современного состояния коллекции видов рыб и их гибридов; б) паспортизация биологической коллекции редких и исчезающих видов рыб по данным полиморфизма STR-локусов и фрагментов мтДНК. Охарактеризованы 107 рыб (из них 60 стерлядей и 47 стербелов) по 5 локусам *Afug41*, *Afug51*, *An20*, *AoxD161* и *AoxD165*, 28 особей стербелов по первичной последовательности мтДНК в области D-петли; в) проведены мероприятия по пополнению коллекционных фондов 4) Создан формат унифицированного описания образцов материала из «Коллекционный фонд редких и исчезающих видов рыб» в компьютерной базе данных 5) Определены ключевые характеристики описания единиц хранения, правил доступа и оформления заявок на работу с коллекционными образцами, перечни дополнительных услуг, выполняемых на базе коллекции б) Проведена первичная инвентаризация материалов из «Коллекционного фонда редких и исчезающих видов рыб», в компьютерной базе данных 7) Направлены в печать три статьи в рецензируемые журналы (Scopus и WoS), подготовленные на основе материалов коллекции; 8) Сформирован календарный план работ по выполнению дополнительного государственного задания. 9) Отчет о проделанной работе в рамках дополнительного государственного задания размещен на сайте ЮНЦ РАН с указанием ссылки на номер заключенного с ФАНО России соглашения на выполнение дополнительного государственного задания.

СОДЕРЖАНИЕ

Обозначения и сокращения	5
Введение	6
Основная часть	8
1 Общая информация о коллекции	8
2 Краткая информация о проделанной работе в рамках дополнительного государственного задания	9
3 Регистрация в государственных информационных системах и финансирование	9
4 Материалы и методы	9
5 Результаты, полученные в рамках дополнительного государственного задания	15
Заключение	25
Список использованных источников	26
Приложение А. Библиографический список публикаций, полученных в результате выполнения научно-исследовательской работы	27
Приложение Б Стандартная операционная процедура «Типирование тандемных повторов митохондриальной ДНК осетровых рыб»	29
Приложение В Стандартная операционная процедура «Создание ДНК- депозитария биологических образцов (крови) осетровых рыб»	30
Приложение Г Стандартная операционная процедура «Исследование полиморфизма микросателлитных локусов осетров»	31
Приложение Д Стандартная операционная процедура при генетической паспортизации биологической коллекции редких и исчезающих видов рыб «Секвенирование митохондриальной ДНК осетровых рыб»	32
Приложение Ж Стандартная операционная процедура «Определение гидрохимических параметров среды»	33
Приложение К Стандартная операционная процедура «Определение биогенных элементов на аппаратном комплексе Scalar»	35
Приложение Л Стандартные операционные процедуры «Поддержание необходимого уровня жидкого азота в криохранилище»	37
Приложение М Стандартные операционные процедуры «Содержание и уход за биоресурсной коллекцией ЮНЦ РАН»	38

ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ

БК ЮНЦ РАН - биоресурсная коллекция Южного научного центра Российской академии наук

мтДНК – митохондриальная ДНК

ПЦР – полимеразная цепная реакция

СОП – стандартная операционная процедура

Стербел – гибрид стерляди и белуги

ВВЕДЕНИЕ

Одним из наиболее информативных генетических методов исследования биологических объектов, в том числе рыб, является изучение ДНК-маркёров, которые позволяют оценить полиморфизм, приводящий к функциональным генетическим вариантам.

Перспективным представляется использование в качестве маркерных систем полиморфных нуклеотидных последовательностей ДНК, которые дают возможность использовать для анализа любые ткани и органы, независимо от стадии развития организма. В частности, такими маркёрами могут выступать полиморфные локусы митохондриальной (мт) ДНК.

На сегодняшний день практически отсутствуют исследования по генетической оценке разнообразия продукционных свойств осетровых рыб и, в частности, плодовитости и скорости созревания.

Для создания теоретической основы при разработке новых технологий формирования высокопродуктивных стад в настоящей работе проведено исследование D-петли мтДНК с целью поиска перспективных молекулярно-генетических маркёров, ассоциированных с экспрессивностью продукционных свойств гибридов осетровых рыб.

Выбор мтДНК в качестве ДНК-маркёра неслучаен. Во-первых, мультикопийность мтДНК позволяет работать даже с небольшим количеством биологического материала. Во-вторых, количество мтДНК в онтогенезе подвержено значительным колебаниям [1]. В третьих, изменения энергетики, такие, как физическая нагрузка или переохлаждение, ведут к изменению количества митохондрий [2, 3], и, соответственно, мтДНК.

В соответствии с вышеизложенным, количество митохондрий и мтДНК в тканях рыб, содержащихся в установках замкнутого водоснабжения (т.е. в условиях ограниченной подвижности) с большой вероятностью, будет отличаться от диких рыб, не имеющих ограничений физической активности. В виду того, что митохондриальный геном кодирует 37 генов, двадцать два из которых кодируют молекулы транспортных РНК, два – рибосомные РНК (12S и 16S рРНК) и тринадцать – ферментные белки, вовлеченные в электронную транспортную цепь окислительного фосфорилирования и производства АТФ, значительные колебания количества мтДНК в тканях животных в условиях ограниченной подвижности, вероятно, будет оказывать влияние на такие хозяйственно ценные признаки, как скорость созревания и плодовитость.

Цель работы – поддержание и развитие биоресурсной коллекции и оказание услуг по работе с единицами хранения.

Задачи:

1) Создать технологический паспорт БК ЮНЦ РАН, включающий в себя: а) описание полного списка стандартных операционных процедур (СОПов), обеспечивающих поддержание и развитие коллекционного фонда; б) Научно-техническое обоснование смет стандартных операционных процедур коллекции ЮНЦ РАН.

2) Сформировать технологический паспорт БК ЮНЦ РАН и разместить на интернет сайте ЮНЦ РАН.

3) Выполнить в рамках верификации СОПов: а) оценку современного состояния коллекции видов рыб и их гибридов; б) паспортизировать биологическую коллекцию редких и исчезающих видов рыб по данным полиморфизма STR-локусов и фрагментов мтДНК (охарактеризованы не менее 80 рыб по пяти локусам, не менее 20 особей по первичной последовательности фрагмента мтДНК); в) провести мероприятия по пополнению коллекционных фондов

4) Создать формат унифицированного описания образцов материала из «Коллекционный фонд редких и исчезающих видов рыб» в компьютерной базе данных

5) Определить ключевые характеристики описания единиц хранения, правил доступа и оформления заявок на работу с коллекционными образцами, перечни дополнительных услуг, выполняемых на базе коллекции

6) Провести первичная инвентаризацию материалов из «Коллекционного фонда редких и исчезающих видов рыб», в компьютерной базе данных

7) Направить в печать не меньше двух рукописей статей в рецензируемые журналы (Scopus и WoS), подготовленных на основе материалов коллекции, одна из которых принята в печать.

8) Сформировать календарный план работ по выполнению дополнительного государственного задания.

9) Разместить отчет о проделанной работе в рамках дополнительного государственного задания на сайте ЮНЦ РАН с указанием ссылки на номер заключенного с ФАНО России соглашения на выполнение дополнительного государственного задания.

В целом, поставленные цели и задачи дают необходимую базу для функционирования БК ЮНЦ РАН.

ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

1 Общая информация о коллекции

1.1 Название коллекции: коллекционный фонд редких и исчезающих видов рыб.

1.2 Наименование организации ФАНО России – держателя коллекции (если организация прошла реорганизацию в 2017 г, то указать старое и новое название): 256, ЮНЦ РАН (Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Южный научный центр Российской академии наук

1.3 Регистрационный номер биоресурсной коллекции в информационной системе «Парус» ФАНО России: 0256-2017-0001

1.4 Направление ФНИ: 52. Биологическое разнообразие

1.5 Руководитель коллекции, поддерживающий коллекцию: Матишов Геннадий Григорьевич, Председатель ЮНЦ РАН, академик, д.г.н., профессор, ssc-ras@ssc-ras.ru тел. (863)250-98-25

1.6 Назначение коллекции: Инновационно-экспериментальный аквариальный комплекс развернут для разработки технологий по сохранению и восстановлению редких и исчезающих видов рыб Азово-Черноморского и Каспийского бассейнов

1.7 Регистрация коллекции в перечне ЦКП/УНУ «Современная исследовательская инфраструктура Российской Федерации»: Да, № 73602 в составе УНУ МУК ЮНЦ РАН.

1.8 Наименование, реестровый номер и адрес ЦКП/УНУ на сайте <http://www.ckp-rf.ru>: Экспериментальная модульная установка-комплекс (МУК) ЮНЦ РАН (МУК) http://www.ckp-rf.ru/usu/73602/?sphrase_id=7083834

1.9 Дата образования коллекции: 2005

1.10 Отражение коллекционной деятельности в Уставе организации: Нет. ЮНЦ РАН находится в завершающей стадии реорганизации и в новом Уставе ФИЦ ЮНЦ РАН будет отражена деятельность Биоресурсной коллекции.

1.11 Положение о коллекции, утвержденное на Ученом совете организации: выписка из протокола №7 от 14.10.2016 заседания Ученого совета

1.12 Адрес WEB-сайта организации, на котором представлена информация о коллекции: <http://www.ssc-ras.ru/ru/pageBioK/>

2 Краткая информация о проделанной работе в рамках дополнительного государственного задания

2.1 Текст Отчета представлен на:

а) WEB-сайте организации: <http://www.ssc-ras.ru/ru/pageBioK/>

б) Информационном портале БРК: <http://brk.forge.sccc.ru/kollekcii/kollekcii-zhivotnyh-dikie-i-laboratornye-zhivotnye/kollekcionnyy-fond-redkih-i>
http://www.biores.cytogen.ru/brc_finance/collections/41

2.2 Содержание основных результатов работы по дополнительному госзаданию в соответствии с ПФНИ ГАН: Разработка научных основ технологий сохранения восстановления редких, исчезающих и хозяйственно-ценных видов живых организмов

3 Регистрация в государственных информационных системах и финансирование

3.1 Регистрационный номер дополнительного госзадания по БРК в информационной системе «Парус» ФАНО России: 0256-2017-0001.

3.2 Регистрационный номер дополнительного госзадания по БРК в информационной системе ЦИТИС– АААА-А17-117101140018-5

3.3 Отчет по дополнительному госзаданию 0324-2017-0002 подготовлен и загружен в систему Парус 31.01.2018

3.4 Отчет по дополнительному госзаданию АААА-А17-117101140018-5 подготовлен и загружен в систему ЦИТИС 31.01.2018

3.5 Объем финансирования (3900 тыс. руб.), выделенного на выполнение ДГЗ из средств ФАНО России в 2017 году (*дополнительное соглашение № 007-ГЗ/Ц2735/256/4 от 8 ноября 2017 г.*)

3.6 Объем финансирования, выделенного на приобретение крупного оборудования из средств ФАНО России в 2017 г. (свыше 500 000 руб.) *не выделялось*

4 Материалы и методы

В качестве модели для изучения генетического детерминирования плодовитости в Южном научном центре Российской Академии наук исследовали продукционное стадо из 49 гибридов *Acipenser ruthenus* x *Acipenser huso*. Все гибриды были выращены в условиях аквакультуры в установках замкнутого водоснабжения.

Для контроля проводили забор крови от 60 особей *A.ruthenus*. Каждой особи для последующей идентификации предварительно внутримышечно был введен миниатюрный чип-имплантант с индивидуальным ID-номером.

Забор крови осуществляли в стерильные пробирки стерильными шприцами из хвостовой вены. В качестве антикоагулянта использовали 110 мМ цитрат натрия в соотношении 1:10 (антикоагулянт:кровь).

Хранение биологического материала осуществляли в специальной буферной композиции, позволяющей сохранять ДНК в течение длительного времени [4].

Выделение и количественная оценка препаратов ДНК – стандартным методом с использованием ионообменной смолы Chelex 100 [5], а также с помощью фенол-органической экстракции [6].

Для оценки количества мтДНК осетров проводили ПЦР «в реальном времени» участка гена *16S ribosomal RNA* размером 97 нуклеотидов с использованием следующих праймеров: F2125 5'-GTAGCGTAATCACTTGTCT-3'; R2221 5'-GAGCAGGTCAATTCTCACT-3'.

Структуры этих и последующих праймеров были подобраны на основании данных EMBL GenBank (KF153104.1) [7].

Реакционная смесь ПЦР включала следующие компоненты «набора реагентов для проведения ПЦР-PB в присутствии EVA Green» (Синтол) в следующих соотношениях:

Компонент	Объем, мкл
10x ПЦР буфер, содержащий EVA Green	2,5
MgCl ₂ , 25 мМ	2,0
dNTP, 2,5 мМ	2,0
Праймер F, 1 ОЕ	1,0
Праймер R, 1 ОЕ	1,0
BSA, 4 мг/мл	0,5
Taq ДНК-полимераза, 5 Е/мкл	1,0
H ₂ O	14,0
Образец ДНК	1,0

Аmplификацию проводили в следующем режиме:

95 °C	5 мин	
95 °C	15 с	
52 °C	10 с	45 циклов
72 °C	30 с	

Перед проведением ПЦР готовили стандартные препараты ДНК осетровых рыб с известной концентрацией, предварительно измеренной с помощью спектрофотометра Nanodrop ND-1000 (Nanodrop Technologies Inc.).

Регистрацию накопления ампликонов и построение калибровочных кривых проводили с помощью термоциклера с мультисканальным детектором CFX96 (Bio-Rad) по технологии выполнения ПЦР «в реальном времени» с использованием интеркалирующего красителя EVA Green с последующим измерением кривых плавления ампликонов.

Анализ данных ПЦР «в реальном времени» проводили с помощью программы «CFX Manager» (v. 2.1.1022.0523).

Концентрацию ДНК в растворах доводили до 10 нг/мкл разбавлением стерильной деионизованной водой.

Типирование микросателлитных локусов. Генотипирование осетров проводили по пяти микросателлитным локусам (*Afug41*, *Afug51*, *An20*, *AoxD161*, *AoxD165*) согласно методике [8] с использованием следующих праймеров:

№пп	Название	Последовательность, 5' -> 3'	Метка
1	An20F	AAT-AAC-AAT-CAT-TAC-ATG-AGG-CT	R6G
2	An20R	TGG-TCA-GTT-GTT-TTT-TTA-TTG-AT	-
3	Afug41F	TGA-CGC-ACA-GTA-GTA-TTA-TTT-ATG	FAM
4	Afug41R	TGA-TGT-TTG-CTG-AGG-CTT-TTC	-
5	Afug51F	ATA-ATA-ATG-AGC-GTG-CTT-TCT-GTT	R6G
6	Afug51R	ATT-CCG-CTT-GCG-ACT-TAT-TTA	-
7	AoxD165F	TTT-GAC-AGC-TCC-TAA-GTG-ATA-CC	TAMRA
8	AoxD165R	AAA-GCC-CTA-CAA-CAA-ATG-TCA-C	-
9	AoxD161F	GTT-TGA-AAT-GAT-TGA-GAA-AAT-GC	FAM
10	AoxD161R	TGA-GAC-AGA-CAC-TCT-AGT-TAA-ACA-GC	-

Реакционная смесь при проведении ПЦР-реакции для конечного объема 25 мкл состояла из:

Компонент	Объем, мкл
10x ПЦР буфер	2,5
MgCl ₂ , 25 mM	1,8
dNTP, 2,5 mM	2,0
Смесь прямых праймеров (An20F, Afug41F, Afug51F, AoxD165F, AoxD161F, по 1 ОЕ/мл), меченные флуоресцентными метками (R6G, FAM, TAMRA)	2,5
Смесь обратных праймеров (An20R, Afug41R, Afug51R, AoxD165R, AoxD161R, по 1 ОЕ/мл)	5,0
Taq ДНК-полимераза, 5 Е/мкл	0,5
H ₂ O	9,7
Образец ДНК	1,0

Для проведения реакции энзиматической амплификации использовали термоциклер T100 (Bio-Rad). Скорость нагрева/охлаждения блока термоциклера составляла 1 °C/с. Перед началом циклов амплификации смесь однократно прогревали при +95 °C в течение 3 мин.

Затем проводили 8 циклов предварительной амплификации, которые состояли из денатурации в течение 20 с при температуре 95 °С, отжига праймеров в течение 25 с при 58 °С в первом, до 54,5 °С в восьмом цикле, со снижением 0,5 °С за цикл и последующим удлинением цепи при 65 °С в течение 40 с.

Последующие 25 циклов амплификации состояли из денатурации в течение 20 с при температуре 95 °С, отжига праймеров при 54 °С в течение 25 с и удлинения цепи при 65 °С в течение 40 с. По завершении амплификационную смесь инкубировали при 65 °С в течение 10 мин.

Перед проведением электрофореза ампликоны разводили деионизованной водой в 3 раза. Электрофорез образцов проводили с помощью ДНК-анализатора ABI PRISM 3500 (Applied Biosystems) с использованием полимера NanoPOP7 (Nimagen). В качестве размерного стандарта использовали S450 (Синтол). Идентификацию аллелей проводили с помощью программы GeneMapper (версия 4.1). Для оценки длины ампликонов по внутреннему стандарту S450 применяли алгоритм «Local Southern Method» [9]. При этом аппроксимацию длины неизвестного фрагмента программно проводили по четырем ближайшим фрагментам стандарта длины (двум большего и двум меньшего размера по сравнению с неизвестным фрагментом). По найденным четырем ближайшим фрагментам стандарта длины вычислили коэффициенты линейной калибровочной кривой, по которой и определили длину ампликонов

Статистическая обработка результатов типирования микросателлитных локусов. Данные анализировали с использованием современных статистических подходов, применяемых в популяционной генетике с помощью пакета генетического анализа GenAlEx v. 6.5 [10]. По каждому локусу подсчитывали число аллелей (N_a) и наблюдаемую гетерозиготность (H_o).

Информационный индекс Шеннона (I) вычисляли по формуле $I = \sum_{i=1}^n p_i \ln p_i$, где p_i – частота i -го аллеля.

Ожидаемую гетерозиготность (H_e) рассчитывали по формуле $H_e = 1 - \sum_{i=1}^n p_i^2$, где p_i – частота i -го аллеля.

Индекс фиксации (F) рассчитывали по формуле $F = 1 - H_o/H_e$, где H_o и H_e – наблюдаемая и ожидаемая гетерозиготность, соответственно.

Вероятность случайного совпадения генотипов (Matching Probability, MP), рассчитывали по формуле $MP = \sum_{i=a}^n G_i^2$, где G_i – i -генотип.

Степень различения особей (Power of Discrimination, PD), рассчитывали по формуле

$$PD = 1 - \sum_{i=a}^n G_i^2, \text{ где } G_i - i\text{-генотип.}$$

Проверку гипотезы о соблюдении распределения генотипов стерляди по каждому из STR-локусов ожидаемому при равновесии Харди-Вайнберга проводили с использованием критерия χ^2 , который рассчитывали по формуле $\chi_{\text{факт.}}^2 = \sum_{i=1}^n \frac{(G_{oi} - G_{ei})^2}{G_{ei}}$, где G_{oi} – наблюдаемый i -генотип, G_{ei} – ожидаемый i -генотип. При значении $\chi_{\text{факт.}}^2$ больше, чем $\chi_{\text{крит.}}^2$ при используемом числе степеней свободы (df) и уровне значимости $p_{\text{крит.}} = 0,05$, принимали отклонение от ожидаемого при равновесии Харди-Вайнберга распределения генотипов.

Проведение энзиматической амплификации региона D-петли, содержащие тандемные повторы. Регион D-петли, содержащий тандемные повторы мтДНК осетров амплифицировали с использованием праймеров:

F15693 5'-GCTAAGATTCTACATTAААСТ-3';

R16342 5'-ТАССТСТААСАТТААТСАGATGCC-3'.

Реакционная смесь при проведения ПЦР-реакции для конечного объема 25 мкл состояла из:

Компонент	Объем, мкл
10x ПЦР буфер	2,5
MgCl ₂ , 25 mM	2,0
dNTP, 2,5 mM	2,0
Праймер F, 1 OE	1,0
Праймер R, 1 OE	1,0
Taq ДНК-полимераза, 5 E/мкл	0,5
H ₂ O	15,0
Образец ДНК	1,0

Перед началом циклов амплификации смесь однократно прогревали при +95 °C в течение 5 мин. Каждый цикл амплификации состоял из денатурации в течение 15 с при температуре 95 °C, отжига праймеров при 52 °C в течение 20 с и удлинения цепи при 72 °C в течение 1 мин. Количество циклов амплификации было равно 34, по завершении смесь инкубировали при 72 °C в течение 10 мин. Для проведения реакции энзиматической амплификации использовали термоциклер T100 (Bio-Rad). Скорость нагрева/охлаждения блока термоциклера составляла 1 °C/с.

Проведение электрофореза в геле агарозы. Ампликоны разделяли методом электрофореза в 1,5% геле агарозы при напряженности электрического поля 6,5 В/см в течение 50 мин. Оценку размеров ампликонов проводили относительно маркера 100 bp + 1,5 kV Ladder (SibEnzyme).

Проведение энзиматической амплификации D-петли. Контрольный регион амплифицировали с использованием методики полимеразной цепной реакции (ПЦР) с помощью праймеров, ограничивающих регион D-петли мтДНК:

F15604 5'-GGTCTTGTAACCGAAGATCGA-3' (область гена tRNA-Thr);

R49 5'-GGTCATCTTAACATCTTCA-3' (область гена tRNA-Phe).

Реакционная смесь при проведении ПЦР-реакции для конечного объема 25 мкл состояла из:

Компонент	Объем, мкл
10x ПЦР буфер	2,5
MgCl ₂ , 25 мМ	2,0
dNTP, 2,5 мМ	2,0
Праймер F, 1 ОЕ	1,0
Праймер R, 1 ОЕ	1,0
Тaq ДНК-полимераза, 5 Е/мкл	0,5
H ₂ O	15,0
Образец ДНК	1,0

Перед началом циклов амплификации смесь однократно прогревали при +95 °С в течение 5 минут. Каждый цикл амплификации состоял из денатурации в течение 20 с при температуре 95 °С, отжига праймеров при 50 °С в течение 20 с и удлинения цепи при 72 °С в течение 2 мин. Количество циклов амплификации было равно 34, по завершении смесь инкубировали при 72 °С в течение 10 мин. Для проведения реакции энзиматической амплификации использовали термоциклер T100 (Bio-Rad). Скорость нагрева/охлаждения блока термоциклера составляла 1 °С/с.

Далее ампликоны подвергали очистке от не включившихся нуклеотидтрифосфатов и праймеров с помощью набора «GeneJET PCR Purification Kit» (Fermentas).

Секвенирование амплифицированных участков D-петли мтДНК осетров. Процедуре секвенирования подвергали ДНК только 28 гомоплазмичных особей. Секвенирование амплифицированных участков D-петли мтДНК осетров исследуемых объектов проводили с помощью тест-набора для секвенирования DNA Sequencing Kit, BigDye Terminator Cycle

Sequencing Ready Reaction (Applied Biosystems) с использованием флуоресцентно меченных дидезоксинуклеотидтрифосфатов и с одним из праймеров F15604 или R49 с помощью термоциклера T100 (Bio-Rad).

Продукты реакции секвенирования очищали на колонках CentriSep (Applied Biosystems). Капиллярный электрофорез ампликонов проводили с помощью ДНК-анализатора ABI PRISM 3500 (Applied Biosystems) с использованием полимера NanoPOP7 (Nimagen). Анализ нуклеотидных последовательностей выполняли с помощью программы «Sequencing Analysis» (версия 5.4).

Завершающий этап анализа нуклеотидных последовательностей мтДНК выполняли с помощью программы «BioEdit Sequence Alignment Editor» (версия 7.2.5) и MEGA (версия 6.06). Полиморфизм нуклеотидных последовательностей D-петли мтДНК осетров определяли в сравнении с референтной последовательностью (KF153104.1) [7].

5 Результаты, полученные в рамках дополнительного государственного задания

5.1 Подготовка технологического паспорта «Коллекционного фонда редких и исчезающих видов рыб» ЮНЦ РАН.

Созданный технологический паспорт «Коллекционный фонд редких и исчезающих видов рыб» ЮНЦ РАН, включает в себя: а) описание полного списка стандартных операционных процедур (СОПов), обеспечивающих поддержание и развитие коллекционного фонда; б) научно-техническое обоснование смет стандартных операционных процедур коллекции ЮНЦ РАН. СОПы находятся в Приложениях:

- Приложение Б Стандартная операционная процедура «Типирование тандемных повторов митохондриальной ДНК осетровых рыб»
- Приложение В Стандартная операционная процедура «Создание ДНК-депозитария биологических образцов (крови) осетровых рыб»
- Приложение Г Стандартная операционная процедура «Исследование полиморфизма микросателлитных локусов осетров»
- Приложение Д Стандартная операционная процедура при генетической паспортизации биологической коллекции редких и исчезающих видов рыб «Секвенирование митохондриальной ДНК осетровых рыб»
- Приложение Ж Стандартная операционная процедура «Определение гидрохимических параметров среды»
- Приложение К Стандартная операционная процедура «Определение биогенных элементов на аппаратном комплексе Scalar»

- Приложение Л Стандартные операционные процедуры «Поддержание необходимого уровня жидкого азота в криохранилище»
- Приложение М Стандартные операционные процедуры «Содержание и уход за биоресурсной коллекцией ЮНЦ РАН»

Для обоснования смет стандартных операционных процедур и расчета общей стоимости работ, обеспечивающих развитие и поддержание коллекционный фонд редких и исчезающих видов рыб ЮНЦ РАН, были собраны данные об оплате труда, приобретении материалов, расходах на содержание оборудования, коммунальных платежей и иных затратах, необходимых для выполнения работ по перечисленным ниже направлениям деятельности коллекции:

- 1) Выполнение стандартных операционных процедур (СОП).
- 2) Выполнение научно-исследовательских работ.
- 3) Общее содержание коллекции.

Собранные данные были использованы для расчета стоимости выполнения СОПов в соответствии моделью и методикой оценки, разработанными ИЦиГ СО РАН.

5.2 Сформированный технологический паспорт с перечнем СОПов, применяемого оборудования размещен на официальном интернет сайте БК ЮНЦ РАН (<http://www.ssc-ras.ru/ru/pageBioK/>).

5.3 Произведена оценка современного состояния коллекции видов рыб и их гибридов, паспортизирована биологическая коллекция редких и исчезающих видов рыб по данным STR-локусов, выполнено пополнение ремонтно-маточного стада рыб новыми особями

Для генетической паспортизации двух аквакультурных стад осетровых: гибридов (*A. ruthenus* x *A. huso*) и стерляди (*A. ruthenus*), выращенных в установках замкнутого водоснабжения аквариального комплекса береговой научно-экспедиционной базы «Кагальник» ЮНЦ РАН, проведено типирование пяти микросателлитных локусов *Afug41*, *Afug51*, *An20*, *AoxD161*, *AoxD165*. Результаты типирования STR-локусов осетров приведены в таблицах 1-5.

Таблица 1 – Частоты аллелей локуса *Afug41* у разных осетровых (количество стербелов - 47, стерлядей - 60) из аквариального комплекса береговой научно-экспедиционной базы «Кагальник» ЮНЦ РАН

Осетры	Аллель																	
	188	196	200	208	212	216	220	222	224	228	232	236	240	248	252	256	260	264
Стербел	0,0000	0,0532	0,0000	0,0106	0,0000	0,0000	0,0000	0,0213	0,1383	0,2234	0,1702	0,0426	0,1064	0,0213	0,0213	0,0638	0,0106	0,1170
Стерлядь	0,0083	0,0500	0,0083	0,0000	0,1250	0,0083	0,1417	0,0333	0,2000	0,1083	0,0500	0,2000	0,0667	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000

Таблица 2 – Частоты аллелей локуса *Afug51* у разных осетровых (количество стербелов - 47, стерлядей - 60) из аквариального комплекса береговой научно-экспедиционной базы «Кагальник» ЮНЦ РАН

Осетры	Аллель							
	220	227	231	235	239	243	247	248
Стербел	0,0000	0,0106	0,0106	0,4149	0,0851	0,2021	0,2660	0,0106
Стерлядь	0,0083	0,1083	0,0167	0,8167	0,0333	0,0000	0,0167	0,0000

Таблица 3 – Частоты аллелей локуса *An20* у разных осетровых (количество стербелов - 47, стерлядей - 60) из аквариального комплекса береговой научно-экспедиционной базы «Кагальник» ЮНЦ РАН

Осетры	Аллель												
	142	146	156	158	159	160	162	164	166	172	174	176	180
Стербел	0,1596	0,3404	0,0319	0,0106	0,0106	0,0319	0,0000	0,0213	0,0106	0,0000	0,0000	0,3830	0,0000
Стерлядь	0,0000	0,0000	0,0083	0,1000	0,0000	0,0250	0,0083	0,0500	0,0083	0,0083	0,0083	0,7667	0,0167

Таблица 4 – Частоты аллелей локуса *AoxDI61* у разных осетровых (количество стербелов - 47, стерлядей - 60) из аквариального комплекса береговой научно-экспедиционной базы «Кагальник» ЮНЦ РАН

Осетры	Аллель									
	99	103	107	111	115	119	123	127	131	
Стербел	0,4787	0,3298	0,0532	0,0319	0,0745	0,0106	0,0106	0,0000	0,0106	
Стерлядь	0,0000	0,4333	0,1417	0,1333	0,1917	0,0667	0,0083	0,0083	0,0167	

Таблица 5 – Частоты аллелей локуса *AoxDI65* у разных осетровых (количество стербелов - 47, стерлядей - 60) из аквариального комплекса береговой научно-экспедиционной базы «Кагальник» ЮНЦ РАН

Осетры	Аллель										
	166	170	172	174	178	180	182	184	186	188	190
Стербел	0,0000	0,0106	0,0000	0,1064	0,2234	0,4255	0,0851	0,0319	0,0532	0,0426	0,0213
Стерлядь	0,1167	0,0000	0,0083	0,1167	0,3250	0,0000	0,2917	0,0000	0,0750	0,0000	0,0667

Генетические характеристики микросателлитных локусов *Afug41*, *Afug51*, *An20*, *AoxD161*, *AoxD165* приведены в таблице 6.

Таблица 6 – Генетические характеристики микросателлитных локусов *Afug41*, *Afug51*, *An20*, *AoxD161*, *AoxD165* осетровых из аквариального комплекса береговой научно-экспедиционной базы «Кагальник» ЮНЦ РАН

Осетр	Локус	Число особей, <i>N</i>	<i>N_a</i>	<i>N_e</i>	<i>I</i>	<i>H_o</i>	<i>H_e</i>	<i>F</i>	<i>MP</i>	<i>PD</i>
Гибрид (<i>A. ruthenus</i> х <i>A. huso</i>)	<i>AoxD161</i>	47	8	2,876	1,323	1,000	0,652	-0,533	0,137	0,863
	<i>An20</i>	47	9	3,438	1,474	1,000	0,709	-0,410	0,403	0,597
	<i>AoxD165</i>	47	9	3,910	1,677	1,000	0,744	-0,344	0,116	0,884
	<i>Afug41</i>	47	13	7,501	2,208	0,915	0,867	-0,056	0,062	0,938
	<i>Afug51</i>	47	7	3,433	1,395	0,979	0,709	-0,381	0,455	0,545
<i>A. ruthenus</i>	<i>AoxD161</i>	60	8	3,742	1,553	0,783	0,733	-0,069	0,418	0,582
	<i>An20</i>	60	10	1,662	0,944	0,383	0,398	0,038	0,336	0,664
	<i>AoxD165</i>	60	7	4,385	1,641	0,817	0,772	-0,058	0,221	0,779
	<i>Afug41</i>	60	12	7,236	2,135	0,867	0,862	-0,006	0,067	0,933
	<i>Afug51</i>	60	6	1,470	0,696	0,367	0,320	-0,147	0,264	0,736

Из таблицы 6 видно, что для *A. ruthenus* из аквариального комплекса береговой научно-экспедиционной базы «Кагальник» ЮНЦ РАН наиболее полиморфным локусом является *Afug41*, наименее полиморфными – локусы *Afug51* и *An20*. Наиболее информативным микросателлитным локусом при внутривидовой идентификации стерляди также является *Afug41*. Наименее информативным индивидуализирующим локусом является *AoxD161*.

При проверке гипотезы о равновесии Харди-Вайнберга с использованием критерия χ^2 показано соответствие теоретически ожидаемым наблюдаемым частот аллелей стерляди только для локусов *Afug51*, *AoxD161*, *AoxD165*, в соответствии с таблицей 7.

Таблица 7 – Соответствие частот генотипов распределению, ожидаемому при равновесии Харди-Вайнберга, для микросателлитных локусов *Afug41*, *Afug51*, *An20*, *AoxD161*, *AoxD165* стерляди из аквариального комплекса береговой научно-экспедиционной базы «Кагальник» ЮНЦ РАН

Локус*	<i>df</i>	$\chi^2_{\text{факт.}}$	$\chi^2_{\text{крит.}}$	<i>p</i>
<i>AoxD161</i>	28	40,1	41,3	0,065
An20	45	170,7	61,7	<0,001
<i>AoxD165</i>	21	25,5	32,7	0,227
Afug41	66	199,3	86,0	<0,001
<i>Afug51</i>	15	3,0	25,0	1,000
Примечание * - Жирным выделены локусы, по которым наблюдается отклонение частот генотипов от ожидаемого при равновесии Харди-Вайнберга				

Гель-электрофорез и последующее секвенирование фрагмента мтДНК гибридов (*A.ruthenus* x *A.huso*) выявили однонуклеотидные полиморфизмы, такие как транзиции, трансверсии и делеции.

По результатам секвенирования мтДНК гомоплазмичных гибридов *A.ruthenus* x *A.huso* выявлены 3 гаплогруппы (содержащие по 2, 3 или 4 повторяющихся единиц размером 80 н.п.). Последующий анализ однонуклеотидных полиморфизмов позволил провести последующее деление 3 гаплогрупп на 8 гаплотипов, различающиеся между собой однонуклеотидными заменами, в соответствии с таблицей 8.

Таблица 8 – Качественная и количественная характеристика однонуклеотидных замен гомоплазмичных гибридов *A.ruthenus* x *A.huso* из аквариального комплекса ЮНЦ РАН

Делеции	Транзиции				Трансверсии
	T/del	T/C	C/T	A/G	
2	12	10	12	6	1

Помимо точковых полиморфизмов в мтДНК гибридов наблюдали вариабельность длины D-петли, а также наличие гетероплазмии по длине. Причина данной вариабельности по длине заключалась в том, что D-петли мтДНК исследованных осетров содержали тандемные повторяющиеся единицы размером 80 н.п. В пределах исследованной группы локусы, содержащие тандемные повторяющиеся единицы, были высоко консервативны. Однонуклеотидные полиморфизмы, в виде транзиций C↔T, присутствовали только в двух позициях из восьмидесяти, при этом выявлено 4 возможных варианта первичной последовательности повторяющихся единиц, в соответствии с таблицей 9.

Таблица 9 – Частота и первичная структура повторяющихся тандемных единиц D-петли мтДНК гибридов *A.ruthenus* x *A.huso* из аквариального комплекса ЮНЦ РАН

№ _{тип}	Первичная структура 5'-3'	Частота
1	ATGTTTAATCCACATTAACCTTCTAGCCACCATACCATAATGCTTGC GTACATTAААТТАТТТААГТАСАТААGGCATGCT	0,3556
2	ATGTTTAATCCACATTAACCTTCTAGCCACCATATCATAATGCTTGC GTACATTAААТТАТТТААГТАСАТААGGCATGCT	0,0333
3	ATGTTTAATCCACATTAACCTTCTAGTCACCATACCATAATGCTTGC GTACATTAААТТАТТТААГТАСАТААGGCATGCT	0,0222
4	ATGTTTAATCCACATTAACCTTCTAGTCACCATATCATAATGCTTGC GTACATTAААТТАТТТААГТАСАТААGGCATGCT	0,5889
Примечание - Полиморфные позиции выделены серым		

По количеству повторяющихся единиц в tandemных повторах исследованные осетры распределились следующим образом: 2, 3, 4 и 5 повторяющихся 80-нуклеотидных единиц, в соответствии с рисунком 1.

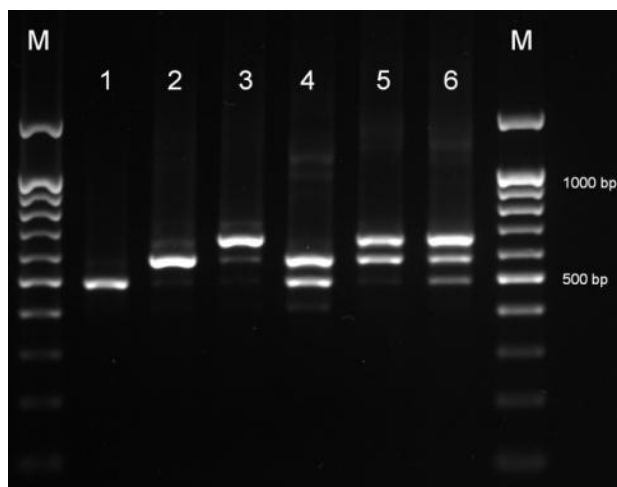


Рисунок 1 – Ампликоны, полученные с помощью праймеров F15693/R16342. Обозначения:

«М» - 100bp+1,5 kВ Ladder (SibEnzyme); «1» - D-петля осетра с 2 повторяющимися единицами; «2» - D-петля осетра с 3 повторяющимися единицами; «3» - D-петля осетра с 4 повторяющимися единицами; «4» - гетероплазмик, содержащий в D-петле 2 и 3 повторяющиеся единицы; «5» - гетероплазмик, содержащий в D-петле 3 и 4 повторяющиеся единицы; «6» - гетероплазмик, содержащий в D-петле 2, 3 и 4 повторяющиеся единицы.

При секвенировании ампликонов в области tandemных повторов идентифицированы высококонсервативные сиквенсы (5'-ATGTTТААТСССАТ-3'), ассоциированные с терминацией репликации мтДНК (TAS), при этом каждая повторяющаяся единица tandemного повтора содержала по одному TAS-элементу. Кроме того, по одному TAS-элементу локализовано вне tandemного повтора. Соответственно исследованные нами осетры имели в составе D-петли от 3 до 6 TAS-элементов, как представлено в таблице 10.

Таблица 10 – Частота особей, содержащих определенное число повторов в D-петле гибридов *A. ruthenus* x *H. huso* аквариального комплекса ЮНЦ РАН

Количество повторяющихся единиц	Гаплогруппа	Количество осетров	Количество гетероплазмиков	Количество гомоплазмиков	Частота
2	I	12	9	3	0,2449
3	II	33	21	12	0,6735
4	III	30	18	12	0,6122
5	IV	1	1	0	0,0204

Таким образом, среди исследованных гибридов (*A. ruthenus* x *A. huso*) методом электрофореза в агарозном геле и с помощью прямого секвенирования выявлено 4

различных гаплогруппы, различающиеся между собой количеством повторяющихся единиц и, соответственно, количеством TAS-элементов.

Следующим этапом нашей работы явилось сравнение гаплогрупп мтДНК гибридов с высоким количеством созреваний (4 и более) и с низким количеством созреваний (2 и менее).

В пределах нашей выборки у высокопродуктивных гибридов осетровых рыб, которые повторно созревали 3 и более раз, 80% особей в тандемном повторе D-петли мтДНК содержали по четыре повторяющихся единицы. У малопродуктивных же осетров, созревавших за тот же период содержания не более двух раз, только 27% особей в D-петле содержали по четыре повторяющихся единицы, в соответствии с таблицей 11.

Таблица 11 – Частота повторов в D-петле высоко- и малопродуктивных гибридов *A. ruthenus* x *A. huso* аквариального комплекса ЮНЦ РАН

Количество повторов	Количество гибридов		Количество гибридов с гетероплазмией		Частота	
	Высокопродуктивные ¹	Малопродуктивные ²	Высокопродуктивные ¹	Малопродуктивные ²	Высокопродуктивные ¹	Малопродуктивные ²
2	1	2	1	0	0,100	0,182
3	7	8	4	2	0,700	0,727
4	8	3	4	2	0,800	0,273
Примечания						
1 высокопродуктивные осетры созревали четыре и более раз (n=10)						
2 малопродуктивные особи созревали не более двух раз (n=11)						

Вероятно, различное количество повторяющихся единиц в тандемном повторе D-петли гибридов, может влиять на экспрессивность признака высокой продуктивности гибридов (*A.ruthenus* x *A.huso*) по икре. Для проверки этой гипотезы в июле 2017 года мы провели бонитировку индустриального стада гибридов (*A.ruthenus* x *A.huso*) с определением стадий зрелости гонад при помощи УЗИ-сканера SonoScape ssi-600. Для контроля осуществляли биопсию гонад путем введения через боковые мышцы специального щупа и извлечения частицы гонады.

В результате ультразвукового исследования было выявлено и отобрано 11 самок с яичниками IV стадии зрелости. Их вес колебался от 11 до 24 кг. Вторую группу сравнения составляли самки с яичниками II стадии зрелости в количестве 26 особей с весом от 9 до 21 кг.

Сравнительный молекулярно-генетический анализ показал следующее распределение повторяющихся единиц в D-петле у гибридов (*A.ruthenus* x *A.huso*) обеих групп, в соответствии с таблицей 12.

Таблица 12 – Частота повторов в D-петле самок гибридов (*A.ruthenus* x *A.huso*) с яичниками II и IV стадии зрелости.

Количество повторов	Количество гибридов		Количество гибридов с гетероплазмией		Частота	
	IV стадия зрелости	II стадия зрелости	IV стадия зрелости	II стадия зрелости	IV стадия зрелости	II стадия зрелости
2	2	5	2	3	0,1818	0,1923
3	9	16	6	6	0,8182	0,6154
4	9	12	5	4	0,8182	0,4615

Из таблицы 12 видно, что между самками с яичниками II и IV стадий зрелости различия по частоте tandemных повторов, состоящих из двух или трех повторяющихся единиц, практически отсутствуют. Тем не менее, около 80% самок гибридов с яичниками IV стадии зрелости содержали в D-петле по четыре повторяющихся единицы. Тогда, как tandemные повторы из четырех повторяющихся единиц в D-петле имели только 46% самок с яичниками II стадии зрелости.

Исходя из полученных результатов, мы полагаем, что такой признак, как повторное созревание самок гибридов (*A.ruthenus* x *A.huso*), выращенных в условиях аквакультуры в установках замкнутого водоснабжения, может быть ассоциирован с гаплотипом митохондриальной ДНК, в D-петле которой в составе tandemных повторов присутствуют по четыре повторяющихся единицы. Не исключено, что экспрессивность такого признака зависит от наличия в D-петле гибридов, выращенных в установках замкнутого водоснабжения, пяти элементов TAS (четыре из которых находятся в повторяющихся единицах tandemного повтора), благодаря которым осуществляется терминации репликации мтДНК, что, вероятно, компенсирует уменьшение количества мтДНК в тканях осетров, ведущих малоподвижный образ жизни. Также вероятно, наличие пяти терминирующих участков в митохондриальной ДНК связано с метаболическими преимуществами самок гибридов, выращенных в установках замкнутого водоснабжения.

Настоящее исследование заложит основы появления новых технологий формирования высокопродуктивных стад в более короткие сроки и с большей эффективностью, с прижизненной оценкой генетических признаков исходных особей по конкретным молекулярным маркерам, в данном случае, по маркерам мтДНК.

5.4 Создан формат унифицированного описания образцов материала из «Коллекционного фонда редких и исчезающих видов рыб» в компьютерной базе данных. Унифицированное описание образцов коллекции включает в себя информацию о: виде, поле, возрасте, репродуктивная активность (положительный результат нереста или нет).

5.5 Правила доступа, он-лайн оформление заявки на проведение работ с использованием БК ЮНЦ РАН, а также перечень дополнительных услуг выполняемых на базе коллекции размещено на сайте биоресурсной коллекции <http://www.ssc-ras.ru/ru/pageBioK/>

5.6 Проведена первичная инвентаризация материалов из «Коллекционного фонда редких и исчезающих видов рыб» в компьютерную базу данных.

БК ЮНЦ РАН включает 4 вида осетровых (шип - *A.nudiventris*, русский осетр - *A. gueldenstaedtii*, севрюга - *A.stellatus*, стерлядь - *A.ruthenus*) и 2 гибридных формы (стербел (гибрид стеляди и белуги), русско-ленский осетр (гибрид русского и сибирского осетра)), из них шипа - 17 экз, стербела - 101, русского осетра - 34 шт, русско-ленского осетра - 42, Севрюги-1 шт.стерляди-67 шт. В криохранилище находится 7,7 л половых продуктов (*A.ruthenus* 1 л, *A. gueldenstaedtii*- 2.7 л, *A. huso* 0,5 л, *A.stellatus* – 0,3 л, *A. ruthenus* x *A. huso* - 2.3 л, *Stenodus leucichthys Güldenstädt* 0.5 л, *Hypophthalmichthys molitrix* 0.4 л)

5.7 В соответствии с дополнительным государственным заданием на основе материалов коллекции подготовлены три статьи в рецензируемых журналах (Scopus, WoS)

В соответствии с дополнительным государственным заданием на основе материалов коллекции подготовлены три статьи в рецензируемых журналах (Scopus, WoS):

а) Корчунов А.А., Сорокина М.Н., Григорьев В.А., Ковалева А.В. Влияние искусственной экосистемы на репродуктивные качества осетровых рыб в аквакультуре. WoS(ZR). Подана в печать в «Известия Самарского научного центра Российской академии наук»;

б) Пономарева Е.Н., Красильникова А.А., Фирсова А.В., Белая М.М. Криоконсервация репродуктивных клеток рыб: история и перспективы. Рыбное хозяйство. 2017. № 4. С. 85-88;

в) Металлов Г.Ф., Пономарева Е.Н., Сорокина М.Н., Григорьев В.А., Корчунов А.А. Функциональная направленность биохимических процессов у самок гибрида стерлядь x белуга *Acipenser ruthenus* Linnaeus, 1758 X *Acipenser huso* Linnaeus, 1758 в репродуктивном цикле Доклады Академии наук. – 2017. - *Scopus* в печати (Приложение А).

5.8 Календарный план подготовлен и передан в комиссию по биоресурсным коллекциям.

- Регистрация дополнительного госзадания в системе ПАРУС (Ученый секретарь Института). 25.07.2017

- Регистрация дополнительного госзадания в системе ЦИТИС (Ученый секретарь Института) 25.08.2017
- Формирование технологического паспорта «Коллекционного фонда редких и исчезающих видов рыб» ЮНЦ РАН 5.09.2017;
- Выполнение первого этапа экспериментальной верификации СОПов ЮНЦ РАН, 28.09.2017;
- Предоставление промежуточного отчета в Рабочую группу БРК 29.09.2017;
- Выполнение второго этапа экспериментальной верификации СОПов ЮНЦ РАН 15.12.2017;
- Подготовка итогового отчёта (готовит ответственный исполнитель) 25.12.2017;
- Отчет о проделанной работе в рамках дополнительного государственного задания, 27.12.2017.

5.9 Отчет о проделанной работе в рамках дополнительного государственного задания с указанием ссылки на номер заключенного с ФАНО России соглашения на выполнение дополнительного государственного задания

Отчет о проделанной работе в рамках дополнительного государственного задания с указанием ссылки на номер заключенного с ФАНО России соглашения на выполнение дополнительного государственного задания размещен на интернет-сайте биоресурсной коллекции ЮНЦ РАН (<http://www.ssc-ras.ru/ru/pageBioK/>).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Биоресурсная коллекция «Коллекционный фонд редких и исчезающих видов рыб» ЮНЦ РАН содержит более 250 уникальных особей осетровых рыб. Работа направлена на расширение коллекции и на верификацию методик поддержания коллекции. Создан технологический паспорт коллекции. Проведена экспериментальная верификация ключевых СОПов. В качестве модели для изучения генетического детерминирования плодовитости исследовали продукционное стадо из 49 гибридов *Acipenser ruthenus* x *Acipenser huso* и 60 особей *A.ruthenus*. Осетры выращены в условиях аквакультуры в УЗВ.

По результатам типирования STR-локусов локусов *Afug41*, *Afug51*, *An20*, *AoxD161*, *AoxD165* выявлено, что наиболее полиморфным локусом является *Afug41*, наименее полиморфными – локусы *Afug51* и *An20*. Наиболее информативным микросателлитным локусом при внутривидовой идентификации стерляди также является *Afug41*. Наименее информативным индивидуализирующим локусом является *AoxD161*.

По результатам секвенирования мтДНК гомоплазмичных гибридов *A.ruthenus* x *A.huso* выявлены 3 гаплогруппы (содержащие по 2, 3 или 4 повторяющихся единиц размером 80 н.п.). Последующий анализ однонуклеотидных полиморфизмов позволил провести последующее деление 3 гаплогрупп на 8 гаплотипов, различающиеся между собой однонуклеотидными заменами. Помимо точковых полиморфизмов в мтДНК гибридов наблюдали вариабельность длины D-петли, а также наличие гетероплазмии по длине. Причина данной вариабельности по длине заключалась в том, что D-петли мтДНК исследованных осетров содержали тандемные повторяющиеся единицы размером 80 н.п. В пределах исследованной группы локусы, содержащие тандемные повторяющиеся единицы, были высоко консервативны. Однонуклеотидные полиморфизмы, в виде транзаций C↔T, присутствовали только в двух позициях из восьмидесяти, при этом выявлено 4 возможных варианта первичной последовательности повторяющихся единиц.

В пределах нашей выборки у высокопродуктивных гибридов осетровых рыб, которые повторно созревали 3 и более раз, 80% особей в тандемном повторе D-петли мтДНК содержали по четыре повторяющихся единицы. У малопродуктивных же осетров, созревавших за тот же период содержания не более двух раз, только 27% особей в D-петле содержали по четыре повторяющихся единицы.

Настоящее исследование заложит основы появления новых технологий формирования высокопродуктивных стад в более короткие сроки и с большей эффективностью, с прижизненной оценкой генетических признаков исходных особей по конкретным молекулярным маркерам, в данном случае, по маркерам мтДНК. Поставленные задачи выполнены.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1 Ostronoff, L.K. Transient activation of mitochondrial translation regulates the expression of the mitochondrial genome during mammalian mitochondrial differentiation / L.K. Ostronoff, J.M. Izquierdo, J.A. Enriguez, J. Montoya, J.M. Cuezva // *Biochem. J.* – 1996. – Vol. 316. – P. 183-191.

2 Holloszy, J.O. Adaptations of skeletal muscle to endurance exercise and their metabolic consequences / J.O. Holloszy, E.F. Coyle // *J. Appl. Physiol.* – 1984. – Vol. 56. – P. 831-838.

3 Hood, D.A. Mitochondrial biogenesis in striated muscle / D.A. Hood, A. Balaban, M.K. Connor, E.E. Craig, M.L. Nishio, M. Rezvani, M. Takahashi // *Can. J. Appl. Physiol.* – 1994. – Vol. 19. – P. 12-48.

4 Пат. 2567145 Российская Федерация. Композиция для хранения ДНК-содержащих препаратов или ДНК (варианты) и ее применение / Корниенко И.В., Фалеева Т.Г.; заявл. 14.04.2014; опублик. 05.10.2015.

5 Walsh, S.P. Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material / S.P. Walsh, D.A. Metzger, R. Higuchi // *BioTechniques.* – 1991. – Vol. 10. – P. 506-513.

6 Корниенко, И.В. Методы исследования ДНК человека. Выделение ДНК и ее количественная оценка в аспекте судебно-медицинского исследования вещественных доказательств биологического происхождения / И.В. Корниенко, С.Г. Харламов. Учебно-методическое пособие - Ростов-на-Дону: ЮФУ, 2012. – 216 с.

7 Li, C. Complete mitochondrial genome of sterlet (*Acipenser ruthenus*) Mitochondrial DNA / C. Li, L. Cheng, J.T. Li, C.Y. Lu, Y. Wang, X.W. Sun // *Mitochondrial DNA.* – 2015. – Vol. 26. – № 2. – P. 259-260.

8 Барминцева, А.Е. Использование микросателлитных локусов для установления видовой принадлежности осетровых (*Acipenseridae*) и выявления особей гибридного происхождения / А.Е. Барминцева, Н.С. Мюге // *Генетика.* – 2013. – Т. 49. – № 9. – С. 1093-1105.

9 User Guide: DNA Fragment Analysis by Capillary Electrophoresis. ThermoFisher. – 2014. – 220 p.

10 Peakall, R. GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research--an update / R. Peakall, P.E. Smouse // *Bioinformatics.* – 2012. – V. 28. – № 19. – С. 2537-2539.

ПРИЛОЖЕНИЕ А

Библиографический список публикаций, полученных в результате выполнения научно-исследовательской работы

1 Корчунов А.А., Сорокина М.Н., Григорьев В.А., Ковалева А.В. Влияние искусственной экосистемы на репродуктивные качества осетровых рыб в аквакультуре. Подана в печать в «Известия Самарского научного центра Российской академии наук». WoS (ZR).

2 Металлов Г.Ф., Пономарева Е.Н., Сорокина М.Н., Григорьев В.А., Корчунов А.А. Функциональная направленность биохимических процессов у самок гибрида стерлядь х белуга *Acipenser ruthenus* Linnaeus, 1758 X *Acipenser huso* Linnaeus, 1758 в репродуктивном цикле Доклады Академии наук. – 2017. (Scopus) – в печати

3 Пономарева Е.Н., Красильникова А.А., Фирсова А.В., Белая М.М. Крיוконсервация репродуктивных клеток рыб: история и перспективы. Рыбное хозяйство. 2017. № 4. С. 85-88. (WoS (ZR)).

УДК 639.371.2

ВЛИЯНИЕ ИСКУССТВЕННОЙ ЭКОСИСТЕМЫ НА РЕПРОДУКТИВНЫЕ КАЧЕСТВА ОСЕТРОВЫХ РЫБ В АКВАКУЛЬТУРЕ

© 2017 г. А.А. Корчунов^{1,2}, М.Н. Сорокина^{1,2},
В.А. Григорьев^{1,2}, А.В. Ковалева²

¹ФГБОУ ВР «Астраханский государственный технический университет»
²Южный научный центр РАН, г. Ростов-на-Дону

Статья поступила в редакцию 00.00.2017

Одним из перспективных направлений аквакультуры осетровых рыб является выращивание в условиях замкнутого водоснабжения, позволяющих создать стабильные условия среды, оптимальные для роста и созревания. В данной работе приводятся результаты исследований по влиянию искусственной экосистемы на репродуктивные качества стерляди, которые свидетельствуют о том, что при выращивании рыбы в контролируемых условиях, в сравнении с ~~естественными~~, увеличивается скорость роста и развития репродуктивной системы стерляди, что позволяет получить зрелых самок за 21 месяц, самок – за 31 месяц выращивания. Исследование развития гонад стерляди, выращиваемой при стабильном температурном режиме, показало, что у самок в возрасте 18 месяцев ооциты находились на начальной второй стадии зрелости гонад, в 22 месяца – на второй стадии зрелости, в 26 месяцев – на третьей, а в 30 месяцев гонады самок находились на четвертой завершённой стадии развития. При использовании ~~репродуктивного~~ гидрологического режима самки повторно созревают через 12 месяцев, а при естественном термическом режиме их необходимо содержать до 18–20 месяцев. В результате проведенных исследований установлено, что первый межперестовый интервал при стабильном термическом режиме является наибольшим, время последующих интервалов уменьшается на 50–60 суток, после третьего переста интервалы между перестами стабилизируются, что связано с биологическими особенностями осетровых рыб. С возрастом происходит увеличение межперестовых периодов. Стерлядь, выращенная в искусственных условиях, по своему химическому составу тела характеризовалась большим количеством белка и жира. Оценка физиологического состояния стерляди, выращенной в регулируемых условиях водной среды, показала, что основные исследуемые параметры крови рыб соответствовали биологической норме для особей данных возрастов. Установлено, что при повторном созревании у самок стерляди увеличивается плодовитость, выход, а также размер икры, что позволяет получить больше потомства, которое будет более жизнеспособным, по сравнению с первым перестом.

Ключевые слова: осетровые, стерлядь, установка замкнутого водоснабжения, естественный температурный режим, репродуктивная система, стадия зрелости гонад, межперестовый интервал.

Работа выполнена в рамках Гранта Президента РФ № 14.W01.16.6486-МК «Влияние искусственной экосистемы на репродукцию, созревание и физиолого-биохимические показатели осетровых рыб».

Работы выполнены в рамках Программы ФНИ государственных академий наук на 2013–2020 годы «Оценка современного состояния, анализ процессов формирования водных биоресурсов южных морей России в условиях антропогенного стресса и разработка научных основ технологии реставрации иктиофауны, сохранения и восстановления хозяйственно-ценных видов рыб № государственной регистрации 01201354245* (0256-2014-0010).

Исследования выполнены на уникальной научной установке № 73602 с использованием биоресурсной коллекции редких и исчезающих видов Южного научного центра Российской академии наук.



Рисунок А1 – Подтверждение о принятии в печать статьи Корчунова А.А., Сорокиной М.Н., Григорьева В.А., Ковалева А.В. «Влияние искусственной экосистемы на репродуктивные качества осетровых рыб в аквакультуре»

Криоконсервация репродуктивных клеток рыб: история и перспективы

Др биол. наук, профессор Е.Н. Пономарев, канд. биол. наук А.А. Красильникова, ассистент А.В. Фирсова, канд. биол. наук М.М. Белая

Южный научный центр Российской академии наук (ЮФАН «ЮНЦ РАН»)
aquagroup@yandex.ru, kafabv@mail.ru

Ключевые слова: сохранение эконотов, микроматрицотворное консервирование, репродуктивные клетки, криобанк, редкие и исчезающие виды рыб

Сохранение генетического разнообразия ценных видов рыб является одной из основных задач современной аквакультуры. В настоящий момент использование методов микроматрицотворного консервирования остается одним из наиболее эффективных и быстровоспроизводимых направлений сохранения редких исчезающих видов. В работе рассмотрены история и перспективы дальнейших разработок исследователей в области криоконсервации репродуктивных клеток.

Одним из методов репродуктивной биологии, имеющей прямое отношение к сохранению генетических ресурсов – криоконсервации, т.е. низкотемпературное замораживание живых объектов с возможностью последующего восстановления их биологических функций. В научной литературе термин «криоконсервация» чаще всего означает хранение биологических объектов в течение некоторого времени при температуре жидкого азота (-196°С), считающейся успешным, только если они полностью жизнеспособны после размораживания [2].

Идея замораживать эмбрионы впервые пришла в голову итальянскому врачу по фамилии Миньегатта. В 1866 г. он опубликовал монографию о сохранении способности к оплодотворению эмбриона рыбы и коней после его заморозки до -15°С. Научные основы криобиологии заложены в конце XIX в. русским ученым Г.И. Баммелевым, изданным в научном журнале «Известия Императорского Академического Научного Общества» в 1904 г. Работы Г.И. Баммелева, и в частности его работы по криоконсервации эмбрионов различных организмов (млекопитающих, беспозвоночных – гидротарзиев, моллюсков, нематод), а также спор и семян переносит в настоящее состояние глубокое охлаждение до -269 и -271°С, т.е. до температуры, близкой к абсолютному нулю. В дальнейшем было показано, что некоторые растительные и животные выживают при замораживании содержащихся в них воды [26].

Первые попытки замораживания спермы сельско-хозяйственных животных в нашей стране принадлежат выдающемуся русскому биологу И.И. Мизову, который в 1907 г. показал, что спермий нерасеивается после охлаждения до -15°С восстанавливая полную оплодотворяющую способность [1]. В 1947 г. И.И. Соколовский, В.К. Милонов и И.В. Смирнов

приваивали этой области: изучают влияние скорости замораживания клеток, ведут разработку новых криоконсервационных сред и апробируют различные концентрации традиционных протекторов, подбирают наименее чувствительные стадии эмбрионального развития, а также проводят эксперименты по изучению физиологии клеток различных видов рыб.

Работы выполнены в рамках проекта «Разработка технических средств, биотехнологий выращивания нетрадиционных видов рыб в безводных условиях для процесса аквакультуры Южного и Северо-Западного федеральных округов России (соглашение № 14.607.21.0163 от 03.10.2016, уникальным идентификатором ПРМ16107150163) и Грэнто Президенту РФ для государственной поддержки молодых российских ученых МК-115.017.11.

ЛИТЕРАТУРА

1. Актуальные проблемы биологии воспроизводства животных // Материалы международной научно-практической конференции. Белгородский ВНИИЖ, 2007. 310 с.
2. Асеева Л.С., Абрамова Т.О., Брусилова Е.Ю., Колосова Е.А. Криоконсервация и микроматрицотворение // Генетика. – 2014. – №9. С. 14-18.
3. Афанасьева И.М., Митинская М.С. Состояние исследований по разработке методов криоконсервации спермы, эмбрионов рыб и выщипанных биологических объектов: обзор литературы, обобщение опыта, оценка практической значимости // Вестник Южного федерального университета. – 2011. – №1(1). С. 1-19.
4. Баранов И.А., Сабитов Р.А. Долговременное хранение спермы при низкой температуре. Методические пособия. М., 1969. 5 с.
5. Милонов В.К., Афанасьева И.М. Криоконсервация эмбрионов и клеток млекопитающих. Пособия и материалы // Биология редкой рыбы. – 2004. – Т.8. С.88-89.
6. Пономарев Е.Н., Красильникова А.А., Пономарев А.М., Фирсова А.В. Новые биотехнологические методы криоконсервации репродуктивных клеток озерных видов рыб // Юг России: экология, развитие. – 2016. – Т.11, №1. С.59-64.
7. Саушкин С.А. Воспроизводство озерных рыб с использованием криоконсервации спермы // Рыбное хозяйство. Серия «Аквакультура». Информ. листок №19/93. «Проблемы сохранения генетических ресурсов». М., 1999. – №1. С.30-42.
8. Пономарев А.М., Фирсова А.В. Спосіб криоконсервації іфідосперми озерних риб. Методическі посібники. А.М. Пономарев. – № 2016/08/08/2016; зміст: 14.10.2016. 100. 2016. 2016. 2016.
9. Цепеню Л.П., Прохорова Н.Д., Давыдов О.В., Рауфбаєва А.А., Гарбузов С.В. Криоконсервация репродуктивных клеток озерных видов рыб // Юг России: экология, развитие. – 2016. – Т.11, №1. С.59-64.

10. Киселева Т.В. Влияние криоконсервации на биологические процессы. – Киев: Наукова Думка. 1989. 98 с.
11. Batten H.J. Spermatogenesis and fertilization in rainbow trout. // J. Fish. Res. Board. – 1952. – V. 12. P. 1189-1200.
12. Dillinger M. Viabilité de embryons de saumon, *Salmo gairdneri* (Walbaum, 1847), conservés à -8° C, à différentes concentrations de cryoprotecteurs. Dissertation // Université de la Méditerranée. – 2010. 126 p.
13. Gieseler P.H., Thomsen E. Cryopreservation – a challenge for the future // Mar. Biotechnol. – 2000. – V.11. P.585-571.
14. Harey N. Cloning of embryos of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, at different concentrations of cryoprotectors. Dissertation // Université de la Méditerranée. – 2010. 126 p.
15. Gieseler P.H., Thomsen E. Cryopreservation – a challenge for the future // Mar. Biotechnol. – 2000. – V.11. P.585-571.
16. Laves T.S., Zlotnik B.L., Fournier C., Oliviero J., Kibakov P., Romagnoli E. Cloning of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, embryos stored at -8° C // Zygote. – 2012. №2(1). P. 1-6.
17. Morahan H.T., Wilhelmitt D., Douglas M.S.I. Freezing injury from 'isolation effect' and its prevention by natural or artificial cryoprotectants // Cytology. – 1977. – № 4(3). P. 201-203.
18. Noyes N., Ballew J., Nagel J.P. Oocyte cryopreservation: is it time to remove the experimental label? // Assist. Reprod. Genet. – 2002. – V.27. P.89-94.
19. Oh S., Horton J.E. Fertilization of Chinese and other salmon eggs with cryoprotected sperm // J. Fish. Res. Board. Can. – 1971. – V. 28. P. 745-748.
20. Pavičević L., Vadić S. Some data on the preservation of carp (*Cyprinus carpio* L.) animal material by freezing // J. Nat. Hist. Mus. Belgrade. – 1975. – № 6. P. 61-64.
21. Kawanishi M., Zhang T. New approaches to the cryopreservation of fish oocytes and embryos // The role of biotechnology. – Viba Galileo, Italy. – 2014. – V. 5. P. 209-210.
22. Saitoh Y., Laves T. A. Current progress in fish oocyte and embryo cryopreservation by slow freezing cryovitrification // Reproduction. – 2011. – V.141. P. 1-9.
23. Sakai M. Preliminary results on cryogenic preservation of sperm of silver carp and tilapia // Hong Kong Fish. Bull. – 1974. – V. 4. P. 23-36.
24. Shih D.R. Jr., Cote de Guilly L., Ribeiro R. P., Fournier C., Dillinger M., Zhang T. Cryopreservation of Embryos and Oocytes of South American Fish Species // Recent Advances in Cryopreservation. July 23, 2014. 130 p.
25. Strömman C. A., Nikulainen M., Takahashi M., Nakabayashi S., Takai K. Cryopreservation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) eggs // J. Hered. – 2003. – № 94(3). P. 154-158.
26. Zhang T., Laves T., Kawanishi M., Petrášková B., Lubzens E. Low temperature preservation of fish germ cells and oocytes // In: Bode P., Gerds J., Lubzens E. (ed.) Fish germ cells: from basic studies to biotechnological applications // New York: Springer. – 2007. P.411-436.
27. http://www.fishbase.org/SpeciesCatalogue (дата посещения: 13.10.2017).

CRYOPRESERVATION OF FISH REPRODUCTIVE CELLS: HISTORY AND PROSPECTS

Ponomarev E.N., Doctor of Science, Professor, Krasnikhnikova A.A., PhD, Firasova A.V., postgraduate, Belaya M.M., PhD – Southern Scientific Center of Russian Academy of Sciences, aquagroup@yandex.ru, kafabv@mail.ru

The preservation of valuable fish species' genetic diversity is one of the main aims of modern aquaculture. At present, the use of low temperature preservation methods remains one of the most attractive and fast-growing ways of rare and endangered species conservation. The paper presents the history and prospects of further development of the field of reproductive fish cells cryopreservation. Biotechnological: gene pool conservation, low temperature conservation, reproductive cells, Cryobank of rare and endangered species of fish

Key words: preservation of ecotypes, micro-matrix formation, reproductive cells, cryobank, rare and endangered species of fish

Рисунок А2 – Первая страница статьи и последняя с указанием источника финансирования.

Пономарева Е.Н., Красильникова А.А., Фирсова А.В., Белая М.М. Криоконсервация репродуктивных клеток рыб: история и перспективы. Рыбное хозяйство. 2017. № 4. С. 85-88.

ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ НАПРАВЛЕННОСТЬ БИОХИМИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ У САМОК ГИБРИДА СТЕРЛЯДЬ X БЕЛУГА (Acipenser ruthenus LINNAEUS, 1758 X Acipenser huso LINNAEUS, 1758) В РЕПРОДУКТИВНОМ ЦИКЛЕ

© 2017 г. Е. Ф. Металлов, Е. Н. Пономарев, М. Н. Сорокина*, В. А. Корчунов
Представлено академиком РАН Г.Г. Металловым 15.09.2017 г.
Получено 27.09.2017 г.

У самок гибрида стерлядь x белуга, содержащихся в искусственных условиях, в период репродуктивного цикла исследовали влияние генетико-биохимических показателей и физиологии белкового, жирового и водно-солевого обмена. Установлено, что оплодотворение у самок гибрида в искусственной среде вызывает выраженные изменения биохимической структуры крови и мочи.

Биохимические показатели крови уже давно и успешно используются для характеристики направленности репродуктивного цикла сельскохозяйственных животных [1]. Методом генетико-биохимического контроля процесса созревания рыб, в том числе и озерных, при содержании в искусственных условиях, находится в стадии экспериментальных поисковых исследований [2, 3].

Оплодотворенная рыба в репродукции водно-солевого обмена у животных принадлежит к тому, которая на процесс репродуктивного цикла отвечает изменением осмотического и водного состава крови и мочи [4]. Исследованиями водно-солевого обмена у озерных рыб показано, что естественное осмотическое давление в организме рыб воды и снижением осмотической способности крови. Содержание осмотической способности крови. Содержание осмотической способности крови. Содержание осмотической способности крови.

Настоящее сообщение посвящено изучению направленности биохимических показателей крови и мочи у самок-гибридов стерлядь x белуга

(Acipenser ruthenus Linnaeus, 1758 x Huso huso Linnaeus, 1758) в период репродуктивного цикла. Рыб содержали в модульной установке замкнутого водоснабжения (ЗВ) с регулируемым гидро-гидрохимическим режимом. Для воздействия на функцию обмена веществ рыб-применяли стерильные репродуктивные клетки, которые находились на инкубационной стадии оплодотворения, их содержали более 2 нед. при низкой температуре 8°С. В этот период активировали распад нуклеиновых кислот и завершали процесс формирования гонад. У озерных рыб-применяли стерильные репродуктивные клетки, которые находились в ЗВ при стабильно высокой температуре и постоянном кормлении искусственными кормами, нарушается жировой обмен, что не способствует нормальному развитию гонад.

Функциональное состояние самок-гибридов в ранней стадии гонады оценивали по содержанию в крови гемоглобина, сахарного белка, холестерина, общего липидов, бета-липопротеина и скорости оседания эритроцитов (СОЭ). В сыворотке крови и моче определяли концентрации осмотических активных веществ.

Биохимические показатели крови определяли с помощью сертифицированных методов и набора реактивов фирмы «PURA-Laboratory s.r.l.» (Италия) и ООО «Сельское хозяйство-ин» (Россия) [5-7]. Осмотическое давление и скорость оседания эритроцитов (СОЭ) определяли с помощью ОСКР-1 («Биометр», Россия) с дальним

Рисунок А3 – Первая страница статьи и последняя с указанием источника финансирования.

Металлов Г.Ф., Пономарева Е.Н., Сорокина М.Н., Григорьев В.А., Корчунов А.А. Функциональная направленность биохимических процессов у самок гибрида стерлядь x белуга Acipenser ruthenus Linnaeus, 1758 X Acipenser huso Linnaeus, 1758 в репродуктивном цикле Доклады Академии наук. – 2017.- Scopus в печати (Приложение А)

ПРИЛОЖЕНИЕ Б

Стандартная операционная процедура при генетической паспортизации биологической коллекции редких и исчезающих видов рыб

«Типирование tandemных повторов митохондриальной ДНК осетровых рыб»

Составлено: И.В. Корниенко, д.б.н., гл.н.с.

Пересмотр через: 1 год

Анализ первичной структуры митохондриальной (мт) ДНК осетров показал, что некодирующий участок (контрольный регион или D-петля) содержит tandemные повторы (VNTR), количество повторяющихся единиц которых варьирует от одной до семи. Ткани осетров могут содержать либо одинаковые (гомоплазмия), либо различающиеся по размеру молекулы мтДНК (гетероплазмия)

Порядок проведения генетического исследования

1. Забор крови осетров из хвостовой вены.
2. Консервация биологического материала.
3. Выделение ДНК.
4. Количественная оценка препаратов ДНК с помощью термоциклера с мультисканальной детекцией в режиме реального времени.
5. Постановка полимеразной цепной реакции с использованием праймеров на консервативные участки мтДНК, граничащими с tandemными повторами.
6. Проведение горизонтального электрофореза ампликонов в агарозном геле.
7. Идентификация количества повторяющихся единиц в VNTR-локусе с помощью компьютерных программ «ImageLab» и «Bio-Rad Quantity One».

ПРИЛОЖЕНИЕ В

Стандартная операционная процедура при генетической паспортизации биологической коллекции редких и исчезающих видов рыб «Создание ДНК-депозитария биологических образцов (крови) осетровых рыб»

Составлено: И.В. Корниенко, д.б.н., гл. н.с.
Пересмотр через: 1 год

При молекулярно-генетических исследованиях особое внимание необходимо уделять условиям и способу хранения биологического материала осетров. Для забора жидкого биологического материала (например, крови) оптимально использовать системы хранения биологического материала на основе бумажных носителей, способных стабилизировать генетический материал без дополнительных энергозатрат, связанных с поддержанием низкой температуры. При этом качество биологического не должно зависеть от сроков его хранения.

Порядок проведения генетического исследования

1. Забор крови осетров осуществляется из хвостовой вены.
2. Перед нанесением биологического образца на подложку ДНК-карты необходимо записать (с помощью карандаша, либо шариковой ручки) информацию о животном-доноре, времени и месте отбора биоматериала.
3. Кровь осетров в количестве около 50-100 мкл (пятно крови не должно выходить за пределы поля (круга)) следует наносить в центр поля (круга) подложки в таком положении карты, чтобы подложка не касалась основания карты.
4. Пятно крови не должно выходить за пределы поля (круга) ДНК-карты. Кровь должна лишь слегка пропитывать подложку карты.
5. Карты следует сушить в условиях комнатной температуры не менее одного часа.
6. Следует исключить контакт подложек карт между собой и иными объектами, а также избегать попадания прямых солнечных лучей на подложку карты.
7. После высушивания ДНК-карту складывают, закрывая защитным козырьком специализированную подложку.
8. Для исключения случайного переноса биоматериала каждую ДНК-карту упаковывают в отдельный бумажный конверт. На конверте указывается индивидуальный номер ДНК-карты.
9. Карты с сухим биологическим материалом хранят при комнатной температуре. Допускается хранение в замороженном виде при температуре -20°C .

ПРИЛОЖЕНИЕ Г

Стандартная операционная процедура при генетической паспортизации биологической коллекции редких и исчезающих видов рыб «Исследование полиморфизма микросателлитных локусов осетров»

Составлено: И.В. Корниенко, д.б.н., гл.н.с.
Пересмотр через: 1 год

Геном осетров содержит большое число повторяющихся последовательностей ДНК, часть которых представляет собой тандемно повторяющиеся структуры, содержащие от двух и выше нуклеотидов. Тандемные повторы связаны, как правило, с внутри- и межвидовым полиморфизмом. Предрасположенность тандемных повторов к полиморфизму наиболее ярко проявляется на примере так называемых микросателлитных последовательностей, отличающихся длиной нуклеотидных повторов. Так, для локусов с короткими тандемными повторами (STR – от англ. short tandem repeat) размер «коровых» последовательностей составляет, как правило, 2-6 нуклеотидов. Обычно в популяции обнаруживается определенный набор аллелей, отличающихся друг от друга по числу повторяющихся единиц тандемных повторов, в каждом из переменных локусов.

Порядок проведения генетического исследования

1. Забор крови осетров из хвостовой вены.
2. Консервация биологического материала.
3. Выделение ДНК.
4. Количественная оценка препаратов ДНК с помощью термоциклера с мультисканальной детекцией в режиме реального времени.
5. Постановка полимеразной цепной реакции микросателлитных (STR) локусов.
6. Электрофоретическое разделение продуктов энзиматической амплификации с помощью автоматического ДНК-анализатора ABI PRISM.
7. Обработка результатов и идентификация аллелей с помощью программы «GeneMapper».
8. Проведение статистического анализа.

ПРИЛОЖЕНИЕ Д

Стандартная операционная процедура при генетической паспортизации биологической коллекции редких и исчезающих видов рыб «Секвенирование митохондриальной ДНК осетровых рыб»

Составлено: И.В. Корниенко, д.б.н., гл.н.с.
Пересмотр через: 1 год

Анализ первичной структуры некодирующего участка (контрольного региона или D-петли) митохондриальной (мт) ДНК осетров позволяет провести сравнительное исследование точек однонуклеотидного полиморфизма различных особей, и выявить их возможное родство по материнской линии.

Порядок проведения генетического исследования

1. Забор крови осетров из хвостовой вены.
2. Консервация биологического материала.
3. Выделение ДНК.
4. Количественная оценка препаратов ДНК с помощью термоциклера с мультисканальной детекцией в режиме реального времени.
5. Постановка полимеразной цепной реакции фрагментов мтДНК.
6. Проведение горизонтального электрофореза ампликонов в агарозном геле.
7. Качественная оценка ампликонов с помощью компьютерных программ «ImageLab» и «Bio-Rad Quantity One».
8. Очистка ампликонов от избытка праймеров и дНТФ.
9. Постановка секвенирующей реакции с помощью циклической ПЦР с использованием флуоресцентно-меченных терминаторов (ддНТФ).
10. Очистка продуктов секвенирования.
11. Электрофоретическое разделение очищенных продуктов секвенирования с помощью автоматического ДНК-анализатора ABI PRISM.
12. Обработка результатов секвенирования с помощью программы «DNA Sequencing Analysis».
13. Множественное выравнивание нуклеотидных последовательностей и сравнительная оценка точек полиморфизма с помощью программ «SeqScape», «BioEdit», «MEGA».

ПРИЛОЖЕНИЕ Ж

Стандартная операционная процедура

«Определение гидрохимических параметров среды»

Составлено: М.В. Коваленко, к.б.н., с.н.с.

Пересмотр через: 1 год

1. Измерение содержания кислорода

портативным термооксиметром МАРК-303Э

Растворенный кислород в воде необходим для обеспечения нормальной жизнедеятельности водных организмов. Для контроля его содержания в воде применяются специальные портативные приборы (оксиметры, кислородомеры).

Порядок подготовки прибора и проведение измерений

1. Включить прибор положить электрохимический датчик* на стол
2. Нажать и удерживать кнопку «калибровка»
3. Выбрать «Автоматическая калибровка» и нажать ввод
4. После завершения «Автоматической калибровки» следовать инструкциям, появляющимся на экране устройства.
5. После калибровки поместить датчик прибора в исследуемую воду и перемещать датчик из стороны в сторону (со скоростью ~ 5 см/сек)
6. После стабилизации показаний (~ 30-90 сек.) считать значения и записать в журнал.
7. После необходимой серии измерений выключить прибор, промыть датчик дистиллированной водой и поместить датчик в стакан с дистиллированной водой.

Примечание: калибровку датчика кислорода необходимо делать 1-2 раза в день (при необходимости делать ее чаще).

*Датчик после измерения хранить в дистиллированной воде.

2. Измерение кислотности воды (pH)

Концентрация протонов водорода, кислотность воды, оказывает значительное влияние на токсичность некоторых элементов в технологической воде. Оптимальными значениями для выращивания большинства гидробионтов является показатели в интервале 6,5-8.

Порядок подготовки прибора и проведение измерений

1. Снять защитный колпачок (если хранение в защитном колпачке) или достать прибор из раствора хранения. Включить.
2. Убедиться, что прибор показывает текущую температуру воздуха или воды.
3. Провести измерения, зафиксировать стабилизированные показания.
4. После измерения промыть рабочую часть датчиков дистиллированной водой и поместить обратно на хранение в защитный колпачок или раствор для хранения

Примечание: датчик хранится в 3М растворе KCl. Прикасаться к измеряющей части не допускается.

ПРИЛОЖЕНИЕ К

Стандартная операционная процедура «Определение биогенных элементов на аппаратном комплексе Scalar»

Составлено: М.В. Коваленко к.б.н., с.н.с., В.С. Герасюк, м.н.с.

Пересмотр через: 1 год

Аппаратный комплекс Scalar предназначен для определения в пробе воды биогенных элементов: аммония, нитрит-ионов, нитрат-ионов, фосфат-ионов

Порядок подготовки оборудования и проведение измерений

- Подготавливаем реактивы, а также комплект (смесь) стандартов в соответствии с прилагаемыми методическими указаниями. Подготовка реактивов занимает 6,5 часов.
- Помещаем пластиковые трубки подачи промывной жидкости, укрепленные на автосамплере, в емкость с дистиллированной водой.
- Подготавливаем перистальтические насосы. Если необходимо, смазываем кончиком пальца рабочую поверхность колодок перистальтических насосов. Устанавливаем колодки в рабочее положение.
- Включаем блок бесперебойного питания, затем включаем автосамплер.
- Включаем химический блок. Насосы начнут работать в нормальном режиме (6 оборотов в минуту).
- Дожидаемся стабилизации работы системы в течение 15 – 30 минут.
- Включаем персональный компьютер, дожидаемся появления рабочего стола на мониторе.
- После промывки прибора устанавливаем скорость насоса в режим ожидания и помещаем пластиковые трубки подачи промывной жидкости, укрепленные на автосамплере, в емкости с реактивами. Возвращаем прежнюю скорость работы насосов.
- Включаем нитратную колонку.
- Запускаем программу FlowAccess. Во время стабилизации работы прибора проверяем, правильно ли выполнен запуск системы.
- Устанавливаем на автосамплере калибровочный стандарт и исследуемые пробы в соответствии с подготовленной таблицей, проверяем стабильность базовой линии на дисплее в режиме текущего времени и запускаем съёмку.

- Осуществление калибровки занимает около 30 минут.
- Обработка одной пробы занимает 2 минуты.
- По завершении съёмки помещаем пластиковые трубки подачи промывной жидкости, укрепленные на автосамплере, из емкостей с реактивами в емкость с дистиллированной водой. Таким образом, промываем прибор в течение 30 минут.
- Выполняем расчёт результатов.

ПРИЛОЖЕНИЕ Л

Стандартные операционные процедуры

«Поддержание необходимого уровня жидкого азота в криохранилище»

Составлено: А.А. Красильникова, к.б.н., н.с.

Пересмотр через: 1 год

В процессе хранения половых клеток и работе с ними происходит планомерное испарение, выветривание паров жидкого азота из Криохранилища и сосудов Дьюара.

В связи с этим необходимо регулярно пополнять уровень жидкого азота для сохранения коллекции половых клеток.

Порядок заполнения и доливки жидкого азота в криососуд:

1. Убедиться, что помещение, где находится криососуд вентилируется.
2. Одеть защитную одежду (фартук, брезентовые или замшевые перчатки, сапоги, заправленные в штаны).
3. Открыть крышку сосуда
4. Определить мерным щупом уровень жидкого азота
5. Осторожно, произвести доливку жидкого азота
6. Закрыть сосуд

ПРИЛОЖЕНИЕ М

Стандартные операционные процедуры «Содержание и уход за биоресурсной коллекцией ЮНЦ РАН»

Составлено: М.В. Коваленко, к.б.н., с.н.с.

Пересмотр через: 1 год

В процессе содержания и выращивания коллекционных образцов происходит выделение значительного количества взвешенных веществ, остатков комбикорма, и прочего рыбоводного осадка, что может в значительной степени повлиять на гидрохимический состав воды, прежде всего на повышение концентрации азотной группы и повышение БПК₅. Поэтому необходимо ежедневно проводить чистку фильтровальных систем и бассейнов.

1. Кормление Рыб

Кормление рыб БК ЮНЦ РАН осуществляется согласно текущей ситуации и текущих условий содержания рыб.

Количество внесенного комбикорма соответствует норме кормления для соответствующего возраста рыб в соответствии с таблицей 1. Масса рыб корректируется в процессе регулярных бонитировок.

Таблица 1 - Норма кормления рыбы в зависимости от массы рыбы.

Навеска рыбы, г	Норма кормления, (не более) %
Осетровые	
3-50	1,8
50-250	1,5
260-800	1,4
850-2500	1,2
2500-6000	1
6100-10000	0,8
10100 и более	0,5

Пример расчета нормы кормления:

Общая масса рыбы в бассейне – 100 кг

Средняя масса рыб в этом бассейне – 1,2 кг

Норма кормления в соответствии с Таблицей 1 – 1,2%

Суточная норма корма: $100 \cdot 1,2 / 100 = 1,2$ кг

Суточную норму комбикорма вносят в зависимости в соответствии с возрастом рыб (от 24 раз в личиночном возрасте, до 1 раза в сутки, производителям). Допускается кормление по поедаемости, допускается не кормить рыбу, если это вызвано рабочей (технологической) необходимостью.

2. Промывка напорных фильтровальных установок и гравитационных отстойников

В процессе круглосуточной работы и фильтрации технологической воды сосема УЗВ происходит засорение фильтрующего материала (кварцевого песка) продуктами органического происхождения (рыбоводным осадком). По мере засорения фильтрующего материала давление в фильтровальной установке повышается и его необходимо промывать по ниже приведенной процедуре.

2.1. Порядок промывки насоса

1. Отключить электронасос от электросети (вытащить электрическую вилку из сети или выключить рубильник)
2. Открыть кран для слива грязной воды в канализацию
3. Перевести селектор в режим обратной промывки – *Backwash* (№2 на селекторе)
4. Включить насос и слить примерно 15% воды от общего объема системы УЗВ
5. Выключить насос
6. Перевести селектор в режим полоскания и уплотнения – *Rinse* (№3 на селекторе) и промывать в течении 20-30 секунд
7. Выключить насос
8. Перевести в режим фильтрации *Filtration* (№1 на селекторе)
9. Включить насос

2.2. Порядок чистки гравитационного отстойника

1. Взять в руки штангу, расправить шланг
2. Проверить сливной рукав на отсутствие перегибов
3. Включить илоудалитель
4. Произвести чистку поверхностей гравитационного отстойника от осажденного рыбоводного осадка
5. Вытащить штангу из воды, подождать пока всасывающий рукав опустошится от воды,
6. Выключить илоудалитель