



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА  
 ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ,  
 ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

## (12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21), (22) Заявка: **2003118466/12, 18.06.2003**

(24) Дата начала действия патента: **18.06.2003**

(43) Дата публикации заявки: **10.01.2005**

(45) Опубликовано: **27.07.2005 Бюл. № 21**

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: "Генетические исследования морских гидробионтов". Материалы III Всесоюзного совещания - М.: ВНИРО, 1987, - с.119-138. RU 2108796 C1, 20.04.1998. RU 2090067 C1, 20.09.1997. RU 2045896 C1, 20.10.1995.

Адрес для переписки:

**414056, г.Астрахань, ул. Татищева, 20а,  
 Астраханский государственный университет**

(72) Автор(ы):

**Лозовская М.В. (RU),  
 Аюпова А.К. (RU)**

(73) Патентообладатель(ли):

**Астраханский государственный университет  
 (RU)**

## (54) СПОСОБ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ГИБРИДНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ ОСЕТРОВЫХ РЫБ

(57) Реферат:

Изобретение относится к области биологии, а именно к ихтиологии, и может быть, в частности, использовано для определения гибридного происхождения осетровых рыб. Поставленная задача решается в изобретении тем, что при выявлении изменений химического состава тканей

гибридов рыб по изменению способности слизи осетровых рыб к формообразованию кристаллов при ее переходе в твердую фазу судят о гибридном происхождении осетровых рыб. Задачей является повышение эффективности определения гибридного происхождения осетровых рыб. 5 табл.

RUSSIAN FEDERATION



FEDERAL SERVICE  
FOR INTELLECTUAL PROPERTY,  
PATENTS AND TRADEMARKS

(19) **RU** <sup>(11)</sup> **2 257 053** <sup>(13)</sup> **C2**  
(51) Int. Cl.<sup>7</sup> **A 01 K 61/00**

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(21), (22) Application: **2003118466/12, 18.06.2003**

(24) Effective date for property rights: **18.06.2003**

(43) Application published: **10.01.2005**

(45) Date of publication: **27.07.2005 Bull. 21**

Mail address:

**414056, g.Astrakhan', ul. Tatishcheva, 20a,  
Astrakhanskij gosudarstvennyj universitet**

(72) Inventor(s):

**Lozovskaja M.V. (RU),  
Ajupova A.K. (RU)**

(73) Proprietor(s):

**Astrakhanskij gosudarstvennyj universitet (RU)**

(54) **DETERMINATION OF STURGEON FISH HYBRID PARENTAGE**

(57) Abstract:

FIELD: biology, in particular, fishery biology.

SUBSTANCE: hybrid parentage is estimated on the base of alteration of sturgeon fish slime ability to form the crystals during to solid

state conversion when fish hybrid tissue chemical composition is discovered.

EFFECT: method for determination of sturgeon fish hybrid parentage with increased effectiveness.

R U 2 2 5 7 0 5 3 C 2

R U 2 2 5 7 0 5 3 C 2

Изобретение относится к области биологии, а именно к ихтиологии, и может быть, в частности, использовано для определения гибридного происхождения осетровых рыб.

Из области биологии известен способ определения гибридного происхождения осетровых рыб по морфологическим специфическим признакам, отличающим гибриды от исходных видов: Крылова В.Д. Использование морфологических признаков-тестов в диагностике селекционируемых форм бестера/ "Генетические исследования морских гидробионтов": Мат-лы III Всесоюз. совещ. - М.: ВНИРО, 1987. - С.119-138.

Однако известный способ имеет следующие недостатки: трудоемкость измерений и расчетов; травматичность манипуляций для рыб.

Известен также цитогенетический способ определения гибридного происхождения осетровых рыб по структуре хромосомного набора особи: Арефьев В.А. Цитогенетический мониторинг гибридизации осетровых рыб// Автореферат диссертации... канд. биол. наук. - М.: ВНИРО.-1988.-24 с.

К недостаткам известного способа можно отнести: трудоемкость анализов; использование дорогостоящих реагентов.

Наиболее близким к предлагаемому является способ определения гибридного происхождения осетровых рыб, заключающийся в том, что выявляют изменения химического состава тканей гибридов рыб, в т.ч. изменения в устойчивости белков к разным денатурирующим агентам, происходящие при гибридизации и свидетельствующие о качественном изменении белков гибридных форм по сравнению с родительскими: Андрияшева М.А. О применении цитофизиологического метода при исследовании гибридов рыб: В сб.: Генетика, селекция и гибридизация рыб. - М.: Наука, 1969. - С.208-224.

Однако известный способ имеет следующие недостатки:

- трудоемкость и длительность исполнения;
- травматичность манипуляций для рыб.

Таким образом, перечисленные недостатки не позволяют получить конкретный технический результат - повышение эффективности способа.

Этот способ принят авторами в качестве прототипа. Сходство данного способа с предлагаемым заключается в том, что они оба относятся к ихтиологии и что состоят в выявлении изменений химического состава тканей гибридов осетровых рыб. Предлагаемое изобретение решает основную задачу - повышение эффективности определения гибридного происхождения осетровых рыб. Сущность изобретения выражена совокупностью существенных признаков, достаточных для обеспечения изобретением положительного результата. Решение поставленной задачи заключается в том, что предлагается совокупность признаков, отличающихся от прототипа тем, что по способности слизи к формообразованию кристаллов при ее переходе в твердую фазу судят о гибридном происхождении осетровых рыб.

Товарное осетроводство - активно развивающаяся отрасль сельского хозяйства. Объектами разведения зачастую являются гибриды осетровых рыб, превосходящие родительские виды по темпам роста или выживаемости. Гибридные формы осетровых нередки и в естественных условиях. Поэтому их идентификация представляет собой актуальную проблему. До сих пор для определения гибридного происхождения рыб не использовали свойства внешних метаболитов. Отличительной особенностью данного способа является то, что авторы впервые для определения гибридного происхождения осетровых рыб предложили судить по изменению способности слизи осетровых рыб к формообразованию кристаллов при ее переходе в твердую фазу.

Предлагаемым способом достигается повышение эффективности определения гибридного происхождения осетровых рыб при использовании неинвазивных методов забора материала. Применяемое в заявленном способе выявление способности слизи осетровых рыб к формообразованию кристаллов при ее переходе в твердую фазу является существенным отличием в подходе к определению гибридного происхождения осетровых рыб. Это отличие позволило получить положительный результат в виде:

- значительного упрощения и ускорения определения гибридного происхождения

осетровых рыб за счет отсутствия необходимости проведения этапов исследования, связанных с выделением ДНК, подсчетом числа хромосом;

- отсутствия побочных эффектов при исключении травмирующих рыб манипуляций.

Предлагаемый способ осуществляется следующим образом. 100 мкл слизи помещают между покровным и предметным стеклами, предварительно обработанными раствором лецитина. Полученные оптические ячейки (в четырехкратной повторности) выдерживают при комнатной температуре в течение 48-72 часов. Морфологический анализ полученных кристаллов проводится в режиме поляризационной микроскопии при увеличении  $\times 90$ .

Предлагаемый способ был успешно апробирован в Федеральном государственном унитарном предприятии Научно-производственный центр по осетроводству "БИОС" в течение 2001-2002 гг. на 90 рыбах. Серия экспериментов, описанных в примерах 1-5, проводилась одновременно. Ниже приводятся результаты апробации.

#### Пример 1

Трехлетки русского осетра (*Acipenser gueldenstaedty*), стерляди (*Acipenser ruthenus*) и гибрида русский осетр  $\times$  стерлядь содержались в стандартных условиях бассейнового цеха в бассейнах объемом 4 м<sup>3</sup> при естественном температурном режиме. Слизь получали у здоровых рыб в утренние часы натошак. Для выявления морфотипов кристаллов биологической жидкости использовали метод краевой дегидратации в аналитической ячейке. Для этого каплю слизи помещали в аналитическую ячейку (между предметным и покровным стеклами) и спустя 48-72 часа, после ее дегидратации при комнатной температуре исследовали формулу образованных морфотипов с помощью микроскопии в поляризованном свете. Результаты микроскопических исследований приводятся в таблице 1.

25

Таблица 1 Формула морфотипов слизи трехлеток гибрида русского осетра со стерлядью и исходных видов				
Группа	Базисные структуры, %	Вторичные структуры, %	Атипичные структуры, %	Состояние аморфизации, %
Русский осетр (5)	100	-	-	-
Стерлядь (5)	90	10	-	-
Гибрид русского осетра со стерлядью(5)	-	60	40	-

30 Примечание: в скобках указано количество животных в группах

Из таблицы 1 видно, что основными морфотипами, характерными для слизи рыб родительских видов, являются базисные структуры, представленные сферолитами, нитевидными образованиями. Ведущим отличительным признаком морфотипов кристаллов из слизи гибрида ОС является наличие вторичных структур, характеризующихся незавершенными формами сферолитов, полиморфизмом. Таким образом, отмечено изменение способности слизи к формообразованию кристаллов при ее переходе в твердую фазу у гибрида русского осетра со стерлядью по сравнению с исходными видами. Уменьшение доли базисных структур и увеличение доли вторичных образований свидетельствует о гибридном происхождении осетровых рыб.

#### Пример 2

Трехлетки гибрида русский осетр  $\times$  шип и его родительских видов: русского осетра (*Acipenser gueldenstaedty*) и шипа (*Acipenser nudiventris*) содержались в тех же условиях, что описаны в примере 1. Результаты микроскопии слизи приведены в таблице 2.

45

Таблица 2 Формула морфотипов слизи трехлеток гибрида русского осетра с шипом и исходных видов				
Группа	Базисные структуры, %	Вторичные структуры, %	Атипичные структуры, %	Состояние аморфизации, %
Русский осетр (5)	100	-	-	-
Шип (5)	80	20	-	-
Гибрид русского осетра с шипом (5)	30	40	30	-

50 Примечание: в скобках указано количество животных в группах

Из таблицы 2 видно, что в слизи представленных видов осетровых характерно преобладание базисных структур (сферолитов, нитевидных образований), а для гибрида - уменьшение доли базисных образований, увеличение доли вторичных и появление

атипичных структур (с дефектными формами кристаллов, вставками других структур в основную форму кристалла и появлением цветности образований). Таким образом, установлено изменение способности слизи к формообразованию кристаллов при ее переходе в твердую фазу у гибрида русского осетра с шипом по сравнению с исходными видами.

#### Пример 3

Трехлетки гибрида белуга × стерлядь и его родительских видов: белуги (*Huso huso*) и стерляди (*Acipenser ruthenus*) содержались в тех же условиях, что описаны в примере 1. Результаты микроскопии слизи приведены в таблице 3.

10

15

Группа	Базисные структуры, %	Вторичные структуры, %	Атипичные структуры, %	Состояние аморфизации, %
Белуга(5)	80	20	-	-
Стерлядь (5)	90	10	-	-
Гибрид белуги со стерлядью (5)	20	40	-	40

Примечание: в скобках указано количество животных в группах

Из таблицы 3 видно, что основными морфотипами кристаллов слизи рыб родительских видов являются базисные структуры, представленные нитевидными образованиями, сферолитами. В слизи гибрида белуги со стерлядью отмечено уменьшение доли базисных, увеличение доли вторичных структур и появление разобщенных мелкокристаллических структур разнообразной формы (состояние аморфизации). Таким образом, отмечено изменение способности слизи к формообразованию кристаллов при ее переходе в твердую фазу у гибрида белуги со стерлядью по сравнению с исходными видами.

#### Пример 4

Трехлетки гибрида белуга × шип и его родительских видов: белуги (*Huso huso*), шипа (*Acipenser nudiiventris*) содержались в тех же условиях, что описаны в примере 1. Результаты микроскопии слизи приведены в таблице 4.

30

Группа	Базисные структуры, %	Вторичные структуры, %	Атипичные структуры, %	Состояние аморфизации, %
Белуга(5)	80	20	-	-
Шип (5)	80	20	-	-
Гибрид белуги с шипом (5)	-	-	-	100

Примечание: в скобках указано количество животных в группах

Из таблицы 4 видно, что основными морфотипами, характерными для слизи рыб родительских видов, являются базисные структуры, представленные сферолитами, нитевидными образованиями. Основным признаком слизи гибрида белуги с шипом является состояние аморфизации. Таким образом, отмечено изменение способности слизи к формообразованию кристаллов при ее переходе в твердую фазу у гибрида белуги с шипом по сравнению с исходными видами.

#### Пример 5

Трехлетки гибрида стерляди с шипом и его родительских видов: стерляди (*Acipenser ruthenus*), шипа (*Acipenser nudiiventris*) содержались в тех же условиях, что описаны в примере 1. Результаты микроскопии слизи приведены в таблице 5.

Из таблицы 5 видно, что основными морфотипами, характерными для слизи рыб родительских видов, являются базисные структуры, представленные сферолитами, нитевидными образованиями. Ведущим отличительным признаком морфотипов кристаллов из слизи гибрида стерляди с шипом является наличие вторичных, атипичных структур, а также состояние аморфизации.

50

Группа	Базисные структуры, %	Вторичные структуры, %	Атипичные структуры, %	Состояние аморфизации, %
Стерлядь (5)	90	10	-	-

Шип (5)	80	20	-	-
Гибрид стерляди с шипом (5)	30	30	20	20
Примечание: в скобках указано количество животных в группах				

5 Таким образом, отмечено изменение способности слизи к формообразованию кристаллов при ее переходе в твердую фазу у гибрида стерляди с шипом по сравнению с исходными видами.

Отбор проб слизи на анализ не отражался отрицательно на состоянии рыб.

10 Проведенный анализ патентной и научной литературы показал, что ранее способность слизи осетровых к формообразованию кристаллов при переходе ее в твердую фазу не использовалась при определении гибридного происхождения осетровых рыб.

Выявляемое в заявляемом способе изменение способности слизи осетровых рыб к формообразованию кристаллов при ее переходе в твердую фазу является существенным отличием в определении гибридного происхождения осетровых рыб. Это отличие позволило получить положительный результат в виде:

- 15 - повышения эффективности определения гибридного происхождения осетровых рыб;
- значительного упрощения и ускорения определения гибридного происхождения осетровых рыб за счет отсутствия необходимости проведения этапов исследования, связанных с выделением ДНК, подсчетом числа хромосом;
- 20 - отсутствия побочных эффектов при исключении травмирующих рыб манипуляций, отсутствия побочных эффектов при изучении диагностических признаков рыб;
- отсутствия необходимости использования дорогостоящих реагентов.

Осуществление предлагаемого способа не сложно в выполнении.

Предлагаемый способ может быть рекомендован для внедрения в рыбоводную практику.

25 Авторами представлен ранее никем не предлагаемый способ определения гибридного происхождения осетровых рыб, решающий основную задачу - повышение эффективности определения гибридного происхождения осетровых рыб. На основе предлагаемого способа может быть разработан способ экспресс-диагностики гибридизации осетровых рыб.

#### Формула изобретения

30 Способ определения гибридного происхождения осетровых рыб, отличающийся тем, что о нем судят по изменению способности слизи осетровых рыб к формированию кристаллов при ее переходе в твердую фазу.

35

40

45

50