



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

Государственная регистрация изобретения осуществлена по заявлению о признании действия исключительного права на территории Российской Федерации на основании статьи 13¹ Федерального закона от 18 декабря 2006 года № 231-ФЗ «О введении в действие части четвертой Гражданского кодекса Российской Федерации»

(21)(22) Заявка: 2014149887/93, 03.10.2014

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
24.04.2008

Приоритет(ы):

Дата приоритета: 24.04.2008

Патент № 86548 (UA)

(45) Опубликовано: 10.04.2015 Бюл. № 10

Адрес для переписки:

299011, г. Севастополь, пр. Нахимова, д. 2,
Институт биологии южных морей им. А.О.
Ковалевского

(72) Автор(ы):

Пиркова Анна Васильевна (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Институт биологии южных морей им. А.О.
Ковалевского (RU)

(54) СПОСОБ ВЫРАЩИВАНИЯ ГЕТЕРОЗИСНЫХ ЛИЧИНОК ГИГАНТСКОЙ УСТРИЦЫ
CRASSOSTREA GIGAS (TH)

(57) Реферат:

Способ выращивания гетерозисных личинок гигантской устрицы *Crassostrea gigas* (Th) при культивировании в питомнике относится к марикультуре и предназначен для промышленного культивирования гигантской устрицы на Черном море в условиях питомника.

В питомнике Института биологии южных морей НАН Украины (Севастополь) в 2006 г. получены гетерозисные гибриды гигантской устрицы *Crassostrea gigas*. В качестве производителей были использованы трехлетние устрицы из двух географически изолированных поселений: черноморского (инбредная линия) и атлантического. Черноморская когорта устриц

отличалась более плоской формой раковины: индекс формы раковины (IF) равнялся соответственно 2,15 и 2,50. Инбредная линия устриц была выведена в результате скрещиваний между сибсами и при возвратных скрещиваниях. В пятом поколении достигнут «инбредный минимум», о чем можно было судить при сравнении с выживаемостью личинок четвертого поколения. Гетерозисные личинки, выращиваемые в условиях плотности посадки в три раза превышающей оптимальные значения, по скорости роста (в 1,2 раза) и выживаемости (в 2,5 и 4 раза) превышали потомков атлантической когорты устриц и личинок инбредной линии.

RU
2 548 104
С 1

RU
2 548 104
С 1



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

State registration of the invention has been provided following a request to recognize the exclusive rights on the territory of the Russian Federation as provided for in the Article 13¹ of the Federal Law of December 18, 2006 № 231-ФЗ «On enactment of part four of the Civil Code of the Russian Federation»

(21)(22) Application: **2014149887/93, 03.10.2014**

(24) Effective date for property rights:
24.04.2008

Priority:
Priority date: **24.04.2008**
Patent No. **86548 (UA)**

(45) Date of publication: **10.04.2015** Bull. № 10

Mail address:
299011, g. Sevastopol', pr. Nakhimova, d. 2, Institut biologii juzhnykh morej im. A.O. Kovalevskogo

(72) Inventor(s):

Pirkova Anna Vasil'evna (RU)

(73) Proprietor(s):

Institut biologii juzhnykh morej im. A.O. Kovalevskogo (RU)

(54) **METHOD OF GROWING OF HETEROTIC LARVAS OF GIANT OYSTER CRASSOSTREA GIGAS (TH)**

(57) Abstract:

FIELD: agriculture.

SUBSTANCE: proposed process relates to mariculture and can be used for industrial cultivation of *Crassostrea gigas* in Black Sea nursery. Nursery of the Institute of southern seas biology obtained in 2006 the heterotic hybrids of *Crassostrea gigas*. Sires represented three-year old mussels of two isolated colonies: Black Sea (inbred line) and Atlantic. Black

sea mussels feature more flat shape of the shell: Shell shape index (IF) makes about 2.15 and 2.50. Inbred line was raised by sibs mating and at return mating. In fifth generation, "inbred minimum" was reached which can be decided on at comparison with survival rate of the fourth generation larvae.

EFFECT: higher rate of growth and survival rate compared with Atlantic mussels and inbred line larvae.

RU 2 548 104 C1

RU 2 548 104 C1

Предлагаемое изобретение относится к марикультуре и предназначено для промышленного культивирования гигантской устрицы на Черном море в условиях питомника.

Гигантская устрица *Crassostrea gigas* не образовала природных поселений в Черном море по причине невозможности достижения необходимого количества производителей без проведения массового подращивания молоди в питомниках. В настоящее время вид *C. gigas* состоит из множества популяций, географически разобщенных и не скрещивающихся между собой. В естественно размножающихся популяциях под действием естественного отбора остаются наиболее приспособленные к конкретным условиям генетические варианты. При искусственном разведении устриц маточное стадо - это небольшое количество индивидуумов, по сравнению с числом особей вида. В таком случае некоторые генетические варианты или вовсе отсутствуют, или присутствуют с нетипичной для вида частотой. Пополнение маточного стада особями, отобранными из природных популяций, позволяет избегать близкородственных скрещиваний, поскольку инбридинг может быть направлен против продуктивности. Применение инбридинга при выведении чистых линий является общим приемом селекции для улучшения пород.

Известен способ культивирования (см. JP A 2000354434, 26.12.2000, Культивирование жемчужной устрицы), где личинок получали при скрещивании жемчужных устриц из природных популяций Китая и Японии. Производителей отбирают из природных популяций Китая и Японии, которые географически изолированы и не скрещиваются между собой. В результате продолжительного природного отбора в каждой популяции остаются генотипы наиболее приспособленные к местным условиям, поскольку концентрация аллелей в популяции, ответственных за приспособленность, повышается с каждым поколением и соответственно снижается норма реакции генотипов на изменяющиеся условия существования. В каждой популяции также сохранился высокий уровень гетерозиготности, как результат свободного скрещивания.

При искусственном скрещивании жемчужной устрицы *Crassostrea nippona* из популяций Японии и Китая, в гибридах произошло выравнивание генетических отличий, которые существовали между популяциями. Недостатки известного способа:

- Устрицы для скрещивания отобраны из природных популяций Японии и Китая;
- Каждая популяция приспособлена к местным условиям среды;
- Среди потомков происходит расщепление на приспособленных и слабо приспособленных к новым условиям;
- Выживаемость снижается за счет слабо приспособленных особей.

Известен (см. McGoldrick D.J, Hedgecock, D. Hybrid vigor in Pacific oysters: An experimental approach using crosses among inbred lines // Journal of Shellfish Research. -1995. - Vol. 14, No. 1. - P. 229.; Hedgecock D. Hybrid vigor is pervasive in crosses among inbred lines of Pacific oysters //Journal of Shellfish Research. - 1996. - Vol. 15, No 2. - P. 511) аналог предлагаемого способа выращивания гетерозисных личинок гигантской устриц. Личинок получают при подборе родительских пар для скрещивания. При этом каждого инбредного самца скрещивают с каждой инбредной самкой; т.е. при наличии 5 самцов и 5 самок проводят 25 скрещиваний. Гетерозис наблюдался только в 1 из 5 таких скрещиваний. Инбредные линии выводят при самооплодотворении криосохраненной спермой. Сперму в замороженном виде хранят в течение года, а также поддерживают жизнеспособность устриц, от которых она получена, так как инверсия пола у некоторых особей *C. gigas* происходит в период между двумя нерестами, т.е. изменение пола у особи может быть зафиксировано через год. Недостатки известного способа:

- Инбредные линии выведены в результате самооплодотворения после инверсии пола криосохраненной спермой;

- Биотехническая сложность получения инбредных линий привела к засорению маточного стада на 60%, что подтверждено применением аллозимных маркерных генов;

- При подборе родительских пар гетерозисные потомки были получены только в 1 из 5 скрещиваний;

- В некоторых случаях размеры гибридов на личиночных и ювенильной стадиях меньше, чем инбредных.

Наиболее близкими по технической сущности являются принципы селекции в питомнике SATMAR, которые изложены в отчете Kuczer J.- C. Rapport de Stage.

C.F.P.P.A. de Coutances session BP AM. - 1993 - 1994. - 79 p. В течение 40 лет, начиная с момента интродукции гигантской устрицы на Атлантическое побережье Франции, происходит ее размножение в природных условиях под контролем естественного

отбора. Для маточного стада питомника устриц отбирают из различных мест побережья Франции. Проводят искусственный отбор производителей по форме и внешнему виду раковин. Групповое скрещивание осуществляют между 15-20 экз. производителей возраста 2-4 года. Общий принцип оплодотворения - скрещивание между маточным стадом питомника и устрицами, которых каждый год отбирают из природных поселений.

Личинок выращивают при плотности посадки 5 и 2 тыс.лич./л соответственно на стадиях велигера и великонхи. Недостатком известного способа является то, что проводимые аутбредные скрещивания не обеспечивают высокого уровня выживаемости и роста при указанной плотности посадки личинок.

В основу изобретения: Способ выращивания гетерозисных личинок устрицы

Crassostrea gigas при культивировании в питомнике, поставлена задача получения гибридного потомства высокого уровня выживаемости и скорости роста при высокой плотности их выращивания.

Поставленная задача достигается тем, что в предлагаемом способе для получения гетерозисного гибридного потомства проводят групповое скрещивание аутбредных устриц с инбредной линией, при этом аутбредные устрицы могут быть из любой географически изолированной популяции, затем полученных личинок культивируют 21 сутки при плотности посадки на стадии велигера - 30 тыс.лич./л и на стадиях великонхи и педивелигера - 15 тыс. лич./л.

Значительное преимущество потомков в росте и выживаемости, по сравнению с родителями, называется гетерозисом, а гетерозис возникает у гибридов, когда родители имеют генотипические различия. Гибридные потомки являются гетерозиготными по большинству локусов. Одна из характерных особенностей гетерозиса - наиболее сильное его проявление у гибридов первого поколения.

Для получения гетерозисных потомков в качестве производителей были использованы генетически дифференцированные устрицы: атлантической и черноморской когорты. Атлантическая когорта устриц была получена при скрещивании маточного стада питомника и устриц, отобранных из природных поселений по критерию формы и внешнего вида раковин. Черноморская когорта инбредных устриц была

получена в результате многолетнего искусственного отбора и близкородственных скрещиваний в течение пяти лет. Коэффициент инбридинга [Дубинин, 1985] составил не менее 0,5. Угнетающее действие инбридинга выявилось в снижении выживаемости на личиночных стадиях, особенно на стадии раннего велигера, а также в период перехода великонхи в стадию педивелигера. Отмечено аномальное развитие личинок в период

формирования раковины (стадия D - велигера). Положительный эффект при близкородственных скрещиваниях проявлялся в выщеплении летальных генотипов. Поскольку отход инбредных устриц, в основном, происходил на личиночных стадиях, то слабо приспособленные особи не вовлекались в последующие скрещивания.

5 Результаты выживаемости личинок в 2003 и 2006 гг (соответственно 25 и 21,4%) свидетельствовали о том, что инбредный минимум достигнут и дальнейшее снижение выживаемости в последующих инбредных поколениях происходить не будет.

Сущность изобретения объясняется иллюстрациями. Фиг. 1 - Производители устрицы *Crassostrea gigas*: атлантическая (вверху) и черноморская (внизу) когорты. Фиг. 2 - 10 Гетерозисные личинки, собранные на сите, плотность выращивания 15 тыс. лич./л. Фиг. 3 - Рост личинок гигантской устрицы, полученных при инбредном (№ 1), аутбредном (№ 2) скрещиваниях и гетерозисе (№ 3). Фиг. 4 - Гетерозисные личинки на стадии поздней великонхи: минимальная вариабельность размеров и максимальный уровень выживаемости. Фиг. 5 - Распределение педивелигеров по показателю Н/Л раковины.

15 Пример.

Культивирование устриц проводили в устричном питомнике ИнБЮМ НАН Украины в 1999-2006 гг.

В 1998 г. из Карадагского отделения ИнБЮМ были переданы 25 экз. трехлетних *C. gigas* в качестве производителей, которые были примерно 10-м поколением устриц, 20 акклиматизированных в Черном море. В результате группового скрещивания (10♀×1♂ в 1999 г. в питомнике получили потомство гигантской устрицы. Ежегодно, начиная с 2000 по 2003 гг., личинок получали от скрещиваний потомков одних родителей (сибсов) и (или) при возвратных скрещиваниях (родителей с потомками). В качестве маточного стада использовали до 50 экз. устриц, а для скрещивания отбирали около 30 экз. возраста 25 от 1 до 4 лет.

В марте 2004 г. из питомника SATMAR (Франция) был получен спат *C. gigas* высотой раковины около 15 мм. До половозрелости его доращивали в выростном садке на мидийно-устричной ферме в бухте Карантинная (Севастополь). В 2006 г. провели три типа скрещиваний:

30 № 1 - между устрицами черноморской когорты (инбридинг); № 2 - между устрицами атлантической когорты (аутбридинг); № 3 - перекрестное скрещивание, проведенное по схеме:

♀♀ черноморская когорта × ♂♂ атлантическая когорта;

35 ♀♀ атлантическая когорта × ♂♂ черноморская когорта.

Кондиционирование производителей и стимуляции их нереста проводили согласно П. № 76680 UA. Нерест каждого производителя проходил в отдельном сосуде с профильтрованной морской воде и аэрацией. Для скрещивания отбирали одинаковое количество яйцеклеток от каждой самки и сперматозоидов - от самцов. Например, при 40 необходимости получения 1 млн. яйцеклеток от 20 самок, от каждой самки отбирали по 50 тыс. Оплодотворение проводили в 10 л сосуде, добавляя к яйцеклеткам суспензию сперматозоидов. Через 15 мин. после оплодотворения яйцеклетки собирали на мельничном сите с диаметром ячеек 32 мкм, промывали фильтрованной (через 1 мкм) морской водой и переносили в 100 л емкость с фильтрованной морской водой и аэрацией. 45 Весь процесс выращивания личинок осуществляли согласно П. № 76680 UA. Личинок от скрещиваний № 1 и № 2 в течение двух суток от момента оплодотворения выращивали при плотности 50 тыс.лич./л; на стадии велигера - при 10 тыс. лич./л; на стадиях великонхи-педивелигера - 5 тыс.лич./л. В скрещивании № 3 плотность посадки личинок

на стадии велигера составила 30 тыс.лич./л, а на стадиях великонхи-педивелигера - 15 тыс.лич./л.

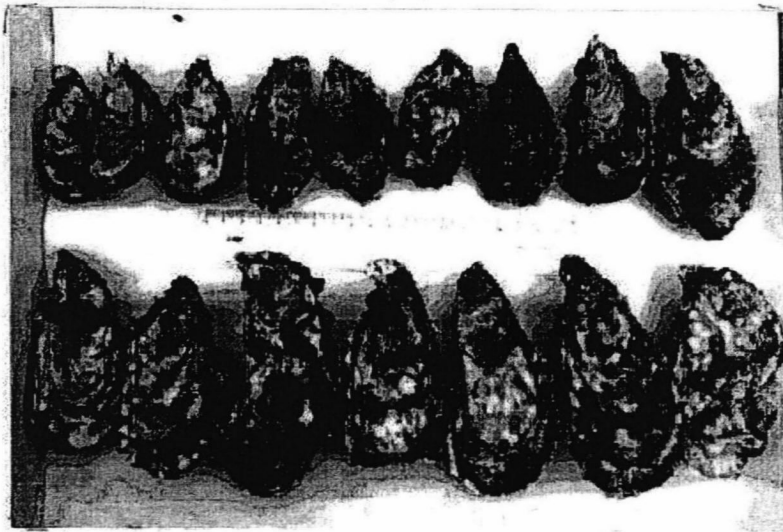
Личинки, полученные при скрещивании черноморской когорты инбредных устриц с атлантической, по темпу роста и особенно выживаемости на личиночных стадиях, значительно превосходили личинок от скрещивания атлантических или черноморских. Продолжительность выращивания личинок, от момента оплодотворения до оседания на субстрат, в скрещиваниях черноморских (№ 1) и атлантических устриц (№ 2) составила 25 суток, а в перекрестном (№ 3) - 21 сутки (фиг. 3). Среднесуточный прирост гибридных личинок за период выращивания в 1,2 раза превышал прирост личинок от двух других скрещиваний и составил 13 мкм/сут. На стадии велигера (возраст 2-10 суток) темп роста личинок во всех скрещиваниях был аналогичным. На стадиях поздней великонхи и педивелигера гибридные личинки превосходили в росте на 4,7 мкм/сут не только инбредных, но и аутбредных личинок. В этот же период во всех скрещиваниях было отмечено максимальное варьирование их размеров. Так, коэффициент вариации гибридных личинок составил 11,5%; в скрещиваниях № 1 и № 2 - соответственно в 2,2 и 1.5 раза выше.

Показатель отношения высоты раковины к длине Н/Л у педивелигеров характеризует форму раковины. У личинок, готовых к оседанию, он изменялся в пределах от 1,0 до 1,4. При значениях, близких к 1, личинки по форме напоминали круг; при значениях, близких к 1,4 - эллипс. По этому показателю личинки в скрещивании № 3 занимали промежуточное положение (фиг. 5). В скрещивании № 1 у 70% личинок значения Н/Л находились в пределах 1,16 - 1,30; в скрещивании № 2 у 68% - в пределах 1,06 - 1,15, а у 76% гибридных потомков данный показатель изменялся от 1,11 до 1,30. На протяжении всего периода выращивания выживаемость гибридных личинок была максимальной. Если в скрещиваниях № 1 и № 2 максимальный отход (30 и 16,6% соответственно) отмечали в течение 7 суток от момента оплодотворения, а на 14-е сутки культивирования в инбредном скрещивании осталось 52,6%; в аутбредном - 72,6%, то в скрещивании № 3 насчитывалось 93,8% личинок от исходного количества. Через три недели доля личинок в скрещиваниях № 1 и № 2 составила соответственно 32,3%, и 56,3%, а в третьем скрещивании - 86,4%. В этот период все гибридные личинки были готовы к оседанию. В двух других скрещиваниях до оседания личинок доращивали еще 4 суток.

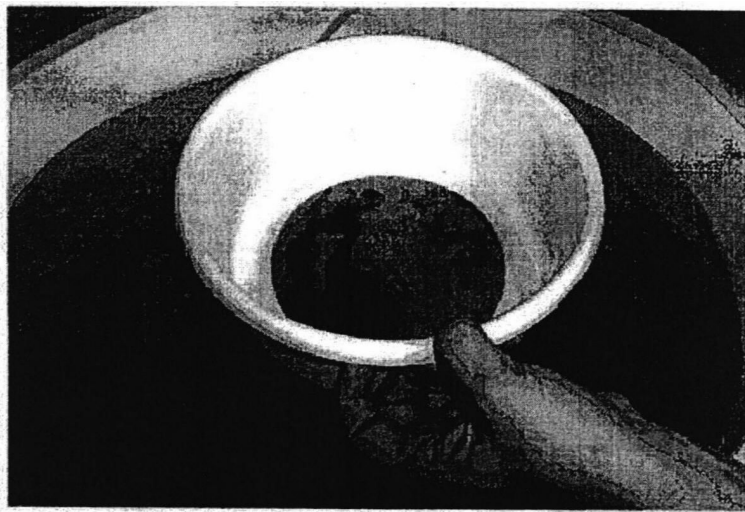
Таким образом, эффективность предложенного способа выращивания гетерозисных личинок гигантской устрицы *Crassostrea gigas* в питомнике превосходит в 6,7 - 8,2 раза эффективность известных способов. Эффективность в данном случае - это суммарное значение показателей превосходства гетерозисных личинок по скорости роста (в 1,2 раза), выживаемости (в 2,5 и 4 раза) при плотности посадки личинок в три раза превышающей оптимальные значения, при которых выращивали личинок от других скрещиваний.

Формула изобретения

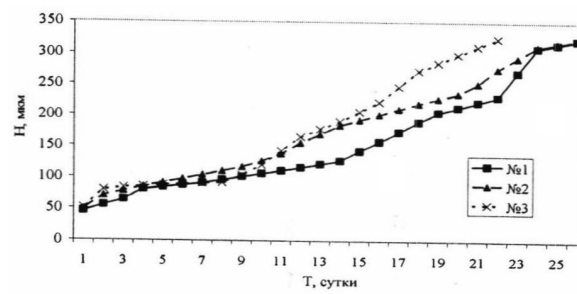
Способ выращивания гетерозисных личинок гигантской устрицы *Crassostrea gigas* при культивировании в питомнике, который включает нерест устриц, скрещивание, получение личинок и их культивирование в питомнике, отличающийся тем, что для получения гетерозисного гибридного потомства проводят групповое скрещивание аутбредных устриц с инбредной линией, при этом аутбредные устрицы могут быть из любой географически изолированной популяции, затем полученных личинок культивируют 21 сутки при плотности посадки на стадии велигера - 30 тыс.лич./л и на стадиях великонхи и педивелигера - 15 тыс.лич./л.



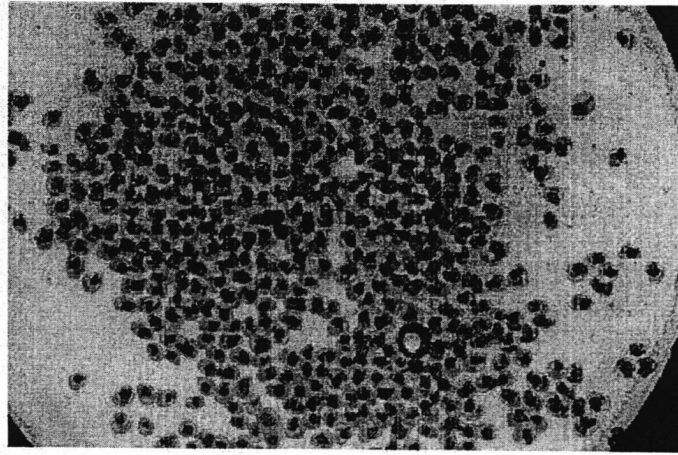
Фиг. 1



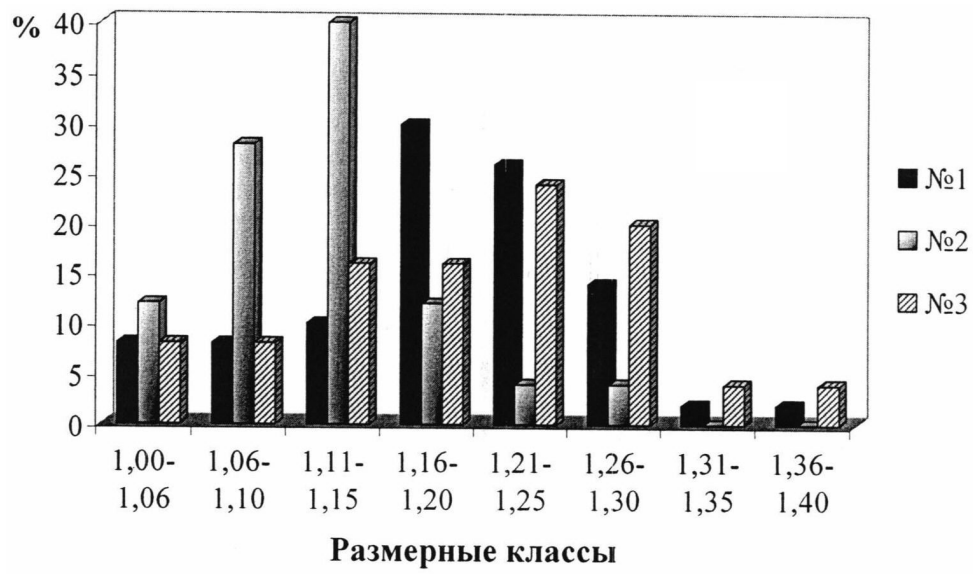
Фиг. 2



Фиг. 3



Фиг. 4



Фиг. 5