

«УТВЕРЖДАЮ»

Директор
Федерального государственного
бюджетного научного учреждения
Института биологии развития
им. Н.К. Кольцова РАН



А.В. Васильев

« 15 » марта 2017 г.

Регламент

содержания и доступа к Коллекции кокциnellид (божьих коровок) ЦКП по биологии развития на основе использования клеточных технологий и оптических методов исследований при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН

Общие положения.

В связи с тем, что основными задачами Коллекции кокциnellид являются создание и поддержание лабораторных линий *Harmonia axyridis*, происходящих из различных популяций нативного и инвазивного ареала этого вида, а также пополнение энтомологической части коллекции массовыми сборами из природных популяций как *H. axyridis*, так и других полиморфных видов кокциnellид, для использования в фундаментальных и прикладных научных исследованиях, необходимо, чтобы Коллекция отвечала следующим требованиям (критериям):

1) Линии *H. axyridis* в Коллекции должны быть охарактеризованы с помощью классических методов систематики, современных молекулярно-генетических и цитогенетических методов.

2) В Коллекции имеется система документирования (для каждой линии *H. axyridis* находящейся в Коллекции, имеется набор характеристик, отражающий всю информацию, по каждой линии и манипуляций с ней, начиная с момента попадания в Коллекцию), а также система маркировки, исключая потерю и перепутывание материала.

3) Помещения, в которых содержится Коллекция и ведется работа по поддержанию линий, используемые материалы, оборудование и процедуры должны отвечать разработанной системе требований по контролю условий труда в соответствии с российскими и международными нормативами. Основные нормативные документы: 1. Трудовой кодекс Российской Федерации. Принят 30 2001 г. 197-ФЗ (с изменениями и дополнениями). 2. Федеральный закон от 27.12.2002 г. № 184 – ФЗ «О техническом регулировании». 3. ГОСТ Р 12.0.001-2013 Система стандартов безопасности труда. Основные положения. 4. Постановление

Правительства Российской Федерации от 27 декабря 2010 г. № 1160. Положение о разработке, утверждении и изменении нормативных правовых актов, содержащих государственные нормативные требования охраны труда. 5. Постановление Минтруда России от 17 декабря 2002 г. № 80. Об утверждении Методических рекомендаций по разработке государственных нормативных требований охраны труда.

В том числе, помещения для ведения коллекционной работы должны быть оборудованы системой поддержания постоянной температуры, вытяжками, микроскопическим оборудованием.

4) В перспективе каждая линия будет иметь паспорт с информацией об истории ее создания, условиях культивирования, морфологических и генетических особенностях, копия которого должна выдаваться получателям данной линии, а также должен существовать электронный каталог имеющихся в Коллекции линий с их паспортами, доступный в сети интернет.

5) Поддержание линий *H.axyridis* осуществляется путем постановок регулярных (2-3 раз в год) скрещиваний и получения не менее 25-30 потомков от них. Для кормления размножающихся коровок и выкармливания личинок используется обыкновенная злаковая тля, выращиваемая в лаборатории на пшеничных газонах. Взрослые жуки (имаго) вне периода размножения содержатся на искусственном корме, разработанном в нашей лаборатории. В течении 3-4 зимних месяцев жуки обеспечиваются необходимой для их жизненного цикла зимней диапаузой.

6) Постоянная работа над пополнением Коллекции ведется посредством отлова божьих коровок в природных популяциях, получения в ходе экспериментальной работы новых линий и обмена с коллегами.

7) Энтомологическая часть коллекции пополняется за счет новых сборов из природных популяций кокциnellид и погибших жуков *H.axyridis* из живой части коллекции.

8) Доступ к Коллекции *H.axyridis* для сотрудников ИБР РАН осуществляется через предварительную запись в журнал заказов. Для сотрудников других учреждений доступ к осуществляется по предварительной договоренности и с разрешения Руководителя Коллекции.

9) Передача живых линий *H.axyridis* пользователям осуществляется вместе с информацией, достаточной для культивирования данных линий в их лабораториях, а также с подписанием в отдельных случаях Соглашения о передаче материалов.

Для заказчиков линий Коллекции Регламент содержит Перечень актуальных услуг, оказываемых заинтересованным пользователям с учетом нагрузки, используемые методики и Перечень основного технологического оборудования (Приложение А).

Контроль соблюдения стандарта, ответственность

Все работы, проводимые в условиях лаборатории должны вестись в соответствии с правилами пожарной безопасности и охраны труда. Процедуры молекулярно-генетического анализа, требующие стерильности, проводят в ламинарных боксах. При работе обеспечиваются условия, минимизирующие воздействие на персонал аллергенов.

Оборудование, используемое при проведении молекулярно-генетической диагностики линий, проходит процедуру калибровки сотрудниками лаборатории в соответствии с инструкцией производителя. Все расходные материалы и реактивы должны иметь соответствующие сертификаты качества и храниться соответственно спецификации.

Контроль выполнения регламента возлагается на Руководителя коллекции. Ответственность за выполнение данной процедуры несут все сотрудники, участвующие в исследовании.

Приложение А.

Перечень актуальных услуг, оказываемых заинтересованным пользователям с учетом нагрузки.

1. Обеспечение заинтересованных учебных и научных организаций линиями *H. axyridis* с заданными характеристиками (происхождение, генотип и т.п.).
2. Проведение заказных исследований с использованием коллекционных линий в совместных работах с представителями внешних организаций.
3. Проведение учебно-практических занятий со школьниками и студентами по ведению лабораторной культуры *H. axyridis* и постановке с ней генетических экспериментов.
4. Предоставление по предварительной договоренности живых жуков *H. axyridis* на любой стадии жизненного цикла для проведения различных научных, научно-практических и учебных работ.

Перечень основного технологического оборудования.

1. Бинокулярные лупы и микроскопы (Lomo 9, Lomo 10, Micromed MC-2 Zoom, Carl Zeiss 'Jenalumar').
2. Суховоздушные термостаты с охлаждением и поддержанием фотопериода.
3. Шкафы сушильные стерилизационные сухожарочные.
4. Источники УФ.
5. Весы.
6. Сплит-системы.
7. Холодильники.
8. Суточный таймер 16A Electraline 59500.
9. Очиститель воздуха.
10. Ламинары и ПЦР-боксы.
11. Амплификаторы (Терцик, VeritiFast Applied Biosystem)
12. Секвенатор DNA analyser 3500

Используемые методики.

1. Разработанные нами методы содержания и разведения коллекционных линий *H. axyridis*, классические методы отбора по полу и фенотипическим признакам, постановки скрещиваний.

2. Методы выделения ДНК, амплификации и секвенирования при молекулярно-генетическом анализе коллекционных линий.
3. Методы микроскопирования для оценки цитогенетических признаков *H. axyridis* и наличия цитоплазматических симбионтов в коллекционных линиях.

Руководитель Коллекции

к.б.н.



Блехман А.В.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
ИНСТИТУТ БИОЛОГИИ РАЗВИТИЯ им. Н.К. Кольцова РАН
 Лаборатория эволюционной генетики развития

**Стандартные операционные процедуры (СОП) содержания и развития
 «Коллекции кокцинелл» Объединенной коллекции лабораторных
 животных для фундаментальных, прикладных и природоохранных
 исследований ИБР РАН**

Составил	Согласовал	Утвердил
<p>Н.с. лаборатории эволюции генома и механизмов видообразования</p> <p>Блехман А.В.</p>  <hr/> <p>«15» марта 2017г</p>	<p>Зав. Лабораторией эволюции генома и механизмов видообразования</p> <p>Галимов Я.Р.</p>  <hr/> <p>«15» марта 2017г</p>	<p>Директор ИБР РАН</p> <p>Васильев А.В.</p>  <hr/> <p>«15» марта 2017г</p>

Перечень СОП

1. **СОП 1.** Содержание лабораторной культуры *H. axyridis* с учетом природного жизненного цикла. Вывод жуков из диапаузы, подготовка к диапаузе и содержание во время диапаузы.
2. **СОП 2.1.** Кормление имаго (взрослых и молодых жуков) вне периода размножения. Приготовление искусственного корма.
3. **СОП 2.2.** Кормление имаго (взрослых и молодых жуков) вне периода размножения. Кормление искусственным кормом.
4. **СОП 3.1.** Выращивание обыкновенной злаковой тли на пшеничных газонах. Поддержание маточной культуры тли в зимний период (во время диапаузы коровок).
5. **СОП 3.2** Выращивание обыкновенной злаковой тли на пшеничных газонах. Разведение кормовой культуры тли (середина февраля - середина ноября).
6. **СОП 4.1** Линейное и внутрипопуляционное разведение. Постановка скрещиваний.
7. **СОП 4.2** Линейное и внутрипопуляционное разведение. Кормление размножающихся коровок злаковой тлей, отбор кладок, личинок на выкармливание, учет вылупляемости.
8. **СОП 4.3.** Линейное и внутрипопуляционное разведение. Выкармливание личинок до окукливания.
9. **СОП 4.4.** Линейное и внутрипопуляционное разведение. Перевод молодых имаго (вылупившихся из куколок) на содержание вне периода размножения (СОП 2.2).
10. **СОП 5.** Молекулярно-генетический анализ специфических генетических особенностей и чистоты линий

Ответственность

Поддержание Коллекции обеспечивают: руководитель (научный сотрудник), младший научный сотрудник и старший лаборант.

Пересмотр СОП

Пересмотр всех стандартных операционных процедур может осуществляться периодически в связи с совершенствованием методов содержания и разведения лабораторной культуры, молекулярно-генетического и цитологического анализа.

Описания СОП

СОП 1. Содержание лабораторной культуры *H. axyridis* с учетом природного жизненного цикла. Вывод жуков из диапаузы, подготовка к диапаузе и содержание во время диапаузы.

Применяется для обеспечения зимней диапаузы, необходимой для многолетнего поддержания лабораторной культуры *H. axyridis*.

Последовательность действий

СОП выполняется в три этапа:

1. Подготовка к диапаузе осуществляется как правило в середине-конце ноября и обеспечивает возможность проведения длительной – в течении 3-4 месяцев зимовки с минимальной гибелью жуков.
 - 1.1. Производятся последовательные изменения условий содержания для обеспечения физиологической подготовки жуков к зимней диапаузе в течении 2 недель*.
 - 1.2. Подготовить "зимовальные" чашки Петри (диаметром 4, 6, 9, см – в зависимости от численности линий), выстелив их дно вырезанной по диаметру чашки бумажной салфеткой и вложив в них сложенные гармошкой полоски салфетки, ширина и длина которых должна соответствовать диаметру чашки.
 - 1.3. Используя жесткую кисточку (№2) пересадить жуков из кормовых чашек максимально плотно в "зимовальные". Все жуки одного пола каждой линии пересаживаются в отдельную зимовальную чашку.
 - 1.4. "зимовальные" чашки фиксируются изолентой группами по 4-7 шт. чтобы избежать их случайного открывания и укладываются в картонную(ые) коробку(ки), которые убираются в холодильник.
 - 1.5. Заключительный этап заключается в изменении температурного режима в течение 5-10 суток для обеспечения наиболее щадящего перехода к собственно диапаузе*.
2. Для содержания во время диапаузы коробка(ки) переносится в зимовальную камеру (холодильник)*
3. Вывод жуков из диапаузы осуществляется как правило ранней весной, производится отбраковка погибших и сильно ослабленных особей, жуки, пережившие диапаузу, переводятся на поддерживающее кормление.
 - 3.1. Подготовительный этап, обеспечивая физиологическую подготовку жуков к переходу в активную фазу жизненного цикла, минимизирует их гибель при выходе из диапаузы*.
 - 3.2. Подготовить "кормовые" чашки Петри (для многочисленных линий - пластиковые банки), разложив в них чистым пинцетом кусочки корма, толщиной 1-1,5 мм, нарезанные скальпелем и губки, смоченные водой.
 - 3.3. Чашки Петри с зимовавшими жуками достать из холодильника.
 - 3.4. Из каждой "зимовальной" чашки, используя жесткую кисточку (№2) пересадить выживших жуков в "кормовую" емкость (чашки Петри или банки). Емкость с жуками подписать перманентным маркером (название линии, поколение, пол, количество жуков).
 - 3.5. Коровок покормить в соответствии с СОП 2.2.
 - 3.6. Погибшие жуки (в зимовальных чашках) убираются в морозильную камеру на -15-20°C для дальнейшего использования в молекулярно-генетических исследованиях или перевода в сухую энтомологическую коллекцию.
 - 3.7. Сведения о результатах диапаузы (количество выживших и погибших жуков отдельно по полу для каждой линии (популяционной группы)) заносятся в лабораторный журнал.

3.8. Далее в течение первых двух недель после выхода из диапаузы производятся последовательные изменения условий содержания для обеспечения физиологической подготовки жуков к активному периоду жизненного цикла*.

* - обозначены этапы, действия и условия, которые являются интеллектуальной собственностью руководителя коллекции и будут конкретизированы после оформления патента.

Периодичность выполнения – один раз в год.

Ответственность: научный сотрудник; младший научный сотрудник.

СОП 2.1. Кормление имаго (взрослых и молодых жуков) вне периода размножения. Приготовление искусственного корма.

Применяется для минимизации трудозатрат по кормлению живых линий.

Последовательность действий:

1. Корм готовится в термостойкой колбе в небольших объемах 150-300 мл по мере необходимости*.
2. Разливается в стерильные чашки Петри диаметром 6 или 4 см в стерильном ламинаре.
3. После остывания чашки запаиваются парафильмом и хранятся в холодильнике при минусовой температуре.

*Состав и методика приготовления искусственного корма являются интеллектуальной собственностью руководителя коллекции и будут описаны после оформления патента.

Периодичность выполнения: по мере необходимости, не реже 12 раз в год.

Ответственность: научный сотрудник; младший научный сотрудник, старший лаборант.

СОП 2.2. Кормление имаго (взрослых и молодых жуков) вне периода размножения. Кормление искусственным кормом.

Применяется для минимизации трудозатрат по содержанию живых линий.

Последовательность действий:

1. Подготовка рабочего места и оборудования
 - 1.1 Достать чашку с кормом из морозилки, дать ему разморозиться.
 - 1.2 Подготовить чистые вентилируемые чашки Петри (90 мм) (пластиковые банки (0,5 -1 л)) для пересаживания коровок в случае необходимости, очистить крышки от предыдущих надписей спиртовой салфеткой*.
 - 1.3 Подготовить жесткую кисточку (№2), скальпель, пинцет.
 - 1.4 Подготовить чистые кусочки целлюлозной губки** в стакане с водой.
2. Кормление
 - 2.1 Перенести партию чашек (банок) с коровками со стеллажа на стол.

- 2.2 Из чашки с кормом отрезать скальпелем, держа его вертикально, через всю ширину чашки, несколько пластинок корма шириной 1 -1,5 мм и перенести их пинцетом на горизонтальную поверхность.
- 2.3 Из каждой чашки (банки) с коровками, аккуратно приоткрыв ее, быстро достать несъеденный корм и кусочек губки.
- 2.4 Погибшие особи (если такие обнаружены), удаляются кисточкой или пинцетом и помещаются в чистую чашку Петри 4 см диаметром, на крышку которой наносится соответствующая маркировка. Для фиксации крышки используется изолента. Все чашки с погибшими коровками после окончания кормления убираются в морозильную камеру для дальнейшего использования.
- 2.5 Разрезать пинцетом пластинки корма на кусочки необходимых размеров в соответствии с количеством коровок в каждой чашке (банке): на 1 взрослую коровку – фрагмент корма размером около 2х2мм***
- 2.6 а) Быстро пинцетом разложить по чашкам (банкам), аккуратно приоткрывая их, свежие корм и мокрую губку.
б) По мере загрязнения (но не реже 1 раза в 10 дней) кормовые емкости меняются на чистые. В этом случае корм и влажная губка закладываются в чистые емкости, а коровки переносятся в них с помощью жесткой кисточки. На новые емкости переносится соответствующая маркировка.
- 2.7 Обработанные чашки (банки) с коровками переносятся со стола на стеллаж. Достается следующая партия.

*Коровки содержатся отдельно по полу, в зависимости от многочисленности линий в вентилируемых чашках Петри (90 мм) – до 8 шт. в чашке или в пластиковых прозрачных банках (для пищевых продуктов) со специально подготовленными вентилируемыми крышками объемом 0,5-0.7 л - от 9 до 20 шт. и объемом 1 л – от 18 до 30 шт. Кормовые емкости используются повторно. Стопки чашек и банки размещаются на освещаемых стеллажах. Использованные чашки (банки) моются и после высушивания дезинфицируются спиртом или прожиганием ультрафиолетом в ламинаре, чтобы исключить появление плесени при повторном использовании.

**Для обеспечения коровок водой и поддержания стабильной влажности в кормовых емкостях, исключаяющей пересыхание корма, используется целлюлозная губка толщиной около 2 мм, приобретаемая в бытовом магазине. Целая губка хорошо промывается проточной водой, затем разрезается ножницами на кусочки размерами примерно 1х1 см (для использования в чашках Петри) и 1х2 см (для использования в пластиковых банках). Для повторного использования кусочки губки, удаленные из кормовых емкостей, помещаются в невентилируемую чашку Петри и заливаются спиртом (не менее чем на 5 мин.). Перед кормлением губки достаются из спирта, отжимаются, помещаются в стакан и для удаления остатков спирта несколько раз промываются чистой водой.

***При кормлении молодых имаго в течение двух недель после вылупления из куколок количество корма должно быть увеличено в 1,5 раза

Периодичность выполнения: кормление осуществляется 3 раза в неделю (всего около 106 раз в год)

Ответственность: научный сотрудник; младший научный сотрудник.

**СОП 3.1. Выращивание обыкновенной злаковой тли на пшеничных газонах.
Поддержание маточной культуры тли в зимний период
(во время диапаузы коровок).**

Применяется для круглогодичного поддержания культуры тли, что позволяет в случае необходимости получить требуемое количество кормовой тли в течение двух-трех недель.

Последовательность действий:

1. Универсальный грунт для рассады (около 3 л) равномерно засыпать в 3 кассеты для микропарника, установленные в глубоком поддоне, поверхность грунта разровнять. Кассеты с грунтом хорошо пролить до появления воды в поддоне (грунт должен быть полностью промочен).
2. Промоченный грунт в кассетах слегка утрамбовать и выровнять поверхность.
3. Равномерно распределить по всей подготовленной поверхности проростки семян пшеницы - 150 г (приобретаются в продуктовых магазинах или проращиваются самостоятельно).
4. Просеять около 0,5 л грунта через сито или ячеистое пластиковое полотно с диаметром ячеек 2-3 мм – получить мульчу.
5. Равномерно присыпать мульчей семена, слоем около 0.5 см.
6. Развести жидкое удобрение для рассады в соответствии с инструкцией в разбрызгивателе с насадкой-пульверизатором.
7. Хорошо смочить разбрызгиванием посаженные семена.
8. Переставить готовые кассеты в микропарник с налитой на дно водой (около 1 см). Накрыть микропарник прозрачной крышкой и оставить семена прорасти на 2-3 суток, поместив на освещаемый в течение 16 часов в сутки стеллаж.
9. На третьи сутки при достижении проростков пшеницы 2-3 см высоты снять крышку с парника, прибить приподнятый проростками грунт струей из пульверизатора. Дать проросткам обсохнуть. Переставить кассеты на плоский поддон.
10. Газон (3 кассеты) с тлей, зараженный 8-10 суток назад, достать со стеллажа, мягкой кисточкой отряхнуть с каждой кассеты взрослую тлю в пластиковый контейнер (60x50 см, высотой 20 см).
11. Постукивая контейнер под наклоном собрать тлю в один угол и пересыпать в небольшой пищевой контейнер из прозрачного мягкого пластика высотой около 10 см. Остатки тли аккуратно собрать и пересыпать мягкой кисточкой.
12. Заразить собранной тлей свежий газон, равномерно рассыпая ее мягкой кисточкой в 10-20 см над поверхностью. Оптимальная плотность заражения 2-10 шт. тли на растение.
13. Все газоны полить в поддон (уровень воды около 1 см).

Периодичность выполнения: 2 раза в неделю около 3,5 мес. в году - соответственно периоду диапаузы коровок (всего около 30 раз в год).

Ответственность: старший лаборант, младший научный сотрудник.

СОП 3.2 Выращивание обыкновенной злаковой тли на пшеничных газонах. Разведение кормовой культуры тли (середина февраля - середина ноября).

Применяется для обеспечения естественным кормом размножающихся коровок и подрастающих личинок.

Последовательность действий

Идентична описанной для СОП 3.1, объем газонов увеличивается в течении 2-3-х недель в 3-6 раз в зависимости от необходимого количества кормовой тли.

Периодичность выполнения: 3 раза в неделю около 8,5 мес. в году.

Ответственность: старший лаборант, научный сотрудник; младший научный сотрудник.

СОП 4.1 Линейное и внутрипопуляционное разведение. Постановка скрещиваний.

Применяется для получения последовательных поколений, что обеспечивает возможность длительного содержания живых линий и популяционных групп, а также закладки и формирования новых линий.

Последовательность действий:

1. Подготовить емкости для планируемых скрещиваний: пластиковые банки (для ссаживания вместе более 8 особей) и невентилируемые чашки Петри (для ссаживания вместе до 8 особей). Емкости для ссаживания маркируются – указывается: дата ссаживания, название линий (или популяционных групп), специфические особенности скрещивания и т.п. Все данные заносятся в лабораторный журнал.
2. Коровки разного пола (содержавшиеся отдельно по полу) ссаживаются в вместе группами до 15 особей (при групповом разведении) или по парам (при индивидуальных скрещиваниях) в соответствующие емкости, переводятся на кормление тлей и оставляются на 5-8 суток для свободного скрещивания (до появления массовых кладок, которые уничтожаются).
3. Кормление тлей осуществляется через день.
 - 3.1. Собрать тлю с кормовых газонов (см. СОП 3.1 п.п. 10,11). Накрыть контейнер с собранной тлей тканевой или бумажной салфеткой, зафиксировав ее канцелярской резинкой.
 - 3.2. Снять банки (чашки) со стеллажа.
 - 3.3. Взять контейнер с тлей, стряхнуть ее вниз, постукиванием по боковинам и салфетке, снять салфетку с контейнера. В процессе всего времени кормления периодически повторять стряхивание, чтобы избежать разбегания тли.

- 3.4. Взять банку с коровками. Резким постукиванием по бокам и крышке банки стряхнуть коровок вниз.
 - 3.5. Быстро открыть крышку банки и высыпать мусор (трупик тли) переворачиванием.
 - 3.6. Поставить контейнер с коровками на стол и мягкой кисточкой засыпать в банку порцию тли, соответствующую количеству коровок. В процессе кормления периодически стряхивать коровок, в случае необходимости пользуясь жесткой кисточкой, чтобы избежать их разбегания или разлета.
 - 3.7. Закрывать банку и перейти к следующей.
 - 3.8. Если коровки ссажены в чашки Петри, их необходимо менять при каждом кормлении. Для этого в чистую чашку засыпается порция тли, затем с помощью жесткой кисточки в нее пересаживаются коровки, на крышку чашки переносится маркировка.
4. После появления массовых кладок самки рассаживаются индивидуально (с самцами и без них, в зависимости от количества коровок разного пола, участвовавших в скрещивании) в невентилируемые чашки Петри (90 мм).
 5. Чашки маркируются, дата рассаживания заносится в лабораторный журнал.
 6. Чашки с рассажеными коровками помещаются на освещаемый стеллаж с обеспеченным 16-18 часовым световым днем.

Периодичность выполнения: для каждой линии или популяционной группы от 1 до 3-х раз в год.

Ответственность: научный сотрудник (руководитель коллекции).

СОП 4.2 Линейное и внутривидовое разведение. Кормление размножающихся коровок злаковой тлей, отбор кладок, личинок на выкармливание, учет вылупляемости.

Применяется для получения последовательных поколений, что обеспечивает возможность длительного содержания живых линий и популяционных групп, а также закладки и формирования новых линий.

Последовательность действий:

1. Собрать тлю с кормовых газонов (см. СОП 3.1 п.п. 10,11). Накрывать контейнер с собранной тлей тканевой или бумажной салфеткой, зафиксировав ее канцелярской резинкой.
2. Подготовить чистые невентилируемые чашки, удалив спиртом предыдущую маркировку.
3. Чашки с размножающимися, рассажеными индивидуально коровками (парами) достать со стеллажа.
4. Используя жесткую кисточку пересадить коровок в чистые чашки. Перенести на крышку соответствующую маркировку.
5. Взять контейнер с тлей, стряхнуть ее вниз, постукиванием по боковинам и салфетке, снять салфетку с контейнера. В процессе всего времени

кормления периодически повторять стряхивание, чтобы избежать разбегания тли.

6. Мягкой кисточкой засыпать порцию тли в каждую чашку (во избежание поедания кладок порция подбирается такой, чтобы к следующему кормлению в чашке еще оставалось небольшое количество тли – 5-10 шт.).
7. Чашки с покормленными коровками стопками убрать на стеллаж.
8. Освободившиеся чашки внимательно рассмотреть. Чашки с кладками отделить, используя бинокляр подсчитать число яиц в каждой кладке, жесткой кисточкой очистить чашку от остатков тли и мусора, нанести на крышки чашек дополнительную маркировку. Занести сведения в лабораторный журнал*.
9. В каждую чашку с кладками вложить смоченный кусочек целлюлозной губки для предотвращения пересыхания яиц. Убрать чашки с кладками на освещаемый стеллаж.
10. Достать со стеллажа чашки с кладками 3-5 суточной давности. Отобрать кладки с вылупившимися (или вылупляющимися личинками). Оценить вылупляемость (полноту вылупления или долю вылупившихся яиц). Занести информацию в лабораторный журнал.
11. Из второй по счету кладки от каждой самки отобрать личинок на выкармливание, отсадив их в чистую неветилируемую чашку Петри. Количество личинок от каждой самки зависит от задач конкретного ссаживания и подбирается таким, чтобы в новом поколении численность каждой линии составляла 25-30 шт., а численность популяционной группы – 40-50 шт. В одной чашке может выкармливаться до 5 личинок.
12. Для выявления цитоплазматических симбионтов у самок из новых сборов из природных популяций и закладки инфицированных линий, а также генетического контроля существующих линий (в случае необходимости) из второй кладки от каждой самки, для которой планируется проводить молекулярно-генетический анализ, жесткой кисточкой (№1) отбирается от 5 до 15 личинок, которые помещаются в пробирку типа эппендорф группой или индивидуально (в зависимости от задач). Пробирки маркируются и убираются в морозильную камеру. В дальнейшем из замороженных личинок выделяется ДНК для молекулярно-генетического анализа (СОП 5.).

*В зависимости от задач конкретного ссаживания от каждой самки необходимо получить от 2-х до 10 кладок. Как правило кормление тлей рассаживаемых самок (пар) и отбор кладок производится около 10 дней. Вылупление личинок из яиц происходит на 3-5 сутки.

Периодичность выполнения: для каждой линии или популяционной группы (Кроме п. 12) в среднем 20 раз в год (2 раза по 10 дней ежедневно, включая выходные дни). Пункт 12 выполняется 1 раз в год и является подготовительным этапом для СОП 5.

Ответственность: научный сотрудник (руководитель коллекции), младший научный сотрудник.

СОП 4.3. Линейное и внутривидовое разведение. Выкармливание личинок до окукливания.

Применяется для получения последовательных поколений, что обеспечивает возможность длительного содержания живых линий и популяционных групп, а также закладки и формирования новых линий.

Последовательность действий

1. Достать чашки с личинками со стеллажа.
2. Каждую чашку с помощью жесткой кисточки (№3,4) аккуратно, избегая разбегания личинок, очистить от мусора.
3. По мере загрязнения, но не реже 1 раза в 3 дня, чашки меняются на чистые: жесткой кисточкой (№1,2) личинки пересаживаются в заранее подготовленные чистые чашки, на крышки которых переносится маркировка.
4. Чашки с окуклившимися личинками отложить в сторону (если окуклилась только часть личинок, жесткой кисточкой отсадить оставшихся в чистую чашку, подписать ее).
5. Взять контейнер с тлей, стряхнуть ее вниз, постукиванием по боковинам и верху контейнера, снять с него салфетку. В процессе всего времени кормления периодически повторять стряхивание, чтобы избежать разбегания тли.
6. Мягкой кисточкой засыпать порцию тли в каждую чашку с личинками (во избежание каннибализма порция подбирается такой, чтобы к следующему кормлению в чашке еще оставалось небольшое количество тли – 10-15 шт.).
7. Чашки с покормленными личинками собрать в стопки и убрать на стеллаж.
8. Чашки с окуклившимися личинками (куколками) дополнительно почистить смоченной в спирте ватной палочкой (не касаясь куколок).
9. На чашки с куколками внести дополнительно дату окукливания, вложить в каждую кусочек влажной губки для обеспечения нормальной влажности. Сложить чашки в стопки и убрать на стеллаж.

*Средняя общая продолжительность 4-х личиночных стадий развития при оптимальном температурном режиме (24-26 °С) составляет 15 суток. Затем наступает окукливание, через 5-8 суток из куколок вылупляется имаго.

Периодичность выполнения: для каждой линии или популяционной группы в среднем 30 раз в год (2 раза по 15 дней* ежедневно, включая выходные дни), кроме п.п. 8,9, которые выполняются для каждой линии 1 раз за цикл разведения (2 раза в год).

Ответственность: научный сотрудник (руководитель коллекции), младший научный сотрудник.

СОП 4.4. Линейное и внутривидовое разведение. Перевод молодых имаго (вылупившихся из куколок) на содержание вне периода размножения (СОП 2.2).

Применяется для обеспечения длительного содержания коллекционных линий и популяционных групп, а также закладки новых линий на основе визуального анализа выщепляющихся морфологических признаков.

Последовательность действий:

1. Чашки с куколками достать со стеллажа, проверить влажные губки, подсохшие заменить. Отложить чашки с вылупившимися коровками, остальные убрать на стеллаж.
2. Подготовить чистые вентилируемые чашки Петри, подписать их. Для каждой линии необходимо не менее 2 чашек – для разделения полученного потомства по полу.
3. Каждую вылупившуюся коровку с проявившимся рисунком и отвердевшим хитином* просмотреть под биноклем, поместив ее, используя жесткую кисточку, в смотровую чашку: определить пол, особенности морфологических признаков, в том числе вторичных половых. Пересадить просмотренную коровку в соответствующую подготовленную чашку. Если молодая коровка обладает перспективным для дальнейших исследований морфологическим признаком, отсадить ее отдельно – для закладки новой линии. Обычно вылупление молодых жуков из одной кладки происходит в течение 1-3 суток.
4. Всех вылупившихся коровок покормить в соответствии с СОП 4.2
5. После вылупления всех молодых коровок одной линии ссадить их вместе в пластиковые банки или вентилируемые чашки Петри (в зависимости от количества) отдельно по полу. Банки (чашки) соответственно подписать. Коровок покормить в соответствии с СОП 4.2.
6. Записать данные по каждой линии (основные даты развития, соотношение полов, распределение специфических признаков и т.п.) в лабораторный журнал.

Периодичность выполнения: для каждой линии 2 раза в год (п.п. 1 - 4 в течение 5-8 суток (общий период вылупления для одной линии) ежедневно, п.п. 5-6 – однократно).

Ответственность: научный сотрудник (руководитель), младший научный сотрудник.

СОП 5. Молекулярно-генетический анализ специфических генетических особенностей и чистоты линий.

Применяется для выявления цитоплазматических симбионтов у самок из новых сборов из природных популяций и закладки инфицированных линий, первичного определения митотипа контрольного фрагмента гена *cox1* мтДНК новых закладываемых линий, а также генетического контроля чистоты сформированных коллекционных линий (в случае необходимости).

Последовательность действий:

1. Выделение тотальной ДНК производится стандартными методами из отобранных при разведении личинок, а также, в случае необходимости, из замороженных имаго отработанных поколений*.
2. Постановка ПЦР (полимеразной цепной реакции) производится по стандартным методикам в соответствии с инструкциями фирм-производителей полимераз со специфическими праймерами к мтДНК *H. axyridis* и ДНК ее эндосимбионтов и паразитов. Как правило для каждого образца ДНК используется 4 пары праймеров. При генетическом контроле чистоты или особенностей уже сформированных линий как правило используется 1 молекулярно-генетический маркер, наиболее специфический для конкретной линии.
3. Результаты ПЦР визуализируются с помощью электрофореза в агарозном геле с бромистым этидием.
4. Полученные ПЦР-продукты очищаются стандартными методами.
5. Секвенирование полученных фрагментов проводится на базе ЦКП ИБР РАН.
6. Полученные последовательности анализируются. Результаты анализа используются для описания генетических особенностей коллекционных линий (вносятся в электронный каталог коллекции) и определения стратегии дальнейшего разведения и развития коллекции.

* В среднем по коллекции в год выделяется и анализируется около 200 образцов ДНК.

Периодичность выполнения: 1 раз в год

Ответственность: научный сотрудник (руководитель коллекции), младший научный сотрудник.

Руководитель Коллекции
к.б.н.



Блехман А.В.