

# ВІДТВОРЕННЯ РАЙДУЖНОЇ ФОРЕЛІ (*Oncorhynchus mykis* W.) З ВИКОРИСТАННЯМ КРІОКОНСЕРВОВАНИХ СТАТЕВИХ ПРОДУКТІВ

В.Ю. Філіпов, А.І. Мрук, Л.П. Буцацький

Інститут рибного господарства УААН

*Показана можливість кріоконсервації молок райдужної форелі за допомогою дегідратаційно-вітрифікаційного методу. Визначені умови кріоконсервування біооб'єкта: підібрані кріоконсерванти та режими заморожування-відтавання. Отримано потомство райдужної форелі з використанням кріоконсервованих статевих продуктів.*

Заморожування та довготривале зберігання біологічного матеріалу є невід'ємним етапом біотехнології відтворення промислових та зникаючих видів риб. На оцінку ефективності технології кріоконсервації молок риб впливає три групи факторів: різноякісність біооб'єкта, умови кріоконсервації та культивування. Кожна з цих груп має ряд складових. Наприклад, різними умовами консервації можуть бути: режими заморожування-відтавання (швидкість, кінцева температура тощо), склад кріоконсерванту (концентрація, вид та кількість кріопротекторів, склад середовища). При послідовній реалізації процесу кріоконсервування об'єкта відбувається зниження його збереженості на кожному з етапів.

Метою роботи було підвищити показники збереженості кріоконсервованих молок райдужної форелі за допомогою запропонованого дегідратаційно-вітрифікаційного методу [1] та отримати потомство з використанням кріоконсервованих статевих продуктів.

## МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Дослідження проводили на базі господарства "Шипот", підпорядкованого ВАТ "Закарпатський рибокомбінат". Об'єктом дослідження були спермі райдужної форелі (*Oncorhynchus mykis*, W.). Відбір статевих продуктів у риб, запліднення та інкубацію проводили відповідно до загальноприйнятих методик у форелівництві [2]. Захисне середовище для кріоконсервування сперми підбирали, базуючись на стандартних методиках [1]. При підборі кріопротектора використовували етиленгліколь, диметилсульфоксид та яєчний жовток.

Оцінку рухливості сперміїв проводили за допомогою візуального методу з використанням мікроскопа "Біолам Р-11". Одержані еякуляти охолоджували до 5°C, до яких за безперервного перемішування додавали охоложене до тієї самої температури захисне середовище в об'ємному відношенні 1:1. Суспензію сперми в захисному середовищі залишали на еквілібрацію упродовж 0,5 год. Якість розбавленої сперми оцінювали за рухливістю сперміїв. Відібрані розбавлені еякуляти розливали в пронумеровані пластикові пробірки 2 мл, які герметизували і переносили на лід. Після закінчення розливу контейнери виймали з крижаної бані, протирали насухо та встановлювали в диск заморожувача.

Контроль зміни температури здійснювався за допомогою хромель-копелевої (ХК) термопари з діаметром спаю 0,3 мм. Заморожування сперміїв здійснювалося в пристрої, який базується на пасивному охолодженні термоблока в горловині Дьюара Х-34 та Х-5 [3]. Режим охолодження здійснювали в два етапи. Перший етап відбувався за температури від 5°C до — 15°C зі швидкістю 2–3°C/хв та другий від — 15 до — 70°C — 15–20°C/хв. Відтавання контейнерів, які містили біооб'єкт, проводили у водяній бані при 40°C [1]. Збереженість сперміїв перевіряли в кожній пробі не менше трьох разів та обчислювали середнє значення [1].

## РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Дослід закладено 9.04.2009 р. Для проведення досліджень було використано

плідників райдужної форелі селекційного покоління F<sub>2</sub> [4, 5], а саме ікру від 4-річної форелі у кількості 3160 ікринок та сперми від п'яти трирічних самців покоління F<sub>2</sub>, з яких одну частину спермій заморозили за допомогою дегідратаційно-вітрифікаційного методу. Під час кріоконсервування першої частини сперми (дослід), її друга частина (контроль) витримувалась за 4°C та була використана для запліднення через 2 год після відбору (для збереження чистоти експерименту). В інкубаційні апарати було закладено по 1580 ікринок у досліді та контролі. Інкубування ікри (дослід та контроль), проводили в інкубаційному цеху господарства “Шипот”. Температура води становила 4–7°C упродовж перших двох декад інкубації та 8–10°C в наступний термін інкубації. Тривалість інкубації становила 41 добу, що відповідало 310 градусо-дням. Відбір загиблих ікринок райдужної форелі проводили в стійкі до рибницьких маніпуляцій періоди розвитку ікри. Кількість та дати відбору загиблих ікринок показані в таблиці.

Найбільшу кількість загиблих ікринок спостерігали через 12 год після запліднення (тобто гинули незапліднені) та перед викльовом, коли гинули ікринки, що розвивались партеногенетично та з вадами ембріонального розвитку. Викльов відбувся 20.05. 2009, відповідно запліднення в досліді становило 85,2, у контролі — 92,8%

Загальноприйнятій спосіб оцінки кріоконсервування статевих клітин здійснюється за показником збереженості деконсервованого біологічного матеріалу.

Збереженість оцінюється як відношення кількості рухливих спермій до загального числа. На цей показник впливає: початкова якість біооб'єкта, склад та спосіб застосування кріоконсерванту, обраний режим заморожування-відтавання. Аналіз численних літературних даних та наші власні результати показують, що існуючі способи кріоконсервування сперми одного виду не можуть бути прямо перенесені на сперму іншого виду риб. У зв'язку з цим проведено методичний підбір параметрів кріоконсервації, режими заморожування-відтавання (швидкість, кінцева температура), склад кріоконсерванту (концентрація, вид та кількість кріопротекторів). У результаті за допомогою дегідратаційно-вітрифікаційного методу після розморожування молок райдужної форелі була отримана збереженість спермій на рівні 30%.

Основним показником ефективності обраного способу кріоконсервування є отримання потомства від деконсервованого матеріалу. Різниця у збереженні ембріонів від ікри різних самок залежить від енергетичного статусу ікри, а запліднювальна здатність спермій райдужної форелі істотно залежить від індивідуальних особливостей.

Для підвищення вірогідності запліднення яйцеклітин риб рекомендовано використовувати змішані еякуляти, отримані від кількох плідників [6, 7]. Одержані нами результати експериментальних досліджень кріоконсервації молок райдужної форелі з використанням змішаних еякулятів свідчать про ефективність цього методу.

#### Загибель ікринок під час інкубаційного періоду (n = 1580)

Дата	Кількість ікринок	
	дослід	контроль
10.04	79	81
11.05	41	11
14.05	16	12
18.05	90	8
Всього	233	112
Всього, %	14,8	7,2

## ВИСНОВКИ

Максимальна збереженість деконсервованої сперми райдужної форелі за початкової активності нативних спермійв 100% дорівнювала 30%.

Запліднення ікри райдужної форелі в досліді (деконсервованою спермою) становило 85,2, у контролі (нативною спермою) — 92,8%. Від ікри райдужної форелі, заплідненої деконсервованими молюками, отримано потомство.

## ЛІТЕРАТУРА

1. Горбунов Л.В., Бучацький Л.П. Кріоконсервація половых клеток и эмбрионов: Монографія. — К., 2005. — 325 с.
2. Галасун П.Т., Борбат М.О., Булатович М.А. Технологія відтворення лососевих риб у внутрішніх водоймах України. — К.: ІПГ УААН, Аграрна наука, 1995. — 24 с.
3. Пат. 6417 Україна, МКВ 7 F25 D 3/10. Пристрій для кріоконсервації біологічних об'єктів тваринного та рослинного походження: Пат. 6417 Україна, МКВ 7 F25D3/10/ Л.В. Горбунов, В.І. Кабачний, Н.І. Горбунова, М.В. Гринжевський (Україна); Національний фармацевтичний університет. — № 20040706332; Заявл. 29.07.2004; Опубл. 16.05.2005; Бюл. № 5. — 10 с.
4. Мрук А.И. Первый этап формирования племенного стада радужной форели в ОАО “Закарпатский рыбокомбинат” // Сб. науч. ст. “Пресноводная аквакультура: состояние, тенденции и перспективы развития”. — 2005. — С. 53–56.
5. Мрук А.І. Рибницько-біологічна характеристика райдужної форелі селекційного покоління F<sub>2</sub> вирощуваної у ВАТ “Закарпатський рыбокомбінат” // Рибогосподарська наука України. — 2008. — № 2. — С. 56–60.
6. Копейка Е.Ф. Инструкция по низкотемпературной консервации спермы карпа: Инструкция утверждена Ученым Советом ИПКиК АН УССР (протокол № 8 от 18.07.86.) и Ученым Советом ВНИИПРХ (протокол № 13 от 21.07.86), заместителем министра рыбного хозяйства СССР Б.Д. Монаковым 05.08.86. — Москва, 1986. — 9 с.
7. Цветкова Л.И. и др. Методическое пособие по кріоконсервации спермы карпа, лососевых и осетровых видов рыб. — М.: ВНИИПРХ, 1997. — 11 с.

## ВОСПРОИЗВОДСТВО РАДУЖНОЙ ФОРЕЛИ *ONCORHYNHUS MYKIS* С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ КРИОКОНСЕРВИРОВАННЫХ ПОЛОВЫХ ПРОДУКТОВ

В.Ю. Филиппов, А.И. Мрук, Л.П. Бучацький

Показана возможность кріоконсервации молок радужной форели при помощи дегидратационно-витрификационного метода. Определены условия кріоконсервации биообъекта: подобраны среды, кріоконсерванты и режимы замораживания–оттаивания. Получено потомство радужной форели с использованием кріоконсервированных половых продуктов.

## REPRODUCTION OF RAINBOW TROUT *ONCORHYNHUS MYKIS* USING CRYOPRESERVED SEXUAL PRODUCTS

V. Filipov, A. Mruk, L. Buchatsky

The possibility of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) sperm cryopreservation with the aid of dehydration-vitrification method was shown. There have been determined conditions of bioobject cryopreservation: mediums, cryopreservatives and freezing–thawing regimes. We obtained progeny of rainbow trout with the use of cryopreserved sexual products.