

---

---

# СЕЛЕКЦІЯ, ГЕНЕТИКА ТА БІОТЕХНОЛОГІЇ

---

---

УДК 639.371.2:[597-111.11+575.17]

## СЕЗОННА МІНЛИВІСТЬ ЦИТОГЕНЕТИЧНИХ ХАРАКТЕРИСТИК У ВЕСЛОНОСА

О.М. Третьак, Ю.М. Глушко, С.І. Тарасюк

Інститут рибного господарства НААНУ, м. Київ

---

*Виконано порівняльний аналіз частот зустрічальності цитогенетичних аномалій (еритроцити і лейкоцити з мікроядрами, двоядерні лейкоцити, апоптози) в клітинах крові двох груп веслоноса з дослідного господарства “Нивка” ІРГ НААН України. Більш стабільним хромосомний апарат виявився у групи веслоноса в осінній період. Обговорена можливість впливу пори року на частоти зустрічальності цитогенетичних аномалій у клітинах крові веслоноса.*

---

За результатами проведених наукових досліджень та низки виробничих випробувань переконливо доведено, що одним з найперспективніших серед нових об'єктів риборозведення у ставовій аквакультури України є завезений в країни Східної і Центральної Європи північноамериканський представник осетроподібних риб (*Acipenseriformes*), споживач планктонних кормових організмів і детриту — веслоніс (*Polyodon spathula* (Walbaum)) [1, 2].

Зважаючи на те, що веслоніс у процесі послідовних етапів рибогосподарського освоєння імовірно підлягатиме селекції та доместикації, значний інтерес становить нагромадження наукових даних щодо біологічних реакцій цього інтродуцента на комплекс біотичних та абіотичних чинників середовища в нових умовах існування [3].

У природних умовах адаптація певного виду тварин до умов навколишнього середовища відбувається на рівні популяцій, що формують цей вид. Генетична мінливість окремих популяцій забезпечує еволюційну стійкість усього виду і визначає такі найважливіші біологічні властивості представників виду, як чисельність, продуктивність, тривалість життя, стійкість до захворювань тощо [4]. Натомість у процесі господарського освоєння деяких диких тварин, у тім числі риб, основними формами просторово відокремленої сукупності особин одного виду, що зазнають найбільшого

антропогенного впливу, є локальні племінні стада. Комплексні дослідження особливостей формування цих стад у поєднанні із всебічною оцінкою наявного племінного фонду тварин є неодмінною умовою організації їх подальшого ефективного культивування з підготовкою прогресивної нормативно-технологічної бази.

Досить показовими методами досліджень особливостей гомеостазу організму риб та визначення рівня адаптивності певних об'єктів культивування до специфічних умов навколишнього середовища є оцінка стабільності їх генетичного апарату, зокрема виявлення цитогенетичних аномалій як у генеративних, так і соматичних клітинах. Як показники генотоксичних ефектів, що характеризують стан хромосомного апарату риб, використовують, зокрема, мікроядерний тест в еритроцитах і лейкоцитах, а також частоту зустрічальності двоядерних лейкоцитів. Останніми роками в Україні цей напрям наукових досліджень широко застосовується для аналізу частот зустрічальності цитогенетичних аномалій у коропа різного генезису [5, 6].

Характерною особливістю представлених у роботі даних є порівняльна оцінка частот зустрічальності низки цитогенетичних аномалій у клітинах крові племінного веслоноса в різні сезони року. Зазначені дослідження проведено вперше.

## МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Для проведення порівняльної оцінки частот зустрічальності цитогенетичних аномалій у клітинах крові веслоноса дослідний матеріал відбирали влітку (липень) та восени (листопад) від двох груп одновікового ремонтного молодняку риб, що мають спільне походження і входять до складу єдиного племінного стада, вирощеного в ідентичних умовах ставів дослідного господарства “Нивка” ІРГ НААНУ, розташованого в центральній частині Київської області на території Полісся, що межує з Лісостепом.

У зв'язку з дефіцитом відповідних категорій ставів вирощування різновікових груп веслоноса впродовж усього періоду формування племінного стада проводилось в умовах загущених посадок, що в 3–7 разів перевищували оптимальні величини. Ця обставина негативно позначалась на показниках середньосезонних приростів риб. Водночас вирощування різновікових груп веслоноса відбувалось практично без відходів.

Використана під час літнього відбору проб (30.07.2009) група риб складалась з 11 особин масою 1480,7–2288,5 г (у середньому  $1913,21 \pm 75,90$  г за  $C_v = 13,16\%$ ). Під час осіннього відбору проб (26.11.2009) також було використано 11 особин веслоноса аналогічної вікової групи масою 1545,7–2479,2 г (у середньому  $1898,30 \pm 77,13$  г за  $C_v = 13,48\%$ ).

Дослідження основних фізико-хімічних параметрів середовища ставів проводили, користуючись поширеними в рибництві та гідрохімії методами.

Вивчення якісного складу кормових гідробіонтів ставів та підрахунок їх біомаси здійснювали з використанням загальновідомих методик, визначників та таблиць індивідуальної маси організмів.

Цитогенетичний аналіз виконували у мазках периферичної крові. Частоту зустрічальності розглядали у цитогенетичних характеристиках, %: еритроцитів із мікроядрами (ЕМЯ), одноядерних лейкоцитів із мікроядрами (ЛМЯ) і двоядерних лейкоцитів (ДЛ) — не менш ніж у 3000 клітин (рис. 1–4). Крім цього, аналізували частоту виникнення в клітинах апоптозу (рис. 5).

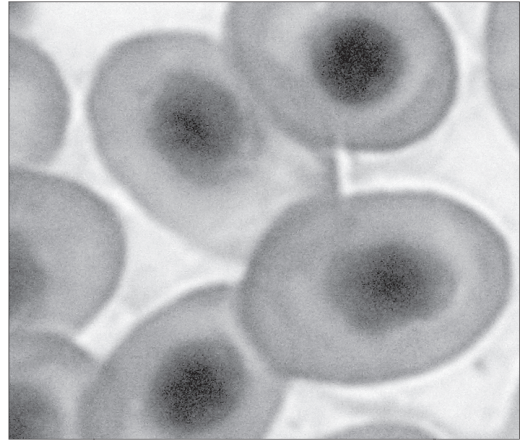


Рис. 1. Еритроцити без наявності цитогенетичних аномалій

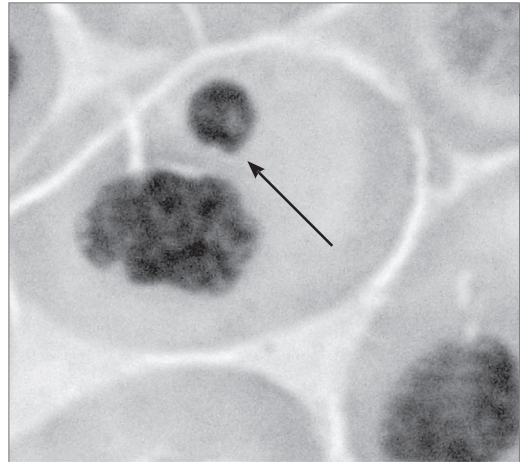


Рис. 2. Еритроцит з мікроядром

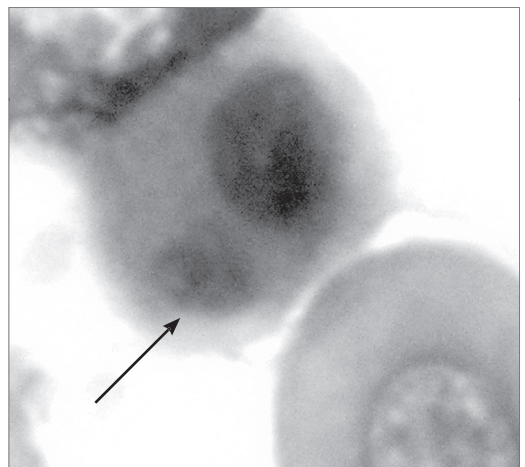


Рис. 3. Лейкоцит з мікроядром

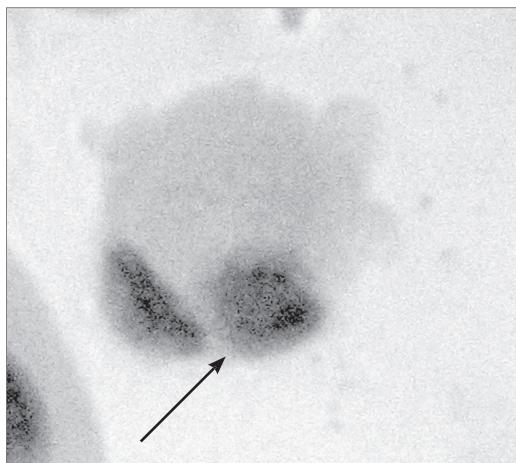


Рис. 4. Двоядерний лейкоцит

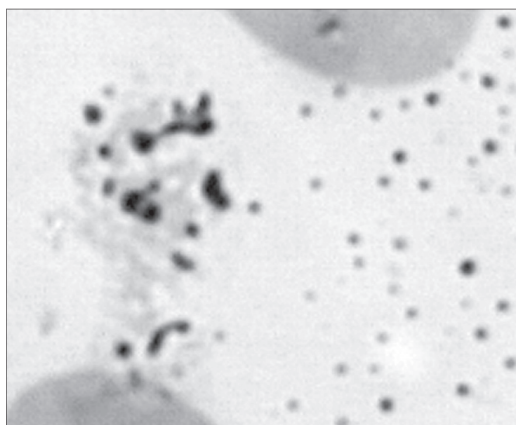


Рис. 5. Апоптоз клітини

Кров у риб для досліджень відбирали стандартним способом. Краплю периферичної крові розводили фізіологічним розчином (1:1) і на предметних скельцях готували мазки. Фіксували їх метиловим спиртом і висушували за кімнатних умов, потім проводили фарбування за методом Романовського стандартним барвником Гімза [7]. Мазки витримували 30–40 хв у барвнику (5 мл стандартного розчину Гімза і 20 мл дистильованої води за рН 6,8–7,2), ополіскували їх водопровідною водою, висушували на повітрі. Для аналізу клітин використовували бінокулярний мікроскоп Primo Star (Carl Zeiss Jena) при збільшенні у 1000 разів. Цитогенетичні аномалії фотографували за допомогою цифрового фотоапарата “Canon” (Power-shot G6, Great Britain). Статистичну ві-

рогідність відмінностей частот зустрічальності цитогенетичних аномалій між групами риб оцінювали за критерієм Ст’юдента ( $t_s$ ) [8].

### РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Упродовж вегетаційного сезону 2009 р. температура води ставів дослідного господарства “Нивка” тривалий час (близько 90 діб) характеризувалась сприятливими для інтенсивного живлення і росту веслоноса величинами. Проте влітку на фоні спекотної погоди досить часто спостерігалось перевищення верхньої межі температурного оптимуму для цього представника осетроподібних риб, якою вважається рівень 25–26°C. Восени температуру води, нижчу за 12°C (рівень нижнього температурного порога активізації процесів життєдіяльності веслоноса), реєстрували з другої половини жовтня. Періоди максимального підвищення температури води здебільшого супроводжувались істотним погіршенням газового режиму ставу з досліджуваним племінним матеріалом риб, коли вміст розчиненого у воді кисню зменшувався до 2,3–1,7 мг/л, що значно нижче сприятливих концентрацій для веслоноса (не нижче 5–6 мг/л).

Інші показники загальнохімічних аналізів води можуть бути оцінені як задовільні для ведення ставового риборівництва і як такі, що не повинні справляти генотоксичний вплив на риб. Водневий показник (рН) води наближався до нейтрального та слаболужного з коливаннями в межах 6,9–8,2. Концентрації вільного аміаку та амонійного азоту становили відповідно 0,004–0,054 та 0,64–1,40 мгN/л. Показники концентрації нітритного та нітратного азоту змінювались відповідно в межах 0,02–0,04 та 0,07–0,16 мгN/л. Мінеральний фосфор та загальне залізо виявлені в кількості відповідно 0,11–0,28 мгP/л та 0,34–0,77 мгFe/л. Перманганатна окиснюваність води не перевищувала 13,0–15,9 мгO/л, що вказує на відсутність надмірного забруднення ставу легкокорозивними органічними речовинами. Вода характеризувалась середньою мінералізацією із сумою іонів 406–453 мг/л і за класифікацією О.О. Альокіна належала до гідрокарбонатного класу

групи кальцію, що є характерним для ставових господарств регіону. Зазначені хімічні показники води загалом були адекватними до гідрохімічного режиму водою нативного ареалу веслоноса.

Водночас за результатами токсикологічних досліджень ставів дослідного господарства “Нивка” виявлено надмірне забруднення води окремими важкими металами, які поряд з прямою токсичною дією на організм риб, можуть спричинити інші небезпечні біологічні наслідки, в тім числі генотоксичний ефект. Зокрема вміст окремих іонів важких металів у воді перевищував гранично допустимі концентрації: марганцю — до 11,7 раз; міді — до 3; нікелю — до 1,2; свинцю — до 2,5 раз [9].

Вивчення гідробіологічного режиму ставу з племінним матеріалом веслоноса вказує на відносно невисоку інтенсивність розвитку основної поживи веслоноса — зоопланктонних кормових організмів. За кількісними показниками розвитку зоопланктону в його складі переважали найважливіші за кормовою поживністю і доступністю для веслоноса гіллястовусі та веслоногі ракоподібні, частка яких у загальній біомасі зоопланктерів, що в різні періоди вегетаційного сезону (травень–вересень) змінювалась у межах 0,52–2,59 г/м<sup>3</sup>, становила 72,9–97,8%. Разом з тим середньосезонна біомаса зоопланктонних організмів була лише 1,37 г/м<sup>3</sup>, що у 4–5 разів нижче мінімальних рекомендованих показників для забезпечення повноцінного живлення веслоноса в умовах ставового вирощування.

За результатами осінньої інвентаризації встановлено, що індивідуальні прирости досліджуваного ремонтного молодняка веслоноса за сезон у середньому становили близько 0,18 кг, що в 5–6 разів менше мінімальних потенційних приростів цієї вікової групи інтродуктента в сприятливих умовах вирощування у ставах північних регіонів України. Основною причиною недостатньої реалізації потенційних можливостей росту риб, на нашу думку, могла бути надмірна загущеність їх посадки в нагул (понад 400 екз./га за нормативних величин — не більше 50–60 екз./га) на фоні недостатньої забезпеченості кормовою базою (за рівнем

розвитку зоопланктону) та негативного впливу низки абіотичних чинників середовища, насамперед погіршення кисневого режиму води. Водночас виживання племінного матеріалу веслоноса впродовж проаналізованого вегетаційного сезону становило 100%.

Виконані цитогенетичні дослідження показали, що в мазках крові ядерні еритроцити були відносно невеликого розміру з щільними, компактними ядрами овальної форми та чітко вираженою цитоплазмою (див. рис. 1, 2). Ця особливість давала змогу легко їх відрізнити від лейкоцитів (див. рис. 3) і здійснювати підрахунок мікроядер окремо для кожної групи клітин. Також легко типувалися і двоядерні лейкоцити (див. рис. 4). Відомо, що відносно підвищення частоти зустрічальності двоядерних лейкоцитів у клітинах периферичної крові відображає порушення в проходженні кінцевої стадії мітотичного поділу — цитокінезу. Мікроядра являють собою невеликі округлі тільця, що формуються у процесі конденсації ацентричних хромосомних фрагментів або ж цілих хромосом, які не були включені в основне ядро по закінченні мітотичного поділу клітини.

Формування мікроядер може бути зумовлене порушенням різних механізмів функціонування клітин. Зокрема мікроядра, що включають хромосомні фрагменти, утворюються після прямих розривів ланцюга ДНК, реплікації на пошкодженій ДНК-основі, репресії синтезу ДНК (кластогенні пошкодження).

Мікроядра, що включають цілі хромосоми, утворюються внаслідок порушень веретена поділу, кінетохора або інших частин мітотичного апарату. Відповідно підвищена частота зустрічальності клітин з мікроядрами є біомаркером генотоксичних ефектів, які можуть виникати внаслідок впливу кластогенних або анеугенних агентів [10, 11]. Ще одним важливим етапом цитодиференціації клітин багатоклітинних організмів є апоптоз або “запрограмована” загибель клітин у процесі диференціації та перетворень тканин (див. рис. 5), частоту виникнення якого також обраховували під час виконання досліджень.

За частотою зустрічальності еритроцитів з мікроядрами у різних видів риб

виявлено видові, сезонні й локальні відмінності. У літературі накопичено багато даних з оцінки стану навколишнього середовища за допомогою мікроядерного тесту в клітинах крові риб. Ліміт цього показника — не більше 3,8 проміле вказує на задовільну оцінку стабільності хромосомного апарату риб [12].

Результати виконаних досліджень щодо сезонної мінливості індивідуальних і групових характеристик цитогенетичних аномалій у клітинах крові веслоноса наведено в табл. 1 і 2 та рис. 6. Показано, що більші значення частот зустрічальності еритроцитів із мікроядрами ( $2,7 \pm 0,3\%$ )

та двоядерних лейкоцитів ( $1,6 \pm 0,5\%$ ) виявлені в групі риб, використаних у дослідженнях у літній період. Частоти зустрічальності лейкоцитів з мікроядрами були більшими в ремонтній групі веслоноса осіннього періоду відбору проб крові ( $1,3 \pm 0,4\%$ ). Аналіз значень частот проявів апоптозів клітин засвідчив, що вищими вони були в групі веслоноса, проби крові якого відбирали влітку порівняно з іхтіологічним матеріалом, використаним у дослідженнях восени ( $1,7 \pm 0,2\%$  проти  $1,2 \pm 0,3\%$ ). Статистично вірогідних відмінностей у двох групах веслоноса за частотами зустрічальності

Таблиця 1. Частоти зустрічальності цитогенетичних аномалій у клітинах периферичної крові веслоноса (літній відбір проб), %

№ з/п	ЕМЯ	ЛМЯ	ДЛ	Апоптоз
1	2	2	2	1
2	2	1	—	1
3	3	1	2	2
4	1	1	3	1
5	4	—	1	2
6	3	1	1	1
7	4	1	—	2
8	1	—	3	1
9	3	2	4	3
10	5	1	1	2
11	2	2	—	3
Середнє	$2,7 \pm 0,3$	$1,1 \pm 0,2$	$1,6 \pm 0,5$	$1,7 \pm 0,2$

Таблиця 2. Частоти зустрічальності цитогенетичних аномалій у клітинах периферичної крові веслоноса (осінній відбір проб), %

№ з/п	ЕМЯ	ЛМЯ	ДЛ	Апоптоз
1	1	2	3	1
2	3	1	5	1
3	2	1	1	3
4	1	—	1	2
5	3	1	—	1
6	3	—	—	—
7	2	—	2	—
8	1	2	—	1
9	3	4	3	—
10	2	2	1	3
11	1	1	—	1
Середнє	$2,0 \pm 0,3$	$1,3 \pm 0,4$	$1,5 \pm 0,6$	$1,2 \pm 0,3$

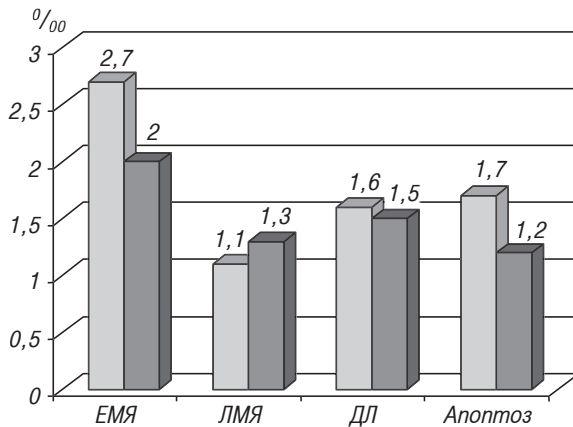


Рис. 6. Цитогенетична характеристика веслоноса: □ — середні показники літнього періоду; ■ — середні показники осіннього періоду

еритроцитів з мікроядрами, лейкоцитів з мікроядрами, двоядерних лейкоцитів та апоптозів не виявлено ( $P > 0,05$ ;  $t_s < 2,2$ ). Водночас отримані дані наглядно демонструють певну неоднорідність зареєстрованих цитогенетичних аномалій у периферичній крові досліджуваних груп веслоноса. Перш за все це пов'язано з високим рівнем індивідуальної мінливості вивчених показників у окремих особин у різні сезони.

Наведені дані засвідчують, що попри виявлені помітні сезонні відмінності цитогенетичних характеристик та за наявності низки екологічних чинників, здатних негативно впливати на перебіг біологічних процесів в організмі риб, показники відмічених цитогенетичних аномалій у клітинах крові племінного матеріалу веслоноса перебували в межах, характерних для риб допустимих параметрів. При цьому певну стабілізацію більшості досліджуваних цитогенетичних характеристик в осінній період можна пояснити змінами фізико-хімічних показників середовища наприкінці вегетаційного сезону, їх також можна пов'язати з уповільненням інтенсивності та із трансформацією процесів метаболізму як в організмі риб у цілому, так і в

окремих групах клітин. Зокрема на фоні поступового зниження температури води такі важливі лімітуючі чинники, як щільність посадки риб та рівень забезпеченості їх кормовою базою восени закономірно втрачають своє значення порівняно з літнім періодом.

## ВИСНОВКИ

Загалом наведені дані вказують на задовільний стан хромосомного апарату досліджуваного племінного матеріалу веслоноса за проаналізованими цитогенетичними характеристиками. Водночас виявлено деяке підвищення частоти зустрічальності окремих цитогенетичних аномалій у клітинах периферичної крові веслоноса в літній період, що може бути наслідком генотоксичної дії низки несприятливих абіотичних факторів середовища та негативного опосередкованого впливу напружених умов вирощування риб щодо надмірної щільності їх посадки в став за недостатньої інтенсивності розвитку кормової бази.

Для об'єктивної оцінки стану хромосомного апарату веслоноса необхідно досліджувати комплекс цитогенетичних характеристик як в еритроцитах, так і лейкоцитах у сезонному аспекті, оскільки відмінності за частотами зустрічальності цитогенетичних аномалій в окремо взятих групах клітин без урахування періоду відбору проб слід визнати недостатнім для одержання об'єктивних наукових даних.

Вивчення цитогенетичних характеристик риб має стати неодмінною складовою частиною наукового забезпечення аквакультури як важливий елемент моніторингових і оперативних досліджень, спрямованих на підвищення ефективності ведення селекційно-племінної роботи, освоєння нових об'єктів культивування, удосконалення нормативно-технологічної бази сучасного рибництва та отримання об'єктивної оцінки екологічного стану водойм.

## ЛІТЕРАТУРА

1. Виноградов В.К., Ерохина Л.В., Мельченков Е.А. Биологические основы разведения и выращивания веслоноса (*Polyodon spathula* (Walbaum)). — М.: ФГНУ «Росинформагротех», 2003. — 344 с.

2. *Онученко О.В., Третьяк О.М., Кулешов О.В.* Основы рибогосподарського освоєння веслоноса *Polyodon spathula* (Walbaum) — К.: Вища освіта, 2003. — 111 с.
3. *Третьяк О.М.* Система науково обґрунтованого розвитку аквакультури веслоноса в Україні // Рибогосподарська наука України. — 2010. — № 2. — С. 3–25.
4. *Алтухов Ю.П.* Генетические процессы в популяциях. — М.: ИКЦ “Академкнига”, 2003. — 431 с.
5. *Ковальова О.А., Кобозева Н.А., Тарасюк С.І., Грициняк І.І.* Цитогенетичні аномалії у дволіток коропа різного генезису // Рибогосподарська наука України. — 2007. — № 1. — С. 28–31.
6. *Грициняк І.І.* Біологічні особливості та фактори підвищення продуктивності коропів львівських внутрішньопорідних типів, їх помісей та гібридів: Автореф. дис. ... д. с.-г. н. — К., 2008. — 39 с.
7. *Стойка Ю.О., Гаранько Н.М., Архипчук В.В.* Розробка прижиттєвого мікроядерного тесту на рибак // Наукові записки. Серія: гідроекологія. — Тернопіль, 2001. — № 4. — С. 15–16.
8. *Плохинский Н.А.* Руководство по биометрии для зоотехников. — М.: Колос, 1970. — 256 с.
9. Звіт про наукову діяльність Інституту рибного господарства УААН за 2009 рік. Завд. 03.01. “Розробити ефективні методи контролю за абіотичними та біотичними компонентами водних екосистем з метою комплексної оцінки екологічного стану рибних господарств і якості рибної продукції” (№ держреєстрації 0106U009040). — К.: ІРГ УААН, 2009. — 54 с.
10. *Albertini K.J., Anderson D., Douglas G.K.* // *Mutation Res.* — 2000. — 463. — P. 111–172.
11. *Heddle J.A., Cimino M.C., Hayashi M.* // *Environmental Molecular Mutagenes.* — 1991. — 18. — P. 277–291.
12. *Есауленко А.В., Косякова Г.П.* Цитогенетическое изучение кроветворных клеток рыб Каспийского бассейна // Материалы II конф. МОГиС “Актуальные проблемы генетики”. — М., 2003. — С. 341–342.

### **СЕЗОННАЯ ИЗМЕНЧИВОСТЬ ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК У ВЕСЛОНОСА**

*О.М. Третьяк, Ю.М. Глушко, С.И. Тарасюк*

Выполнен сравнительный анализ частот встречаемости цитогенетических аномалий (эритроциты и лейкоциты с микроядрами, двуядерные лейкоциты, апоптозы) в клетках крови двух групп веслоноса из опытного хозяйства “Нивка” ИРХ НААН Украины. Более стабильным хромосомный аппарат оказался у группы веслоноса в осенний период. Обсуждена возможность влияния времени года на частоты встречаемости цитогенетических аномалий в клетках крови веслоноса.

### **SEASONAL VARIATIONS OF CYTOGENETIC CHARACTERISTICS OF PADDLEFISH**

*O. Tretyak, Y. Glushko, S. Tarasjuk*

The comparative analysis of occurrence frequency of cytogenetic anomalies (erythrocytes with micronucleus, leukocytes with micronucleus, binucleas leukocytes and apoptosis) in the blood cells in two groups of paddlefish (*Polyodon spathula* (Walb.)) from research economy “Nyvka” of FI NAAS of Ukraine has been carried out. It has been established, that the group of paddlefish has more stable chromosomal apparatus in the autumn. It is discussed the possible influence of season on occurrence frequency of cytogenetic anomalies in blood cells of paddlefish.