

СЕЛЕКЦІЯ, ГЕНЕТИКА ТА БІОТЕХНОЛОГІЇ

Ribogospod. nauka Ukr., 2019; 4(50): 87-94
DOI: <https://doi.org/10.15407/fsu2019.04.087>
УДК [639.371.52:597-115]:639.311(477)

Received 02.09.19
Received in revised form 22.10.19
Accepted 13.11.19

ЦИТОГЕНЕТИЧНИЙ ПРОФІЛЬ РІЗНОВІКОВИХ ГРУП ГАЛИЦЬКОГО КОРОПА В УМОВАХ ПРОМИСЛОВОГО ВИРОЩУВАННЯ У СТАВАХ ПРИКАРПАТТЯ

В. В. Гурбик, viktoriaduka@ukr.net, Інститут рибного господарства НААН, м. Київ
Ю. М. Глушко, niko-yulia@ukr.net, Інститут рибного господарства НААН, м. Київ
І. І. Грициняк, info.iforgua@gmail.com, Інститут рибного господарства НААН,
м. Київ
Н. Й. Тушницька, n-tushnitska@ukr.net, Інститут рибного господарства НААН,
м. Київ

Мета. Проаналізувати вікову та сезонну динаміку цитогенетичних показників у різновікових груп галицького коропа в умовах промислового вирощування.

Методика. Відбір крові для приготування мазка проводили з хвостової вени. Мазки фіксували метиловим спиртом і фарбували за методом Романовського розчином Гімза. Подальший аналіз проводили під мікроскопом «Primo Star Zeiss» зі збільшенням у 1000 разів. У мазках підраховували частоту еритроцитів з мікроядрами (ЕМЯ), однопіддерних лімфоцитів з мікроядрами (ЛМЯ), двоядерних лімфоцитів (ДЛ) і апоптозів (АП). Отримані дані вимірювали в проміле (‰).

Результати. Еритроцити з мікроядрами у різновікових груп галицького коропа знаходились в межах від $2,7\% \pm 0,4$ — $4,0\% \pm 0,7$. Кількість лімфоцитів з мікроядрами зафіксовано на рівні $2,0\% \pm 0,4$ — $2,4\% \pm 0,2$. Двоядерні лімфоцити у галицького коропа набувають значень в межах від $2,0\% \pm 0,2$ до $2,7\% \pm 0,3$. У результаті цитогенетичного аналізу встановлено зниження рівня клітин з апоптозом на 11% у тріліток галицького коропа в порівнянні з цьоголітками.

Після зимового утримання еритроцити з мікроядрами у однорічок та дворічок зафіксовано в межах $2,7\% \pm 0,5$ — $3,1\% \pm 0,6$. Частота лімфоцитів з мікроядрами у галицького коропа зменшується: так, у дворічок цей показник зазнавав свого зменшення на 8% і становив $2,4\% \pm 0,2$.

Двоядерні лімфоцити у галицького коропа після зимового утримання набували значень від $2,9\% \pm 0,1$ до $3,3\% \pm 0,2$. В результаті порівняльного аналізу цитогенетичних показників однорічок та дволіток встановлено достовірну різницю в кількості лімфоцитів з двоядрами ($P \leq 0,01$; $t_s = 3,57$). Отримані результати досліджень засвідчують, що підвищення показника спровоковано швидким зростанням рибопосадкового матеріалу в ставових умовах.

Наукова новизна. Вперше проаналізовано мінливість цитогенетичного апарату різновікових груп галицького коропа на різних етапах технологічного процесу при промисловому вирощуванні.

Практична значимість. Отримані результати можуть бути використані для подальшої селекційної роботи з галицьким коропом в умовах регіону.

Ключові слова: галицький короп, різновікові групи, апоптоз, двоядерні лімфоцити, еритроцити з мікроядрами.

© В. В. Гурбик, Ю. М. Глушко, І. І. Грициняк, Н. Й. Тушницька, 2019



CYTOGENETIC PROFILE OF DIFFERENT GROUPS OF THE HALYCH CARP IN CONDITIONS OF INDUSTRIAL AQUACULTURE IN SUBCARPATHIA PONDS

V. Gurbik, viktoriaduka@ukr.net, Institute of Fisheries NAAS, Kyiv

Yu. Glushko, niko-yulia@ukr.net, Institute of Fisheries NAAS, Kyiv

I. Hrytsyniak, info.iforgua@gmail.com, Institute of Fisheries NAAS, Kyiv

N. Tushnitskaya, n-tushnitska@ukr.net, Institute of Fisheries NAAS, Kyiv

Purpose. To analyze age and seasonal dynamics of the cytogenetic parameters in different age groups of Halych carp under conditions of industrial cultivation.

Methodology. Blood sampling for smear preparation was performed from the caudal vein. The smears were preserved in methyl alcohol and stained using the Romanowsky-Giemsa solution. Further analysis was performed under a Primo Star Zeiss microscope at 1000x magnification. The erythrocyte frequency from the micronucleus, single-nucleus lymphocytes from the micronucleus, dual-nucleus lymphocytes, and apoptosis were counted in the smears. The data obtained was measured in ppm (%).

Findings. Erythrocytes with micronuclei in different age groups of the Halych carp ranged from up to $2.7\% \pm 0.4 - 4.0\% \pm 0.7$. The number of lymphocytes with micronuclei was $2.0\% \pm 0.4 - 2.4\% \pm 0.2$. Dual-nucleus lymphocytes in the Halych carp ranged from $2.0\% \pm 0.2$ to $2.7\% \pm 0.3$. As a result of cytogenetic analysis, a 11% decrease in the level of cells with apoptosis in age-3 Halych carp compared to young-of-the-year was detected.

After wintering, erythrocytes with micronuclei in age-1 and age-2 carp were recorded to be within $2.7\% \pm 0.5 - 3.1\% \pm 0.6$. The incidence of lymphocytes with micronuclei in the Halych carp decreases, while this parameter in age-2 fish decreased by 8% and amounted to $2.4\% \pm 0.2$.

Dual-nucleus lymphocytes in the Halych carp after wintering ranged from $2.9\% \pm 0.1$ to $3.3\% \pm 0.2$. As a result of a comparative analysis of cytogenetic parameters of age-1 and age-2 carp, a significant difference in the number of lymphocytes with dual nuclei was found ($P < 0.01$; $t_s = 3.57$). The results of the studies show that an increase in this parameter was triggered by rapid growth of fish seeds in pond conditions.

Originality. For the first time, the variability of the cytogenetic apparatus of different age groups of the Halych carp at different stages of the technological process in industrial cultivation was analyzed.

Practical value. The results obtained can be used for further breeding work with the Halych carp in the region.

Keywords: Galician carp, different age groups, apoptosis, lymphocytes with nuclei, double nucleus lymphocytes, erythrocytes with micronuclei.

ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИЙ ПРОФИЛЬ РАЗНОВОЗРАСТНЫХ ГРУПП ГАЛИЦИЙСКОГО КАРПА В УСЛОВИЯХ ПРОМЫШЛЕННОГО ВЫРАЩИВАНИЯ В ПРУДАХ ПРИКАРПАТТЯ

В. В. Гурбик, viktoriaduka@ukr.net, Институт рыбного хозяйства НААН, г. Киев

Ю. Н. Глушко, niko-yulia@ukr.net, Институт рыбного хозяйства УААН, г. Киев

И. И. Грициняк, info.iforgua@gmail.com, Институт рыбного хозяйства НААН, г. Киев

Н. И. Тушницкая, n-tushnitska@ukr.net, Институт рыбного хозяйства НААН, г. Киев

Цель. Проанализировать возрастную и сезонную динамику цитогенетических показателей у разновозрастных групп галицийского карпа в условиях промышленного выращивания.

Методика. Отбор крови для приготовления мазка проводили с хвостовой вены. Мазки фиксировали метиловым спиртом и окрашивали по методу Романовского раствором Гимза.



Дальнейший анализ проводили под микроскопом «Primo Star Zeiss» с увеличением в 1000 раз. В мазках подсчитывали частоту эритроцитов с микроядрами (ЭМЯ), одноядерных лимфоцитов с микроядрами (ЛМЯ), двухъядерных лимфоцитов (ДЛ) и апоптозов (АП). Полученные данные измеряли в промилле (‰).

Результаты. Эритроциты с микроядрами у разновозрастных групп галицийского карпа находились в пределах от $2,7\% \pm 0,4$ — $4,0\% \pm 0,7$. Количество лимфоцитов с микроядрами зафиксировано на уровне $2,0\% \pm 0,4$ — $2,4\% \pm 0,2$. Двухъядерные лимфоциты в галицийского карпа находились в пределах от $2,0\% \pm 0,2$ до $2,7\% \pm 0,3$. В результате цитогенетического анализа установлено снижение уровня клеток с апоптозом на 11% в трехлетков галицийского карпа по сравнению с сеголетками.

После зимнего содержания эритроциты с микроядрами у годовиков и двухлетков зафиксированы в пределах $2,7\% \pm 0,5$ — $3,1\% \pm 0,6$. Частота лимфоцитов с микроядрами у галицийского карпа уменьшается: так, у двухлетков этот показатель показал свое уменьшение на 8%, составив $2,4\% \pm 0,2$.

Двухъядерные лимфоциты у галицийского карпа после зимнего содержания достигали уровня от $2,9\% \pm 0,1$ до $3,3\% \pm 0,2$. В результате сравнительного анализа цитогенетических показателей годовиков и двухлетков установлена достоверная разница в количестве лимфоцитов с двумя ядрами ($P < 0,01$; $t_s = 3,57$). Полученные результаты исследований показывают, что повышение показателя спровоцировано быстрым ростом рыбопосадочного материала в прудовых условиях.

Научная новизна. Впервые проанализирована изменчивость цитогенетического аппарата разновозрастных групп галицийского карпа на разных этапах технологического процесса при промышленном выращивании.

Практическая значимость. Полученные результаты могут быть использованы для дальнейшей селекционной работы с галицийским карпом в условиях региона.

Ключевые слова: галицийский карп, разновозрастные группы, апоптоз, двухъядерные лимфоциты, эритроциты с микроядрами.

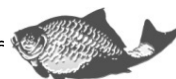
ПОСТАНОВКА ПРОБЛЕМИ ТА АНАЛІЗ ОСТАННІХ ДОСЛІДЖЕНЬ І ПУБЛІКАЦІЙ

Хромосомні мутації відіграють важливу еволюційну роль. Однак, делеції ділянок у хромосомному наборі риб спостерігаються частіше, ніж дуплікації, що призводить до виникнення нежиттєздатних фенотипів [1].

За допомогою цитогенетичного контролю існує можливість оцінити вплив чинників навколишнього середовища на генетичну структуру риб. Кумуляція мутацій в геномі може в подальшому призводити до збільшення генетичної мінливості [2].

Як було зазначено, оцінка дестабілізації хромосомного апарату здійснюється за допомогою цитогенетичного контролю. Ця методика надає можливість встановити різновид геномних мутацій у риб прижиттєвим способом та швидко виявити рівень геномної мінливості. Провести аналіз рівня геномних мутацій можливо за допомогою микроядерного тесту [3–5].

Утворення микроядер спостерігається в клітинах, які мають здатність до поділу в усіх системах організму і саме микроядерний тест є одним із надійних методів визначення частоти утворення микроядер у тканинах організму під впливом факторів навколишнього середовища [6, 7]. Цей метод розроблений на основі підрахунку «микроядер», які утворились внаслідок пошкодження цитогенетичного апарату, розривів або злиття деяких ділянок хромосом [4, 8].



ВИДІЛЕННЯ НЕВИРШЕНИХ РАНИШЕ ЧАСТИН ЗАГАЛЬНОЇ ПРОБЛЕМИ. МЕТА РОБОТИ

Мікроядерний тест є однією з характеристик, за допомогою якої можливо виявити вплив на організм риб умов вирощування. Тому є актуальним вивчення чутливості хромосомного апарату риб, як однієї з адаптивних можливостей, до конкретних умов вирощування, що буде основним в оптимізації господарської діяльності.

В умовах ставового вирощування на гомеостаз риб впливає комплекс абіотичних та біотичних чинників середовища. Оцінка фізіологічного стану об'єктів аквакультури у визначених умовах вирощування можлива за допомогою цитогенетичного контролю. Оцінка стабільності генотипу різновікових груп галицького коропа в умовах промислового вирощування дозволяє проаналізувати можливість подальшої селекційної роботи в умовах регіону.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Репрезентативну вибірку ($n = 15$) відбирали на базі ФГ «Короп» смт Рава-Руська Львівської області у 2016 р. Відбір здійснювали у різновікових груп галицького коропа під час проведення весняної інвентаризації і осіннього бонітування риб. Для приготування мазків використовували предметні скельця, на які спочатку наносили дві краплі фізіологічного розчину з $pH = 6,5$. У досліджуваних риб з хвостової вени стерильними шприцами відбирали периферичну кров і наносили кілька крапель на предметні скельця, після чого робили препарати. Мазки фіксували метиловим спиртом і фарбували за методом Романовського з використанням розчину Гімза. Подальший аналіз проводили під мікроскопом «Primo Star Zeiss» зі збільшенням у 1000 разів. Отримані дані виражали в проміле (‰) [9].

Статистичну вірогідність відмінностей частот зустрічальності цитогенетичних аномалій між групами оцінювали за критерієм Стьюдента (t_s).

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Цитогенетичний профіль галицького коропа формується в результаті сезонної і вікової стабільності генетичного апарату протягом зростання. Спостерігається дестабілізація генетичного апарату і тенденція до накопичення мутацій з віком у різновікових особин.

Частота зустрічання еритроцитів з мікроядрами на першому році життя галицького коропа знаходилася на рівні $4,0\% \pm 0,7$. На другому році життя значення даного показника перебували на рівні $3,9\% \pm 0,6$. У тріліток спостерігалось зменшення рівня еритроцитів з мікроядрами до $3,7\% \pm 0,6$.

Кількість лімфоцитів з мікроядрами у цьоголіток галицького коропа зафіксовано на рівні $2,4\% \pm 0,2$. У дворічок вона зазнала свого незначного зниження і становила $2,3\% \pm 0,4$. Трілітки галицького коропа характеризували нижчим рівнем лімфоцитів з мікроядрами — на 16%, — які перебували на рівні $2,0\% \pm 0,4$.

Частота зустрічання двоядерних лімфоцитів у галицького коропа на першому році життя становила $2,7\% \pm 0,3$. У дволіток кількість лімфоцитів з двома ядрами



знаходилась на рівні $2,1\% \pm 0,3$, що на 20% менше, ніж у цьоголіток. Трилітки характеризувалися найнижчим рівнем аналогічного показника — $2,0\% \pm 0,2$ (рис. 1).

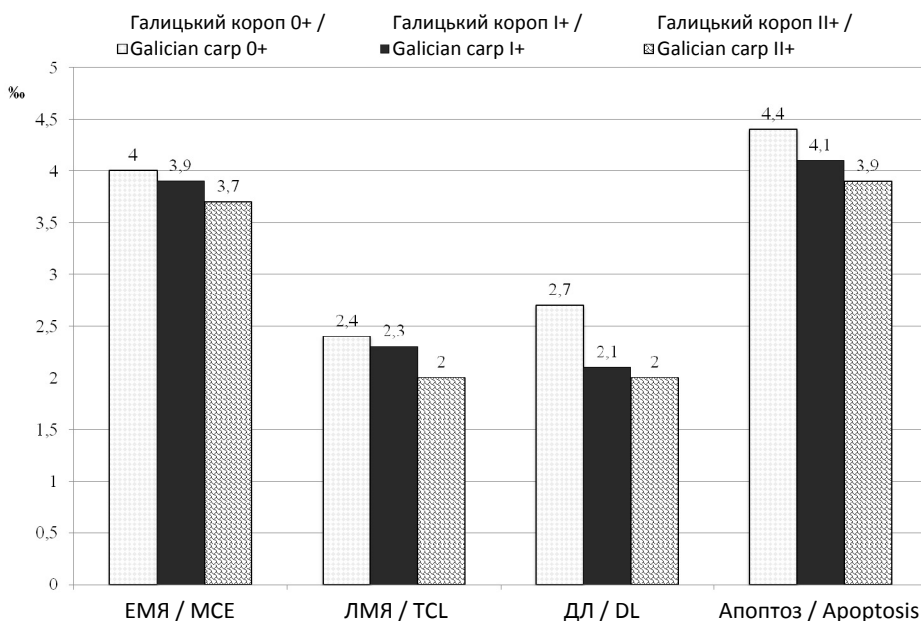


Рис. 1. Цитогенетичний профіль різновікових груп галицького коропа в кінці вегетаційного сезону в умовах промислового вирощування

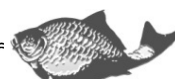
Fig. 1. Cytogenetic profile of different age groups of Galician carp at the end of the growing season in the conditions of industrial cultivation.

Порівняльний аналіз трьох вікових груп галицького коропа показав, що його трилітки за частотою клітин з апоптозом в порівнянні з цьоголітками характеризуються на 11% нижчим значенням. На першому році життя у рибопосадкового матеріалу цей показник знаходився на рівні $4,4\% \pm 0,3$. На другому році життя кількість клітин з апоптозом перебувала на рівні $4,1\% \pm 0,4$. Трилітки галицького коропа характеризувалися найменшим показником зустрічання клітин з апоптозом, а саме $3,9\% \pm 0,3$.

Статистично достовірної різниці між різновіковими групами галицького коропа в період промислового вирощування у ставах Прикарпаття не встановлено, проте чітко простежується тенденція до зниження рівня клітин з цитогенетичними порушеннями у триліток порівняно з молодшими віковими групами.

Частота еритроцитів з мікроядрами після зимового утримання на першому році життя галицького коропа знаходилась на рівні $3,1\% \pm 0,6$. У дворічок даний показник був нижчим на 13%, складаючи $2,7\% \pm 0,5$.

Частота зустрічання лімфоцитів з мікроядрами у дворічок галицького коропа була нижчою на 8%, порівняно з однорічками (рис. 2).



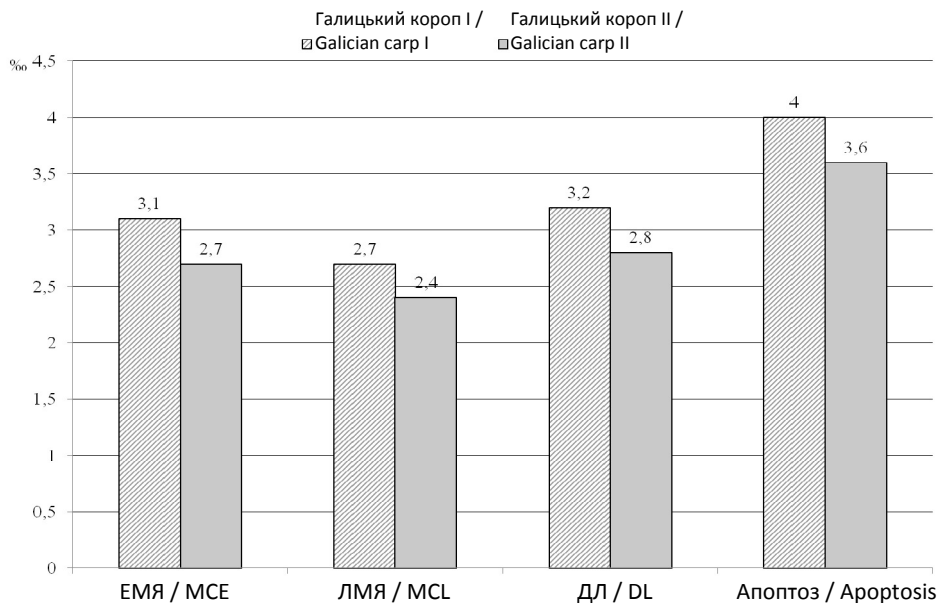


Рис. 2. Динаміка цитогенетичної мінливості однорічок та дворічок галицького коропа в ставових умовах Прикарпаття

Fig. 2. Dynamics of the cytogenetic variability of yearlings and two-year-old Galician carp in pond conditions in the Carpathian region

За кількістю двоядерних лімфоцитів у рибопосадкового матеріалу галицького коропа на другому році життя після зимового утримання також спостерігали нижчі значення. У однорічок кількість лімфоцитів з двома ядрами знаходилася на рівні $3,2\% \pm 0,2$, що на 14% менше, ніж у попередніх.

У однорічок спостерігали на 11% вищі значення клітин з апоптозом у порівнянні з дворічками. На другому році життя кількість клітин з апоптозом знаходилася на рівні $3,6\% \pm 0,3$. Статистично достовірної різниці між двома групами галицького коропа після зимівлі не встановлено.

В умовах промислового вирощування галицького коропа на другому році життя спостерігали сезонну динаміку цитогенетичних показників. Виявлено зростання кількості ЕМЯ у осінній період. Рівень лімфоцитів з мікроядрами протягом третього року життя зріс на 16% у порівнянні з аналогічним показником, зареєстрованим у дворічок. В той час як на другому році життя кількість лімфоцитів знизилася на 17% (рис. 3).

Упродовж вегетаційного сезону спостерігалось незначне збільшення кількості клітин з апоптозом у дволіток та тріліток. В осінній період спостерігали зниження рівня ЛМЯ та ДЛ як у однорічок, так і дворічок, та незначне зростання рівня апоптозів.

Кількість двоядерних лімфоцитів у особин галицького коропа на другому році життя після зимового утримання зазнала свого зменшення на 1,2%. У тріліток кількість лімфоцитів з двома ядрами знаходилася на рівні $3,9\% \pm 0,3$, що на 30% менше, ніж у попередньої вікової категорії.



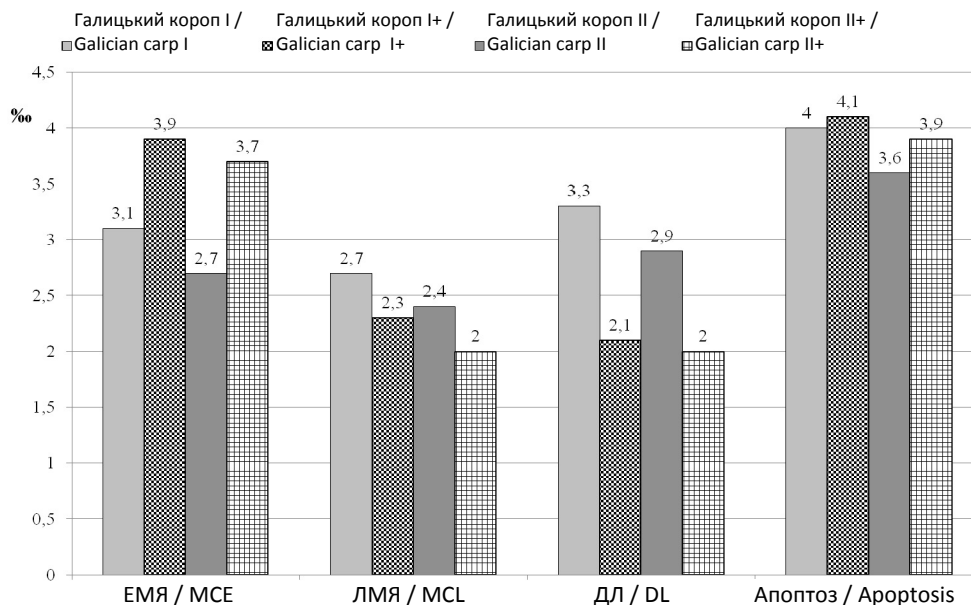


Рис. 3. Динаміка цитогенетичної мінливості галицького коропа впродовж вегетаційного сезону в умовах промислового вирощування

Fig. 3. Dynamics of the cytogenetic variability of the Galician carp during the growing season in the conditions of industrial cultivation

В результаті порівняльного аналізу цитогенетичних показників однорічок та дволіток встановлено достовірну різницю в кількості лімфоцитів з двома ядрами ($P < 0,01$; $t_s = 3,57$). Отримані результати досліджень засвідчують, що підвищення показника спровоковано швидким ростом рибопосадкового матеріалу в ставових умовах.

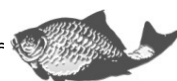
ВИСНОВКИ ТА ПЕРСПЕКТИВИ ПОДАЛЬШОГО РОЗВИТКУ

В результаті цитогенетичного аналізу встановлено, що частота еритроцитів з мікроядрами у різновікових груп галицького коропа зростає в осінній період. Порівняльний аналіз різновікових груп коропа за частотою цитогенетичних порушень (ЕМЯ, ДЛ, ЛМЯ) та апоптозу показує, що трілітки характеризуються найвищою цитогенетичною стабільністю в порівнянні з іншими віковими групами. Впродовж вегетаційного сезону зафіксовано збільшення частоти двоядерних лімфоцитів у дволіток галицького коропа, що на нашу думку, пов'язано з високим темпом росту та масонакопиченням рибопосадковим матеріалом.

Отримані результати будуть використані для подальшої селекційної роботи з галицьким коропом як рідкісним і малопоширеним в межах України.

ЛІТЕРАТУРА

1. Кирпичников В. С. Генетика и селекция рыб. Ленинград : Наука, 1987. 520 с.



2. Шельов А. В. Цитогенетична оцінка племінних ресурсів сільськогосподарських тварин : автореф. дис. на здобуття наук. ступеня канд. с.-г. наук : спец 03.00.15 «Генетика». Чубинське, 2008. 17 с.
3. Архипчук В. В., Гончарук В. В. Биотестирование качества воды на клеточном уровне // Химия и технология воды. 2001. № 5. С. 32—38.
4. Захидов С. Т., Карпюк М. И., Галиченков В. А. Цитогенетический мониторинг волжского бассейна. Уровни хромосомных мутаций в половых и соматических клетках самцов стерляди // Известия РАН. 1993. № 1. С. 102—106.
5. Урываева И. В. Перспективы разработки и применения в экологических исследованиях цитогенетического метода анализа микроядер в гепатоцитах // Известия РАН. 1993. № 1. С. 88—94.
6. Дробышевский В. Ф. Мутации на различных уровнях наследственного аппарата гидробионтов при воздействии генотоксичных загрязнителей водной среды : автореф. дис. на соискание уч. степени канд. биол. наук : спец. 03.00.18 «Гидробиология». Москва, 2005. 21 с.
7. Schmidt W. The micronucleus test // Mutation Res. 1975. Vol. 31. P. 5—9.
8. Micronuclei as an index of cytogenetic damage: past, present, and future / Heddle J. A. et al. // Environmental and Molecular Mutagenesis. 1991. Vol. 18, iss. 4. P. 277—291.
9. Heddle J. A. Micronuclei *in vivo* // Prog. Clin. Biol. Res. 1990. Vol. 340. P. 185—194.
10. Ильинских Н. Н., Новицкий В. В., Ванчугова Н. Н. Микроядерный анализ и цитогенетическая нестабильность. Томск : ТомГУ, 1992. 272 с.

REFERENCES

1. Kirpichnikov, V. S. (1987). *Genetika i selekcija ryb*. Leningrad: Nauka.
2. Shelov, A. V. (2008). Tsytohenetychna otsinka plemynnykh resursiv silskohospodarskykh tvaryn. *Extended abstract of candidate's thesis*. Chubynske.
3. Arhipchuk, V. V., & Goncharuk, V. V. (2001). Biotestirovanie kachestva vody na kletochnom urovne. *Himija i tehnologija vody*, 5, 32-38.
4. Zahidov, S. T., Karpjuk, M. I., & Galichenkov, V. A. (1993). Citogeneticheskij monitoring volzhskogo bassejna. Urovni hromosomnyh mutacij v polovyh i somaticheskikh kletkah samcov sterljadi. *Izvestija RAN*, 1, 102-106.
5. Uryvaeva, I. V. (1993). Perspektivy razrabotki i primenenija v jekologicheskikh issledovanijah citogeneticheskogo metoda analiza mikrojaderv v gepatocitah. *Izvestija RAN*, 1, 88-94.
6. Drobyshevskij, V. F. (2005). Mutacii na razlichnyh urovnjah nasledstvennogo apparata gidrobiontov pri vozdejstvii genotoksichnyh zagrjaznitelej vodnoj sredy. *Extended abstract of candidate's thesis*. Moskva.
7. Schmidt, W. (1975). The micronucleus test. *Mutation Res.*, 31, 5-9.
8. Heddle, J. A., Cimino, M. C., & Hayashi, M. et al. (1991). Micronuclei as an index of cytogenetic damage: past, present, and future. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 18(4), 277-291.
9. Heddle, J. A. (1990). Micronuclei *in vivo*. *Prog. Clin. Biol. Res.*, 340, 185-194.
10. Ilinskih, N. N., Novickij, V. V., & Vanchugova, N. N. (1992). *Mikrojadernyj analiz i citogeneticheskaja nestabil'nost'*. Tomsk: TomGU.

