
ГЕНЕТИКА, СЕЛЕКЦІЯ ТА РОЗВЕДЕННЯ

УДК 639.3.032:639.371.5

МІНЛИВІСТЬ ЦИТОГЕНЕТИЧНИХ ХАРАКТЕРИСТИК У КОРОПА (*CYPRINUS CARPIO*)

О.А. Ковальова, Н.А. Кобозєва, С.І. Тарасюк,
І.І. Грициняк, М.Я. Єфіменко

Інститут рибного господарства УААН, м. Київ

Виконано аналіз цитогенетичних характеристик клітин периферичної крові і кісткового мозку трьох груп коропа, які фенотипно належать до різних внутрішньопородних типів (лускатий, малолускатий, рамчастий), які розводили в ДП дослідному господарстві “Нивка” Інституту рибного господарства УААН, Київської області. Показано, що незважаючи на широку індивідуальну мінливість у риб за кількістю хромосом у клітинах кісткового мозку, за частотою зустрічальності цитогенетичних аномалій — еритроцитів і лейкоцитів із мікроядрами, двоядерних лейкоцитів не виявлено внутрішньогрупових відмінностей і різниці між групами. У зв'язку з цим передбачається, що у риб частота зустрічальності клітин із мікроядрами і двоядерними лейкоцитами у периферичній крові є найбільш об'єктивним показником стабільності хромосомного апарату, ніж мінливість клітин за числом хромосом.

Риба — незамінний харчовий продукт, тому збільшенню її споживання надається дедалі більше уваги. Штучне вирощування риби дає змогу отримувати досить високу біомасу на одиницю площі, яка перевищує біомасу наземних сільськогосподарських тварин у 3–5 разів.

Традиційно ставкове господарство в Україні орієнтовано на вирощування коропа (*Cyprinus carpio*). Так, у 1990 р. загальна продукція аквакультури досягла 136,5 тис. т [1], включаючи 110 тис. т товарного коропа. Однак у подальшому цей показник знизився, зменшилася і продуктивність коропа: до 2004 р. його частка в сумарній аквапродукції України досягла 48% [2]. У найближчому майбутньому основні тенденції у вітчизняній українській аквакультурі будуть пов'язані з поліпшенням якості традиційних риб — об'єктів культивування, зокрема при вирощуванні товарного коропа планується збільшення товарної маси до 1–1,5 кг і вище [3].

Основними факторами, що затримують розвиток аквакультур, є недостатня розробка екологічних основ розведення риб, їх оптимального видового складу, профілактики захворювань, а також кормової бази. Зниження негативної дії таких факторів потребує розвитку методів контролю популяційно-генетичних

процесів, які відбуваються в штучно вирощених популяціях риб. Одним з них є оцінка і контроль стабільності генетичного апарату риб залежно від породної належності, а також умов розведення в різних господарствах. Як показники дестабілізації хромосомного апарату риб використовують мікроядерний тест у еритроцитах, лейкоцитах, оцінку частот зустрічальності метафазних пластинок із хромосомними абераціями в клітинах верхівок нирок [4–7], мікроядерний тест і оцінку дефектів морфології ядер клітин крові [8], а також частоти зустрічальності двоядерних клітин [9, 10]. Такий аналіз необхідний для контролю і прогнозу впливу на популяційну структуру ставкових риб умов вирощування, а також для проведення селекційної роботи.

Для того щоб оцінити інформативність різних характеристик дестабілізації хромосомного апарату, в нашому дослідженні виконано порівняльний аналіз мікроядерного тесту в еритроцитах і лейкоцитах, частот зустрічальності двоядерних лейкоцитів периферичної крові трьох груп коропа, які фенотипно належать до різних внутрішньопородних типів (лускатий, малолускатий, рамчастий), але розводили їх в одному і тому самому дослідному господарстві “Нивка” Київської області

Інституту рибного господарства УААН. Виконано також дослідження з розробки методики одержання метафазних пластинок із кісткового мозку у риб, які у ссавців традиційно використовуються для оцінки стабільності хромосомного апарату.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

Дослідження виконували у трьох групах дворічок коропа (*Cyprinus carpio*) (лускатий, малолускатий, рамчастий короп), яких розводять у господарстві "Нивка". У тварин краплю периферичної крові розводили фізіологічним розчином (1:1) і на предметних скельцях готували мазки. Мазки фіксували метиловим спиртом і висушували за кімнатної температури, потім фарбували барвником Гімза (Merck, Німеччина). Клітини кісткового мозку у риб вимивали розчином KCl (0,54%) із сегментів хребетних кісток, потім клітини суспензували та інкубували у цьому розчині за 37°C протягом 40 хв, далі фіксували сумішшю метилового спирту та оцтової кислоти (3:1) протягом 1 год. Після того тричі відмивали фіксуючим розчином і витримували у ньому за температури 9°C протягом доби. Далі готували препарати і фарбували їх барвником Гімза. Передобробку риб колхіцином не проводили.

У мазках крові підраховували частоту еритроцитів із мікроядрами (ЕМЯ), одноядерних лімфоцитів із мікроядрами (ЛМЯ), двоядерних лімфоцитів (ДЛ) не менш ніж у 3000 клітин. Одержані дані виражали у проміле (‰). У метафазних пластинках оцінювали кількість хромосом.

Пофарбовані цитогенетичні препарати аналізували за допомогою бінокулярного мікроскопа "Carl Zeiss" при збільшенні у 1000 разів. Клітини і метафазні пластинки фотографували за допомогою цифрового фотоапарата "Canon" (PowerShot G6, Great Britain).

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

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

У мазках крові риб ядерні еритроцити були відносно невеликого розміру з щільними, компактними ядрами (рис. 1) на відміну від лейкоцитів (рис. 2). Це допомагає легко їх відрізнити і проводити у них підрахунок мікроядер окремо для кожної групи клітин. Також легко типуються і двоядерні лейкоцити, відносно підвищена частота яких у клітинах периферичної крові відображає певні порушення в проходженні кінцевої стадії мітотичного поділу, цитокінезу (рис. 3).

Результат підрахунку клітин із цитогенетичними аномаліями у трьох досліджених груп коропа наведено у таблиці. Виявлено відносно знижену частоту зустрічальності ДЛ у малолускатого коропа. Загалом, одержані дані свідчать про те, що розглянуті групи риб, які фенотипно належать до різних внутрішньопородних типів, але відтворюються в одному і тому самому господарстві, не відрізняються одна від одної за такими характеристиками дестабілізації хромосомного апарату, як частоти зустрічальності ЕМЯ і ЛМЯ.

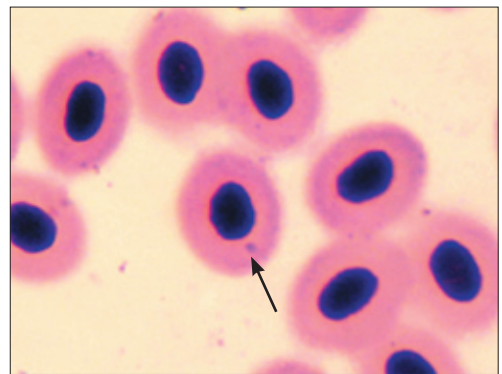
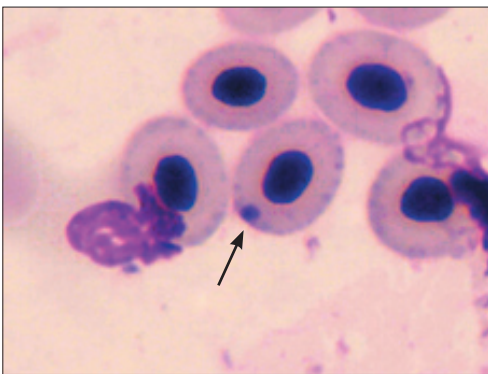


Рис. 1. Еритроцити з мікроядрами

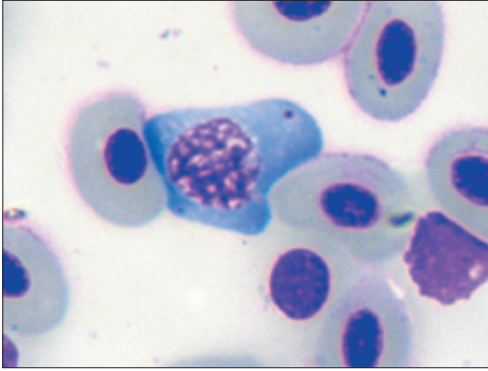


Рис. 2. Лейкоцит із мікроядром

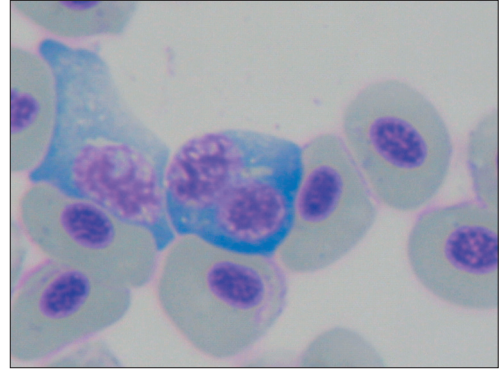


Рис. 3. Двоядерний лейкоцит

Частоти зустрічальності еритроцитів і лейкоцитів у клітинах периферичної крові трьох груп коропа, ‰

№ тварин	Еритроцити із мікроядрами	Двоядерні лімфоцити	Лімфоцити із мікроядрами
<i>Лускатий короп</i>			
1	7	4	6
7	8	3	5
8	6	4	4
9	4	4	3
10	4	3	3
12	7	5	6
13	4	5	4
14	6	5	5
15	6	4	6
16	4	2	6
17	5	3	3
18	7	5	4
19	5	5	4
20	3	2	5
Середнє	5,4±0,3	3,8±0,3	4,6±0,3
<i>Малолускатий короп</i>			
2	5	2	4
3	5	1	4
Середнє	5	1,5±0,5	4
<i>Рамчастий короп</i>			
4	7	2	4
5	6	2	5
6	7	5	5
21	5	3	4
Середнє	6,2±0,5*	3,0±0,7	4,5±0,3*

* Вірогідність $P > 0,05$ відмінностей між частотами зустрічальності ЕМЯ і ЛМЯ у рамчастого коропа.

Привертає увагу той факт, що в усіх досліджених риб спостерігалася підвищена частота зустрічальності ЕМЯ порівняно з ЛМЯ (у рамчастого коропа ці відмінності статистично вірогідні). Це дає змогу припускати, що частота зустрічальності еритроцитів із мікроядрами може бути відносно більш чутливим показником дестабілізації хромосомного апарату, порівняно з оцінкою клітин із мікроядрами серед лейкоцитів.

У трьох тварин із групи лускатого коропа (№ 14, 15, 16) було виділено клітини кісткового мозку і виконано індивідуальну оцінку риб за наявністю серед метафазних пластинок кожної риби клітин із різною кількістю хромосом. У риби № 14 кількість хромосом варіювала від 44 до 245 (кількість плечей від 56 до 263); у № 15 — від 68 до 133 (кількість плечей від 76 до 154); у № 16 — від 33 до 90 (кількість плечей від 52 до 124).

У світовій базі даних про рибу (www.fishbase.org) наведено 35 записів каріотипування коропа у різних країнах. За цими записами видно, що гаплоїдний набір хромосом у коропа варіює від 49 до 52 хромосом, зустрічаються і триплоїдні особини. У деяких випадках у коропа описано також і додаткові В хромосоми [11].

На основі розподілу метафазних пластинок із різною кількістю хромосом у клітинах кісткового мозку риб можна очікувати, що для риби № 14 типовими є набори хромосом від диплоїдного до пентаплоїдного (рис. 4), для риби № 15 — навколодиплоїдні клітини (рис. 5), а у риби № 16 переважають гіподиплоїдні клітини (рис. 6). Цікаво відзначити, що за частотою зустрічальності еритроцитів і лейкоцитів із мікроядрами риби групи лускатого коропа № 14, 15 і 16 (див. табл.) фактично не відрізнялися одна від одної.

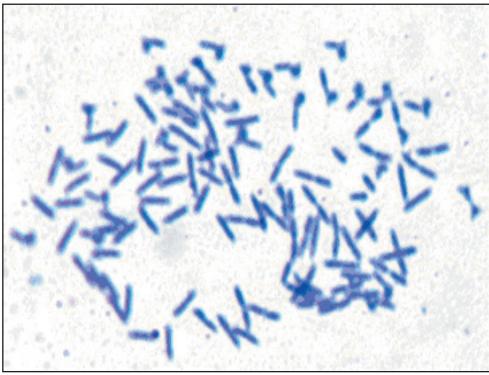


Рис. 4. Метафазна пластинка із клітин кісткового мозку лускатого коропа № 14 (132 хромосоми)

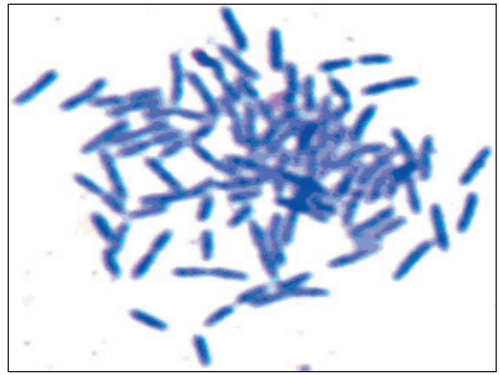


Рис. 5. Метафазна пластинка із клітин кісткового мозку лускатого коропа № 15 (100 хромосом)

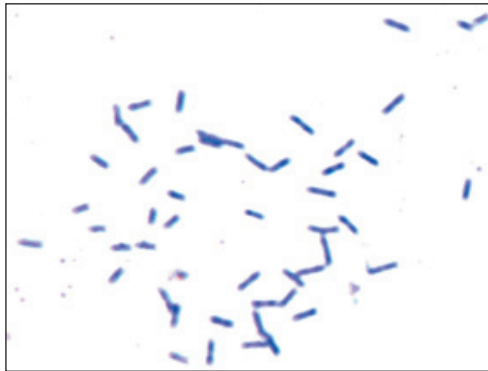


Рис. 6. Метафазна пластинка із клітин кісткового мозку лускатого коропа № 16 (52 хромосоми)

ВИСНОВКИ

Одержані дані свідчать, що частота зустрічальності клітин із мікроядрами серед еритроцитів і лейкоцитів периферичної крові у різних особин звичайного коропа прямо не пов'язана зі спектром індивідуальної мінливості клітин кісткового мозку за числом хромосом. Очевидно, в основі формування клітин різної плідності у ко-

ропа лежать механізми, які відрізняються від тих, що призводять до виникнення хромосомних аберацій, а також клітин із мікроядрами. Це дає можливість припускати, що мікроядерний тест у риб є більш надійною характеристикою дестабілізації хромосомного апарату, ніж такі традиційні цитогенетичні характеристики, як частка анеуплоїдних або поліплоїдних клітин.

ИЗМЕНЧИВОСТЬ ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК У КАРПА (*CYPRINUS CARPIO*)

О.А. Ковалева, Н.А. Кобозева, С.И. Тарасюк, И.И. Грициняк, М.Я. Ефименко

На основании анализа цитогенетических характеристик клеток периферической крови и костного мозга рыб трех групп карпа, фенотипически принадлежавших к разным внутривидовым типам, по количеству хромосом в клетках костного мозга и частоте встречаемости цитогенетических аномалий не выявлены ни внутри-, ни межгрупповые отличия. Показано, что количество клеток с микроядрами и двуядерными лейкоцитами в периферической крови является более объективным показателем стабильности хромосомного аппарата, чем изменчивость клеток по числу хромосом.

THE VARIABILITY OF CYTOGENETIC CHARACTERS IN CARP (*CYPRINUS CARPIO*)

O. Kovalova, N. Kobozieva, S. Tarasjuk, I. Grycynjak, M. Efinenko

The analysis of cytogenetic anomalies frequency in peripheral blood cells and bone marrow cells at three groups carp was carry out. Groups carp belong to various intra-breed types (scale carp, few-scale carp, frame carp), which breeding in economy "Nivka" of the Institute of Fisheries of the UAAS. Not observed intra-group and inter-group differences to frequencies of cells with micronuclei and binuclear cells. However there is wide individual variability to number of chromosomes in bone marrow cells. Thus, for fish the frequencies of cells with micronuclei and binuclear cells are objective character of cytogenetic stability.

ЛІТЕРАТУРА

1. *Kukharev N., Romanov V.* The Fishery Industry in Ukraine // EASTFISH Fishery Industry. — 1998. — Vol. 13. — P. 50–54.
2. Щорічний звіт за 2004 р. — К.: ПГКО УКРРИБГОСП, 2005.
3. Закон України від 19 лютого 2004 року № 1516-IV "Загальнодержавна програма розвитку рибного господарства України на період до 2010 року".
4. *Al-Sabti K., Metcalfe C.D.* Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water // *Mutat. Res.* — 1995. — Jun. — Vol. 343 (2–3). — P. 121–135.
5. *Al-Sabti K.* Clastogenic effects of five carcinogenic-mutagenic chemicals on the cells of the common carp, *Cyprinus carpio* // *Comp. Biochem. Physiol. C.* — 1986. — Vol. 85 (1). — P. 5–9.
6. *Hutchinson T.H., Ankley G.T., Segner H., Tyler C.R.* Screening and testing for endocrine disruption in fish-biomarkers as "signposts" not "traffic lights" in risk assessment // *Environ. Health Perspect.* — 2006. — Apr. — Vol. 114. — Suppl. 1. — P. 106–114.
7. *Llorente M.T., Martos A., Castano A.* Detection of cytogenetic alterations and blood cell changes in natural populations of carp // *Ecotoxicology.* — 2002. — Feb. — Vol. 11 (1). — P. 27–34.
8. *Talapatra S.N., Banerjee S.K.* Detection of micronucleus and abnormal nucleus in erythrocytes from the gill and kidney of *Labeo bata* cultivated in sewage-fed fish farms // *Food Chem. Toxicol.* — 2007. — Feb. — Vol. 45 (2). — P. 210–215.
9. *Cavas T., Garanko N.N., Arkhipchuk V.V.* Induction of micronuclei and binuclei in blood, gill and liver cells of fishes subchronically exposed to cadmium chloride and copper sulphate // *Food Chem Toxicol.* — 2005. — Apr. — Vol. 43 (4). — P. 569–574.
10. *Arkhipchuk V.V., Garanko N.N.* Using the nucleolar biomarker and the micronucleus test on in vivo fish fin cells // *Ecotoxicol. Environ. Saf.* — 2005. — Sep. — Vol. 62 (1). — P. 42–52.
11. *Arkhipchuk V.V.* Chromosome database. Database of Dr. Victor Arkhipchuk. — 1999. (www.fishbase.org)