

Wpływ Roundupu na gamety amura białego (*Ctenopharyngodon idella* Val.) – badania wstępne

Katarzyna Ługowska[#]

Uniwersytet Przyrodniczo-Humanistyczny w Siedlcach,
Wydział Nauk Ścisłych i Przyrodniczych, Instytut Nauk Biologicznych,
ul. Prusa 14, 08-110 Siedlce

Badania prowadzono na jajach (ikrze) i plemnikach amura białego (*Ctenopharyngodon idella* Val.) uzyskanych podczas sztucznie stymulowanego tarła. Do oceny wpływu Roundupu na ikrę zastosowano następujące stężenia herbicydu: 0,0 – kontrola; 0,1; 0,2; 0,5; 2,0; 5,0 i 10,0 mg/l. Natomiast ruchliwość plemników mierzono w tężeniach: 0,0 – kontrola; 0,1; 0,5; 2,0; 5,0; 10,0; 20,0 i 50,0 mg/l. Badania wykazały, że herbicyd spowodował zwiększone pęcznienie ikry oraz znacząco skrócił czas ruchliwości plemników amura białego.

SŁOWA KLUCZOWE: amur biały, glifosat, ikra, plemniki

Amur biały to roślinożerna ryba karpioвата, która ze względu na zdolność do spożywania dużych ilości wodnych makrofitów (van der Zwerde, 1990) jest hodowana jako „naturalny środek zwalczający chwasty” (Pipalova, 2006; Verma i in., 2009). Ze względu na bardzo specyficzne wymagania, naturalny rozród amura białego możliwy jest tylko w jego rodzimym środowisku – w rzece Amur, w Azji (Shireman i Smith, 1983). Natomiast wszędzie tam, gdzie gatunek ten został introdukowany, może być rozmnażany jedynie sztucznie w wylęgarniach. Biologia amura została dobrze poznana (Cross, 1969; Michewicz i in., 1972; Krupauer, 1989; Bozkurt i Ogretmen, 2012). Przebadano także wpływ wielu czynników środowiskowych (Galloway i Kilambi, 1984; Glasser i in., 2004; El-Fiky, 2002; Vajargah i Hedayati, 2017) i antropogenicznych (Jeziarska i in., 2002; Ługowska i in., 2002; Jeziarska i in., 2009; Matasin i in., 2011; Ahmed i in., 2012; Vajargah i Hedayati, 2017) na różne stadia rozwojowe oraz osobniki dorosłe tego gatunku. Jednak danych dotyczących wpływu herbicydów na amura jest niewiele. W związku z tym, za cel prezentowanych badań przyjęto określenie wpływu Roundupu na gamety amura białego.

[#]Autor korespondencyjny e-mail: katarzyna.lugowska@uph.edu.pl

Wpłynęło do Redakcji: 11.03.2020

Przyjęto do druku: 15.05.2020

Material i metody

Badania prowadzono na jajach (ikrze) i plemnikach amura białego, które pozyskano z wylęgarni w Gospodarstwie Rybackim "Samokłęski" w Kamionce (woj. lubelskie).

Materiał został przetransportowany w lodówce (w temperaturze 5°C) do laboratorium Zakładu Fizjologii Zwierząt (Uniwersytet Przyrodniczo-Humanistyczny w Siedlcach). Po około 2 godzinach od pobrania mieszaninę ikry pochodzącą od trzech samic zapłodniono mieszaniną nasienia od trzech samców, metodą opisaną przez Ługowską (2009). W celu oceny wpływu Roundupu (substancja czynna: glifosat w stężeniu 170 g/l, Monsanto Europe SA/NV) na pęcznienie ikry, po 25 zapłodnionych jaj umieszczono na szalkach Petriego w stężeniach Roundupu: 0,0 – kontrola; 0,1; 0,2; 0,5; 2,0; 5,0 i 10,0 mg/l. Posługując się mikroskopem stereoskopowym (powiększenie 1,6×12) z okularami pomiarowymi zmierzono średnicę całego jaja i żółtka po 20, 40, 60 i 120 minutach od zapłodnienia, w celu ustalenia czasu i wielkości całkowitego pęcznienia ikry.

Procent pęcznienia obliczono posługując się wzorem:

$$x = (c - d) \times 100 / d,$$

gdzie:

x – pęcznienie (przyrost średnicy jaja),

c – średnica jaja,

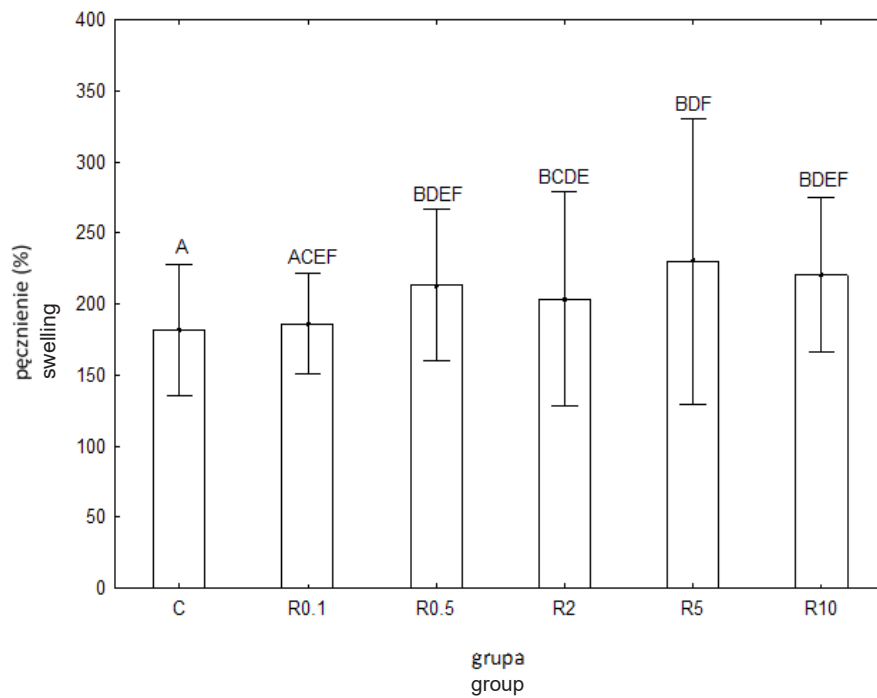
d – średnica żółtka.

Ruchliwość plemników mierzono za pomocą mikroskopu świetlnego (powiększenie 40×12,5). W celu aktywacji plemniki od 3 samców (10 µl) zmieszano odpowiednio z 10 µl czystej wody wodociągowej lub roztworami Roundupu (0,0 – kontrola; 0,1; 0,5; 2,0; 5,0; 10,0; 20,0 i 50,0 mg/l) na szkiełku podstawowym. Czas aktywności plemników mierzono od momentu aktywacji do ustania ruchów plemników (5 powtórzeń dla każdego stężenia). Temperatura wody użytej podczas eksperymentów wynosiła 24°C.

Uzyskane wyniki poddano analizie statystycznej za pomocą programu STATISTICA 10. Normalność rozkładu badano za pomocą testu Shapiro-Wilka, a jednorodność wariancji za pomocą testu Levene'a. Wyniki pęcznienia jaj wykazały normalny rozkład, w związku z czym analizowano je za pomocą ANOVA, a następnie testu post-hoc Tukey'a. Dla ruchliwości plemników (dane, które nie spełniały założeń ANOVA) przeprowadzono nieparametryczny test U Manna-Whitney'a. Poziom istotności ustalono na $p < 0,05$. Dane przedstawiono jako średnie \pm SD.

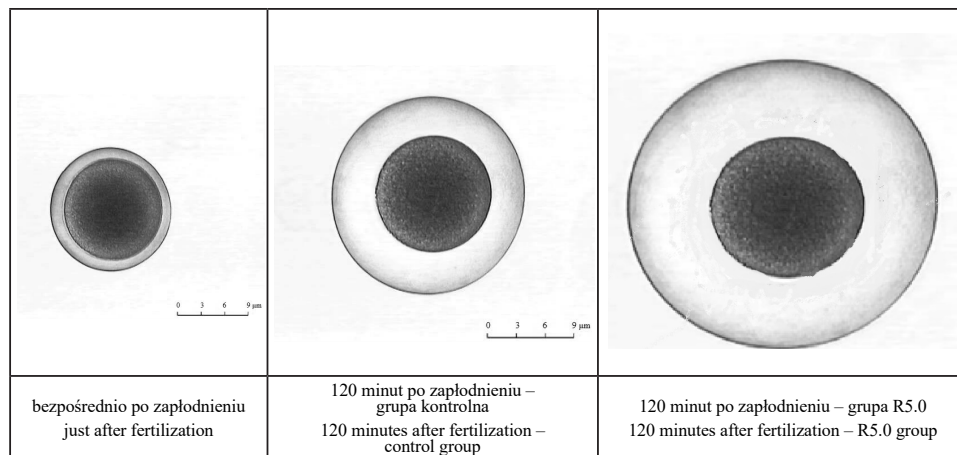
Wyniki i dyskusja

Ikra amura napęczniała maksymalnie po 120 minutach od zapłodnienia (rys. 1a, b). W grupie kontrolnej procent pęcznienia wynosił 181,8. Inkubacja jaj w wodzie zawierającej Roundup (z wyjątkiem stężenia 0,1 mg/l, gdzie pęcznienie wynosiło 180,1%) spowodowała znaczny wzrost pęcznienia; najwyższy wynik uzyskano w stężeniach 0,5 i 5 mg/l, odpowiednio 229,3% i 230,1%. Wyniki te są przeciwne do uzyskanych w wcześniejszych badaniach na ikrze kapia (Ługowska, 2018), w których takie same stężenia



Rys 1a. Pęcznienie ikry amura białego po 120 minutach od zapłodnienia (test post-hoc Tukey'a – różne litery oznaczają różnice istotne statystycznie pomiędzy grupami)

Fig 1a. The effect of Roundup on swelling of grass carp eggs 120 min after fertilization (Tukey's post-hoc test – different superscript letters indicate significant differences between groups)

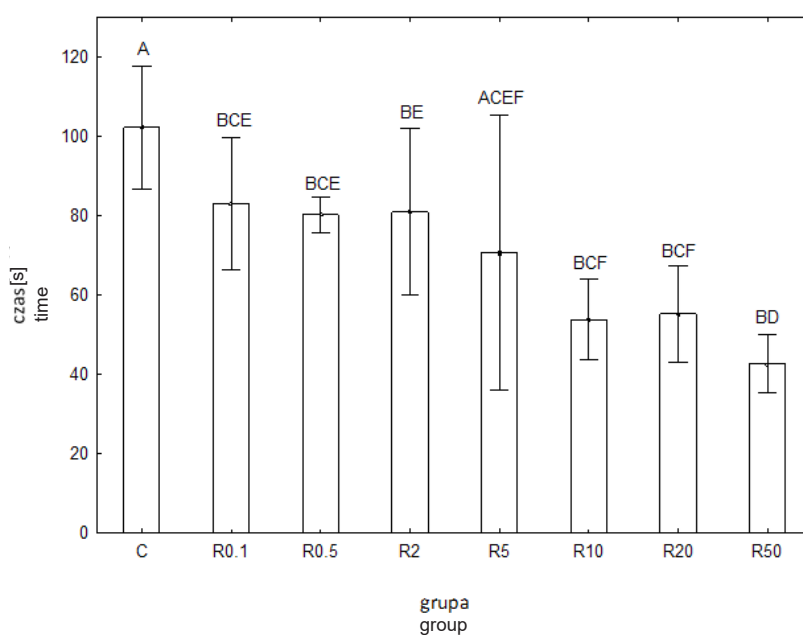


Rys. 1b. Pęcznienie ikry amura białego

Fig. 1b. Swelling of grass carp eggs

Roundupu spowodowały znaczny spadek pęcznienia ikry. Także dostępne dane literaturowe wskazują, że niekorzystne warunki środowiskowe zmniejszają pęcznienie jaj ryb (Witeska i in., 1995; Jezierska i Słomińska, 1997; Calta, 2001; Sikorska i Ługowska, 2005). Mechanizm wpływu herbicydów na zdolność pęcznienia ikry ryb jest wciąż nieznan. Prawdopodobnie zmiany pęcznienia jaj pod wpływem Roundupu mogą być konsekwencją zaburzeń poboru wody i wymiany jonowej między płynem perywitelarnym a środowiskiem zewnętrznym i/lub zmian właściwości fizycznych powierzchni jaja.

Ruchliwość plemników amura znacząco malała wraz ze wzrostem stężenia Roundupu (z wyjątkiem stężenia 5,0 mg/l). Czas trwania ruchliwości plemników w kontroli wynosił 102,2 s, zaś w najwyższym stężeniu herbicydu tylko 42,6 s (rys. 2). Te same stężenia Roundupu spowodowały jedynie niewielki spadek ruchliwości plemników karpia, a znaczący wpływ herbicydu zaobserwowano tylko przy stężeniu 20 mg/l (Ługowska, 2018). W tej samej pracy omówione zostały też możliwe przyczyny takiego oddziaływania herbicydu na plemniki karpia. Chociaż mechanizmy toksycznego działania Roundupu na plemniki ryb są nadal nieznanne, w pracy przeglądowej Hafei i in. (2011) wskazują elementy decydujące o ruchliwości plemników (błona plazmatyczna, akson i ATP), które są szczególnie narażone na działanie zanieczyszczeń środowiska (w tym herbicydów). Uszkodzenie błony plazmatycznej powoduje zakłócenie potencjału błonowego wymaganego do inicjacji ruchliwości plemników, co powoduje zmniejszenie liczby ruchliwych plemników. W aksonach celem



Rys 2. Ruchliwość plemników amura białego (test U Mann–Whitney’a, $p < 0,05$ – różne litery oznaczają różnice istotne statystycznie pomiędzy grupami)

Fig 2. The effect of Roundup on motility of grass carp sperm (Mann–Whitney U test, $p < 0.05$ – different superscript letters indicate significant differences between groups)

działania herbicydów jest drugi przekaźnik cAMP, zaangażowany w inicjację ruchliwości plemników poprzez przeniesienie potencjałów błonowych do aksonów. Na poziomie molekularnym jak dotąd tylko jedno badanie wykazało wpływ herbicydu na ładunek energetyczny komórki (AEC) – to jest jego spadek wraz ze spadkiem ATP i wzrostem AMP.

Podsumowanie

Przedstawione wyniki są rezultatem wstępnych badań nad wpływem Roundupu na amura białego. Wykazały one, że herbicyd ten nawet w niskich stężeniach może znacząco wpływać na pęcznienie ikry i ruchliwość plemników, co ma ogromne znaczenie dla sukcesu zapłodnienia i dalszego rozwoju ryb.

PIŚMIENNICTWO

- Ahmed M.S., Ahmed K.S., Mehmood R., Ali H., Khan W.A. (2012). Low dose effects of cadmium and lead on growth in fingerlings of vegetarian fish, grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). The Journal of Animal & Plant Sciences, 22 (4): 902–907.
- Bozkurt Y., Ogretmen F. (2012). Sperm quality, egg size, fecundity and their relationships with fertilization rate of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). Iranian Journal of Fisheries Sciences, 11 (4): 755–764.
- Calta M. (2001). Effects of aqueous cadmium on embryos and larvae of mirror carp. Indian Journal of Animal Sciences 71: 885–888.
- Cross D.G. (1969). Aquatic weed control using grass carp. Journal of Fish Biology 1: 27–30.
- El-Fiky N.K. (2002). The influence of water pH on the embryonic development of grass carp, *Ctenopharyngodon idella*. Egyptian Journal of Aquatic Biology and Fisheries, 6 (3): 233–261.
- Galloway M.L., Kilambi R.V. (1984). Temperature preference and tolerance of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). Journal of the Arkansas Academy of Science, 38: 36–37.
- Glasser F., Mikolajczyk T., Jalabert B., Baroiller J.F., Breton B. (2004). Temperature effects along the reproductive axis during spawning induction of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). General and Comparative Endocrinology, 136: 171–179.
- Hatef A., Alavi S.M.H., Butts I.A.E., Policar T., Linhart O. (2011). The mechanisms of action of mercury on sperm morphology adenosine-5-triphosphate content and motility in *Perca fluviatilis* (Percidae; Teleostei). Environmental Toxicology and Chemistry, 30: 905–914.
- Jeziarska B., Ługowska K., Witeska M. (2002). The effect of temperature and heavy metals on heart rate changes in common carp *Cyprinus carpio* L. and grass carp *Ctenopharyngodon idella* (Val.) during embryonic development. Archives of Polish Fisheries, 10: 153–165.
- Jeziarska B., Ługowska K., Witeska M. (2009). The effects of heavy metals on embryonic development of fish (a review). Fish Physiology and Biochemistry, 35: 625–640.
- Jeziarska B., Słomińska I. (1997). The effect of copper on common carp (*Cyprinus carpio* L.) during embryonic and postembryonic development. Polish Archives of Hydrobiology, 44: 261–272.
- Krupauer V. (1989). Byložravné ryby [Herbivorous Fish]. Mze CR a Cesky rybársky svaz, SZN, Praha, pp. 115 (in Czech).
- Ługowska K. (2009). Embryonic development of barbel (*Barbus barbus*). The Israeli Journal of Aquaculture – Bamidgeh, 61: 68–72.

- Ługowska K. (2018). The effects of Roundup on gametes and early development of carp. *Fish Physiology and Biochemistry*, 44 (4); 1109-1117 (DOI:10.1007/s10695-018-0498-9).
- Ługowska K., Jezierska B., Witeska M., Sarnowski, P. (2002). Deformations of newly hatched grass carp larvae. *Acta scientiarum Polonorum, series: Piscaria*, 1: 15–21.
- Matasin Z., Orescanin V., Jukic V.V., Nejedli S., Matasin M., Tlak Gajger I. (2011). Heavy metals in mud, water and cultivated grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) and bighead carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) from Croatia. *Journal of Animal and Veterinary Advances*, 10 (8): 1069–1072. DOI: 10.3923/javaa.2011.1069.1072.
- Michewicz J.E., Sutton D.L., Blackburn R.D. (1972). Water quality of small enclosures stocked with white amur. *Hyacinth Control Journal*, 10: 22–25.
- Pipalova I. (2006). A review of grass carp use for aquatic weed control and its impact on water bodies. *Journal of Aquatic Plant Management*, 44: 1–12.
- Shireman J.V., Smith Ch.R. (1983). Synopsis of biological data on the grass carp *Ctenopharyngodon idella* (Cuv. and Val., 1844). *FAO Fish Synopses 135*, Rome: FAO.
- Sikorska J., Ługowska K. (2005). Wpływ kadmu na rozwój embrionalny karpia (*Cyprinus carpio* L.). *Komunikaty Rybackie*, 3: 6–8 (in Polish).
- Vajargah M.F., Hedayati A. (2017). Toxicity Effects of Cadmium in Grass Carp (*Ctenopharyngodon idella*) and Big Head Carp (*Hypophthalmichthys nobilis*). *Transylvanian Review of Systematical and Ecological Research* 19.1 (2017), “The Wetlands Diversity” (DOI: 10.1515/trser-2017-0004).
- Verma D.K., Routray P., Dash C., Dasgupta S., Jena, J.K. (2009). Physical and biochemical characteristics of semen and ultrastructure of spermatozoa in six carp species. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 9: 67–76.
- Witeska M., Jezierska B., Chaber J. (1995). The influence of Cd on common carp embryos and larvae. *Aquaculture*, 129: 129–132.
- Zweerde W. van der (1990). Biological control of aquatic weeds by means of phytophagous fish. In: A.H. Pieterse and K.J. Murphy (eds.) *Aquatic Weeds The Ecology and Management of Nuisance Aquatic Vegetation*. Oxford Univ. Press, Oxford, pp. 201–221.

Katarzyna Ługowska

The effects of Roundup on gametes of grass carp *Ctenopharyngodon idella* Val. Preliminary research

S u m m a r y

The study was conducted on the eggs (roe) and sperm of grass carp (*Ctenopharyngodon idella* Val.) obtained during artificially induced spawning. The effect of Roundup on eggs was assessed using the following concentrations of the herbicide: 0.0 (control), 0.1, 0.2, 0.5, 2.0, 5.0 and 10.0 mg/l. Sperm motility was measured at concentrations of 0.0 (control), 0.1, 0.5, 2.0, 5.0, 10.0, 20.0 and 50.0 mg/l. The study showed that the herbicide increased swelling of grass carp eggs and significantly reduced the duration of sperm motility.

KEY WORDS: grass carp, glyphosate, fish eggs, sperm