КАРІОТИПОВА МІНЛИВІСТЬ КОРІВ УКРАЇНСЬКОЇ ЧЕРВОНО-РЯБОЇ МОЛОЧНОЇ ПОРОДИ

В. В. ДЗИЦЮК, доктор сільськогосподарських наук, старший науковий співробітник, завідувач лабораторії генетики

<https://orcid.org/0000-0001-9697-4165>

E-mail: valentynadzitsiuk@gmail.com

Інститут розведення і генетики тварин імені М. В. Зубця НААН

Т. В. ЛИТВИНЕНКО, кандидат сільськогосподарських наук, доцент кафедри генетики, розведення та біотехнології тварин

<https://orcid.org/0000-0002-0405-3367>

E-mail: tv-litv@ukr.net

Національний університет біоресурсів і природокористування України

Анотація. У статті розглядаються результати цитогенетичного дослідження корів української червоно-рябої молочної породи з метою пошуку зв'язку хромосомних аберацій з порушеннями у репродуктивній здатності. Для дослідження хромосомного набору відібрані 33 корови української червоно-рябої молочної породи ДП «ДГ «Христинівське» ІРГТ ім. М. В. Зубця» НААН з різним станом репродуктивної функції. Постановка культури лімфоцитів і аналіз препаратів хромосом проводилось у лабораторії генетики Інституту розведення і генетики тварин імені М. В. Зубця. Для приготування препаратів хромосом лімфоцити периферійної крові культивували протягом 72 годин за температури + 37 °C в середовищі RPMI 1640 (Sigma, США) з 0,1 мл ФГА (Sigma, США) як мітогеном і 15 % ембріональної телячої сироватки. Припинення ділення клітин на стадії метафази припиняли введенням колхіцину («Serva», Німеччина, 0,3 мкг / мл). Обробка суспензії клітин після культивування здійснювали гіпотонічним 0,075 М розчином KCl з наступною фіксацією в трьох змінах суміші метанол-оцтової кислоти (3:1). Класифікацію та облік аберацій хромосом здійснювали за загальноприйнятими методиками. В результаті досліджень в хромосомних наборах усіх тварин з різною частотою виявили аномалії геномного типу (анеуплоїдія та поліплоїдія) та структурні аберації хромосом (фрагменти, розриви, асоціації хромосом). У каріотипах тварин із порушеною відтворною здатністю виявлено частоту клітин з анеуплоїдними та поліплоїдними наборами хромосомна 13,02 % і клітин із хромосомними абераціями на 3,4 % більше, ніж у корів з нормальними репродуктивними функціями. Цитогенетичне дослідження корів дозволяє не лише оцінити насиченість каріотипу небажаними абераціями хромосом, а також дає змогу використати отримані результати для прогнозування в ранньому віці тварини її рівень продуктивної та стан репродуктивної здатності.

Ключові слова: українська червоно-ряба молочна порода, цитогенетичне дослідження, каріотип, аберації, хромосоми, відтворна здатність

Матеріали і методи дослідження.

Часті перегули у тварин, повторні викидні, народження виродків, мертвого, нежиттєздатного приплоду служать показниками для проведення дослідження стану хромосомного набору. Рання цитогенетична оцінка дозволить виявити мутації, які можуть негативно позначитися на відтворювальній і продуктивній здатності корів.

Аналіз останніх досліджень і публікацій.

Перші повідомлення, що вказали на зв'язок хромосомних порушень із відтворною здатністю і продуктивністю тварин, зробив I. Gustavsson у 1964 році, де він навів докази зв'язку спадкових хромосомних аномалій з ембріональною смертністю, аномаліями статевої диференціації і зниженням фертильності (Gustavsson I., 1964). Інші автори підтвердили, що збільшення нестабільності хромосомного апарату у корів пов'язано із зниженням відтворної функції (Трухачев, 2017). На основі власних досліджень (Бакай и Перчихин, 1985) показали, що рівень надою і відтворні якості корів чорно-рябої породи залежать від рівня мінливості каріотипу.

Також в літературі є повідомлення про те, що рівень анеуплоїдії в клітинах крові корів із порушенням репродуктивної функції значно вищий, ніж у корів, що не мали викиднів чи мертвородів (Мехтієва, 2016; Бакай, 2010). Аналогічні результати досліджень отримав і Е. П. Мугниєв (Мугниєв, 2001), на думку якого показник анеуплоїдії може бути надійним маркером відтворної здатності корів.

Метою роботи є дослідження каріотипової мінливості у корів з різними порушеннями репродуктивної функції.

Об'єктом дослідження було маточне стадо корів української червоно-рябої молочної породи, яке розводиться в ДП “ДГ “Христинівське” Інституту розведення і генетики тварин імені М. В. Зубця НААН. На основі матеріалів зоотехнічного обліку із комп'ютерної інформаційної системи управління молочним скотарством “Інтесел Орсек” відібрали корів із різним станом відтворної здатності (33 гол.).

Цитогенетичний аналіз виконували у лабораторії генетики Інституту розведення і генетики тварин імені М. В. Зубця НААН з використанням спеціальних методик і відповідного обладнання. Для здійснення поставленої мети було сформовано дві групи корів української червоно-рябої молочної породи з урахуванням функціонального стану їх репродуктивної системи:

I група – тварини з порушеною відтворною здатністю (у яких протягом періоду використання відзначали часті мертвонародження та спонтанні викидні), 13 голів;

II група – умовно-контрольна, корови з відсутністю порушень репродуктивної функції, 20 голів.

Для отримання препаратів хромосом використовували культуру лейкоцитів периферійної крові тварин. Короткострокову культуру готували за методом, запропонованим Р. Moorhead (Moorhead et al., 1960). Лімфоцити периферійної крові культивували протягом 72 годин за температури $+ 37^{\circ}\text{C}$ в середовищі RPMI 1640 (Sigma, США) з 0,1 мл ФГА (Sigma, США) як мітогеном і 15 % ембріональної телячої сироватки.

Для припинення ділення клітин на стадії метафази за 2 години до закінчення терміну культивування вводили колхіцин («Serva», Німеччина) (0,3 мкг / мл). Центрифугуванням отримували осад клітин, який обробляли гіпотонічним розчином KCl (0,075 М) протягом 20 хвилин. Фіксацію клітин здійснювали в трьох змінах суміші метанол-оцтової кислоти у співвідношенні 3:1 і наносили краплями на охолоджене зволожене предметне скло. Для рутинного фарбування хромосом використовували 2 % розчин барвника Гімза (Gimza Merk) і аналізували під мікроскопом Axiostarplus (Carl Zeiss, Німеччина).

Визначали відсоток метафазних пластинок з хромосомними абераціями: частота анеуплоїдних та поліплоїдних клітин, частота клітин з структурними абераціями хромосом (розриви, фрагменти та передчасне розходження центромер мітотичних хромосом – (ПРЦХ). За визначення кількості поліплоїдних клітин у якості допоміжного прийому використовували підрахунок статевих хромосом, кожна з яких відповідає одному гаплоїдному набору.

Під час організації вибірок враховували типовість, об'єктивність

та однорідність первинних матеріалів племінного обліку. Для оцінки результатів використовували параметричні критерії достовірності різниці (критерій Ст'юдента), три рівня значення достовірності ($P > 0,95$, $P > 0,99$, $P > 0,999$). Додаткова обробка матеріалу проводилась за допомогою пакету програм Microsoft Excel.

Результати власних досліджень. Порухення відтворювальних якостей корів відзначають повсюдно і, як правило, до них відносять порушення ембріонального розвитку, аборти і мертвонародження. Останнім часом відзначають зростання числа виявлених мутацій у корів різних генотипів. Завдяки цитогенетичним методам дослідження можна встановити генетичну нестачу і виявити підвищену ймовірність утворення хромосомно-аномальних гамет і ступінь пошкодження генотипу (Бакай, 2009).

Отримані результати дослідження хромосомного набору корів із різною відтворююю здатністю свідчать про різницю у частоті клітин з числовими і структурними порушеннями хромосом. Результати цитогенетичного аналізу тварин представлені в таблиці. Так, цитогенетичний аналіз 478 метафазних пластинок 13 корів із пору-

1. Каріотипова мінливість корів української червоно-рябої молочної худоби з різною відтворююю здатністю

Група		I	II
Голів		13	20
Досліджених метафаз		478	782
Всього аберантних клітин, %		$12,94 \pm 2,46$	$5,56 \pm 1,59$
Частота геномних аберацій, %	анеуплоїдних клітин	$4,33 \pm 0,64$	$2,39 \pm 0,31$
	поліплоїдних клітин	$2,85 \pm 0,23$	$0,38 \pm 0,11$
Частота структурних аберацій хромосом, %	розриви	$2,70 \pm 0,47$	$1,75 \pm 0,39$
	фрагменти	$2,50 \pm 0,41$	$1,27 \pm 0,28$
	транслокації	$0,03 \pm 0,01$	0
	ПРЦХ	$2,56 \pm 0,71$	$1,37 \pm 0,30$

шеною відтворною здатністю виявив, що частка аберантних клітин склала $12,94 \pm 2,46$ %. Сумарний середній рівень гетеропloidії сягає позначки 7,18 %, основну частку якого (4,33 %) займає анеупloidія і майже вдвічі менше (2,85 %) – поліпloidія. Загальна частота структурних аберацій хромосом на 40 % менша, ніж геномних, і складає 7,76 %, серед яких найвищий відсоток у клітин з розривами – 2,70 %.

Аналіз 782 метафазних пластинок 20 корів з відтворною здатністю в нормі виявив, що загальна частка аберантних клітин склала 5,56 %. Сумарний середній рівень гетеропloidії сягає 2,77 %, в якому частка анеупloidічних клітин майже в 6 разів достовірно ($P > 0,999$) перевищує частоту, з якою зустрічаються в дослідженні поліпloidні клітини.

Щодо частоти структурних аберацій хромосом, то їх сумарний середній рівень вірогідно ($P > 0,999$) вдвічі нижчий, ніж у тварин з порушеннями відтворної функції і склав 2,52 % за найвищої частоти клітин з розривами хромосом ($1,75 \pm 0,39$).

В аналізі спектру каріотипових аберацій у досліджених тварин ми

виявили структурні перебудови хромосом, сформовані як з'єднання двох акроцентричних не гомологічних хромосом центромерними районами з утворенням однієї метацентричної хромосоми, які кваліфікуються як транслокації за типом робертсонівських (RT). Аналізом рутинно-збарвлених препаратів встановили наявність робертсонівської транслокації у корови із порушеннями репродуктивної системи з частотою $0,03 \pm 0,01$ %, яка була ідентифікована як RT 1/29 (рис. 1. а, б).

Ознака передчасного розходження центромер мітотичних хромосом – (ПРЦХ) свідчить про нестабільність каріотипу і ймовірність утворення анеупloidічних клітин після мітотичного поділу. Аналіз хромосомних наборів корів з порушеннями репродуктивної функції виявив в два рази більшу частку клітин з явищем несинхронності розходження хромосом в завершальній стадії мітозу мітозу.

Відомо, що оптимальне функціонування живого організму зумовлює каріотипова норма, тобто відсутність в наборі хромосом чисельних і структурних відхилень.

Рис. 1. Метафазна пластинка хромосом корови: а) з хромосомою з розривом; б) з транслокацією RT 1/2 9 (збільшення: об. $\times 100$; ок. $\times 10$)

Щодо наслідків хромосомної нестабільності думки майже всіх дослідників збігаються: хромосомна нестабільність залежно від ступеня її вираженості негативно впливає на функціонування організму тварини на всіх стадіях онтогенезу. Контроль відтворювальної функції тварин за загальноприйнятими методами (оцінка за якістю потомства, основі морфо-функціонального стану статевих органів) не дають повної інформації про генетичний вплив на запліднюваність, ембріональну смертність, народження аномального потомства, викиднів тощо. Тому активно ведуться пошуки і аналіз причин, що призводять до погіршення відтворювальної функції за допомогою генетичних методів, в тому числі і цитогенетичних.

В літературі представлено багато повідомлень щодо зв'язку показників цілісності каріотипу з продуктивними і відтворними якостями, отриманих на основі експериментальних даних. Встановлено, що хромосомні аберації, призводять до порушень морфогенезу від початку розвитку зиготи і обумовлюють до 90 % загибелі зародків у перші два тижні їх розвитку. Вченими наводяться чітко підтверджені експериментальними дослідженнями факти, що числові мутації каріотипу (анеуплоїдія, трисомія, моносомія) є причиною ембріональної смертності особин. Порушення норми числа хромосом у каріотипі виникають внаслідок нерозходження хроматид під час другого мейотичного поділу або хромосом під час першого мейотичного поділу. Трисомія і моносомія (аберації, що належать до групи аберацій названих анеуплоїдами) можуть виникати і в результаті порушення розходження

чи втрати мітотичних хромосом на початку або протягом проходження ембріогенезу. Живі носії структурних перебудов хромосом часто не мають фенотипових відхилень. Однак у гаметогенезі у них формуються статеві клітини з незбалансованим набором хромосом, які дають початок нежиттєздатним ембріонам, що є причиною зниження рівня відтворювальної функції. Здебільшого повідомлення різних авторів щодо частоти числових і структурних хромосомних мутацій різняться: в одних стадах їх більше, в інших – менше (Pate et al., 2012; Iannuzzi, 2007). Можливою причиною варіювання рівня каріотипової мінливості у різних стадах чи популяціях є жорсткість виявлення і елімінація носіїв, інбредність стада, що сприяє переходу аберацій з прихованого стану у такий, що проявляється фенотипово тощо

Корови із різним ступенем важкості отелення відрізняються за рівнем структурних порушень хромосом (Danielak-Czech and Slota, 2008). Більша частота клітин із хромосомними пробілами виявилась у корів із важким перебігом отелень (El-Bayomi et al., 2011). Також в літературі є повідомлення про те, що рівень анеуплоїдії в клітинах крові корів із порушенням репродуктивної функції значно вищий, ніж у корів, що не мали абортів і мертвородів (Fricke V.P et al., 2007).

Аналогічні результати досліджень отримав і Е. П. Мугниєв (Мугниєв Э. П., 2001), на думку якого показник анеуплоїдії може бути надійним маркером відтворної здатності корів. Часто анеуплоїдія, як повідомляють дослідники, призводить до зниження репродуктивної функції (Schmutz et al., 1996). Так, наслідком

моносомій і трисомій окремих хромосом є рання ембріональна смертність, у дорослих особин спостерігається гіпоплазія сім'яників, некроспермія чи олігоспермія (Khan, 2016).

Таким чином, за рівнем цитогенетичних показників можна оцінювати і, певною мірою, прогнозувати репродуктивну здатність корів.

Висновки та пропозиції.

У корів в ДП «ДГ “Христинівське” ІРГТ ім. М. В. Зубця НААН» встановлено співвідносність виявлення геномних і хромосомних операцій із проявом ознак репродуктивної здатності. Це означає, що за рівнем наведених цитогенетичних показників можна оцінювати і, певною мірою, прогнозувати репродуктивну здатність корів в ранньому віці. Отримані результати доцільно використовувати у племінній роботі для добору племінних телиць.

References

1. Gustavsson, I., Rockborn G. (1964). Chromosome abnormality in three cases of lymphatic leukemia in cattle. *Nature*. 203. 990.
2. Trukhachev, V. I., Oleynik, S. A., Zlydnev, N. Z., Morozov, V. Yu., Selionova, M. I., Chizhova, L. N., Skokova A. V. (2017). Osobennosti khromosomnogo nabora korov severokavkazskoy populyatsii golshtinskoy porody pri narushenii funktsii vosproizvodstva [Features of the chromosome set of cows of the North Caucasian Holstein breed in violation of the function of reproduction]. *Tsitologiya i genetika* [Cytology and genetics]. 4. 44-51 (in Russian).
3. Bakay, A. V. (1985). Populyatsionno-statisticheskiye parametry kariotipicheskoy izmenchivosti korov cherno-pestroy porody [Population-statistical parameters of the karyotypic variability of Black-and-White cows]. *Sb. nauch. tr. Mosk. vet. akad. [Collection of scientific papers]*. 19-22 (in Russian).
4. Mekhtiyeva, K. S. (2016). Kariotipicheskaya nestabil'nost' u korov cherno-pestroy porody slegkoy i tyazheloy formy otela [Karyotypic instability in Black-and-White cows with a light and severe calving]. *Sbornik nauchnykh trudov [Collection of scientific papers]*. Krasnodar. 1. 8-10 (in Russian).
5. Bakay, A. I., Bulusov, K. A. (2010). Vosproizvoditel'nyye kachestva plemennykh korov s raznym urovнем kariotipicheskoy nestabil'nosti [Reproductive qualities of breeding cows with different levels of karyotypic instability]. *Problemy biologii produktivnykh zhivotnykh [Problems of the biology of productive animals]*. 4. 21-30 (in Russian).
6. Mugniyev, E. P. (2001). Khozyaystvenno-poleznye priznaki i kariotipicheskoy aneustabil'nosti u cherno-pestrykh golshtinizirovannykh korov raznykh genotipov [Economic beneficial traits and karyotypic instability in black-and-white Holsteinized cows of different genotypes]. *Avtoreferat dissertatsii [Abstract dissertation]*. Moscow. 29. (in Russian).
7. Moorhead, P. S., Nowell, P. C., Mellman, W. J., Battlps, D. M., Hungejord, D. A. (1960). Chromosome preparations of leucocytes cultured from human peripheral blood. *Exptl. Cell. Res.* 3. 613–616.
8. Bakay, A. I. (2009). Vosproizvoditel'nyye kachestva golshtinizirovannykh korov s raznyim urovнем kariotipicheskoy nestabil'nosti: dis. kand. biol. nauk: 06.02.01. *Moskovskaya gosudarstvennaya akademiya im. K. I. Skryabina*. Moscow. 112.
9. Patel, D. J., Patel, A. J., Patel, R. K., Parekh P. R. (2012). Chromosomal analysis of Breeding bulls using lymphocyte culture. *The Bangladesh Veterinarian*. 29. 1. 17 – 21.
10. Iannuzzi L. (2007). Cytogenetic sin animal production. *Animal Science*. 6 (1). 23-8.
11. Danielak-Czech, B., Słota, E. (2008). Karyotype control system of AI boars in Poland:

- the current survey. *Annals of Animal Science*. 3. 255–262.
12. El-Bayomi, Kh. M., Iman, E. El-Araby, Asmaa W. (2011) Zagloul Cytogenetic Analysis Related to Some Infertility Problems in Cattle. *Global Veterinaria*. 7 (4). 323–329.
13. Fricke, V.P., Revay, T., Saver, D.R. (2007). Managing reproductive disorders in dairy cows. *Cytogenetic and Genome Research*. 116. 80–84.
14. Schmutz, S.M., Moker, J.S., Clark, E.G., Orr, J.P. (1996). Chromosomal aneuploidy associated with spontaneous abortions and neonatal losses in cattle. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 8. 91–95.
15. Khan, M.H., Manoj, K., Pramod, S. (2016). Reproductive disorders in dairy cattle under semi-intensive system of rearing in North-Eastern India. *Veterinary World*. 9 (5). 512–8.
-

V. V. Dzitsiuk, T. V. Litvinenko (2019). KARYOTYPE VARIABILITY FOR THE COWS OF UKRAINIAN RED-AND-WHITE DAIRY CATTLE. *ANIMAL SCIENCE AND FOOD TECHNOLOGY*, 10(2): 22–28. <https://doi.org/10.31548/animal2019.02.022>

Abstract. *The paper considers the results of the cytogenetic study of cows of Ukrainian dairy breeds in order to find a connection of chromosomal aberrations with impaired reproductive ability. For the study of chromosome set selected 33 cow Ukrainian Red-and-White dairy. The production of lymphocytes culture and chromosomes analysis was conducted at the laboratory of Genetics of the Institute of Breeding and Animal genetics named after M. V. Zubtysya. For the preparation of chromosomes, peripheral blood lymphocytes were cultivated within 72 hours at the temperature + 37.0 °C in the environment of RPMI 1640 (Sigma, USA) with 0.1 ml of FCS (Sigma, USA) as the Mitogen and 15 % embryonal calf skin Serum. The discontinuation of cell division in the metaphase stage has been stopped by the introduction of Colchicine ("Serva", Germany, 0.3 micrograms/ml). Treatment of suspension cells after cultivation was hypotonic 0.075 M solution with the subsequent fixation in three shifts of the mixture of methanol-acetic acid (3:1). Classification and accounting aberrations chromosomes carried out according to generally accepted techniques. As a result of studies in chromosomal sets of all animals with different frequency revealed anomalies of genomic type (aneuploidy and polyploidy) and structural aberrations of chromosomes (fragments, breaks, associations of chromosomes). The karyotype of animals with impaired reproductive capacity revealed an incidence of cells with aneuploid and polyploid chromosome sets of 13.02 % and cells with chromosomal aberrations of 3.4% greater than cows with normal reproductive functions. Cytogenetic study of cows not only assesses the karyotype saturation by unwanted chromosome aberrations, but also allows the use of the results obtained to predict at an early age the animal's productive level and reproductive capacity.*

Keywords: *Ukrainian Red-and-White dairy cattle breed, cytogenetic research, karyotype, aberrations, chromosomes, reproductive ability, productive qualities.*