

УДК 636.27(477).082.25:[575.16:575.316]

КАРІОТИПОВА МІНЛИВІСТЬ КОРІВ УКРАЇНСЬКОЇ ЧЕРВОНО-РЯБОЇ МОЛОЧНОЇ ПОРОДИ РІЗНОГО СТУПЕНЯ СПОРІДНЕНОСТІ

В. В. ДЗИЦЮК, М. М. ПЕРЕДРІЙ

*Інститут розведення і генетики тварин імені М.В.Зубця НААН (Чубинське, Україна)
valentynadzitsiuk@gmail.com*

В статті викладені результати досліджень каріотипової мінливості корів української червоно-рябої молочної породи різного рівня спорідненості. Виявили аномалії геномного типу (анеуплоїдія і поліплоїдія) та структурні аберації хромосом (фрагменти, розриви, асоціації хромосом). Найвищий рівень аберантних клітин зафіксовано у близькоспоріднених тварин. У корів з порушеною відтворювальною здатністю незалежно від ступеня їх інбридингу частота клітин, що мають геномні порушення і структурні аберації, вища, ніж у корів з відтворювальною функцією в нормі. Аналіз генетичної структури популяції за рівнем генетичного ризику показав, що у групі низького генетичного ризику найбільшу частку складають корови без відхилень в репродуктивній системі. Цитогенетичне дослідження корів дозволяє не лише оцінити насиченість небажаними абераціями хромосом дане стадо української червоно-рябої молочної породи, а і дає змогу використати отримані результати для прогнозування у ранньому віці рівня репродуктивної здатності корів.

Ключові слова: українська червоно-ряба молочна порода, відтворна здатність, інбридинг, каріотип

KARYOTYPE VARIABILITY FOR THE COWS OF UKRAINIAN RED-AND-WHITE DAIRY CATTLE BREED WITH A VARYING DEGREE OF AFFINITY

V. V. Dzitsiuk, M. M. Peredriy

Institute of Animal Breeding and Genetics nd. a. M.V.Zubets of NAAS (Chubynske, Ukraine)

The paper describes the results of the research on the karyotype variability for the cows of Ukrainian Red-and-White dairy breed with a varying degree of affinity. The genomic type anomalies such as Aneuploidy and Polyploidy were discovered, as well as structural chromosome aberrations: fragments, breaks, chromosome associations. The highest level of aberrant cells was spotted for the closely related animals. The cows with disturbed reproductive ability contained genomic disorders and structural aberrations in their cells times more often than the cows with normal reproductive ability, regardless of the degree of their inbreeding. The analysis of genetic structure of the population by level of genetic risk showed the fact that the group with the least genetic risk was represented by the cows without disorders in their reproductive system. The cytogenetic research not only makes it possible to estimate the level of saturation with undesired chromosome aberration inside the given herd of Ukrainian Red-and-White dairy breed, but also it gives an ability to use the collected results to foresee the reproductive ability for the cows in their youth.

Keywords: Ukrainian Red-and-White dairy breed, reproductive ability, inbreeding, karyotype

КАРИОТИПИЧЕСКАЯ ИЗМЕНЧИВОСТЬ КОРОВ УКРАИНСКИЙ КРАСНО-ПЕСТРОЙ МОЛОЧНОЙ ПОРОДЫ РАЗНОЙ СТЕПЕНИ РОДСТВА

В. В. Дзицюк, Н. Н. Передрий

Институт разведения и генетики животных имени М.В.Зубца НААН (Чубинское, Украина)

В статье изложены результаты исследований кариотипической изменчивости коров украинской красно-пестрой молочной породы разного уровня родства. Обнаружили аномалии геномного типа (анеуплоидия и полиплоидия) и структурные aberrации хромосом (фрагменты, разрывы, ассоциации хромосом). Самый высокий уровень aberrантных клеток зафиксировано у близкородственных животных. У коров с нарушенной воспроизводительной способностью независимо от степени их инбридинга частота клеток, имеющих геномные нарушения и структурные aberrации, выше, чем у коров с воспроизводительной функцией в норме. Анализ генетической структуры популяции по уровню генетического риска показал, что в группе низкого генетического риска наибольшую долю составляют коровы без отклонений в репродуктивной системе. Цитогенетическое исследование коров позволяет не только оценить насыщенность нежелательными aberrациями хромосом данное стадо украинской красно-пестрой молочной породы, а и позволяет использовать полученные результаты для прогнозирования в раннем возрасте уровня репродуктивной способности коров.

Ключевые слова: украинская красно-пестрая молочная порода, воспроизводительная способность, инбридинг, кариотип

Вступ. У племінних стадах новостворених молочних порід в Україні застосовуються різні варіанти підбору тварин з метою подальшого удосконалення продуктивних, технологічних та відтворних якостей наступних поколінь потомства. Питання використання інбридингу в селекції великої рогатої худоби завжди цікавило науковців і селекціонерів-практиків. Проте інбридинг в конкретних ситуаціях дає неоднозначні результати. Часто використання близькоспорідненого парування призводить до поєднання можливих гетерозиготних носіїв небажаних генів. При цьому певна частина генів переходить в гомозиготний стан і проявляється фенотипово. У потомків гетерозиготних носіїв небажаних мутацій зникає маскувальна дія домінантних алелів, яка є причиною збереження і розповсюдження в популяції шкідливих рецесивних алелів. Аналогічно і з хромосомними aberrациями: в гетерозиготному стані негативна дія aberrації в одній з гомологічних хромосом може не проявитись. Однак із використанням близькоспорідненого парування зростає ймовірність переходу aberrації у гомозиготний стан. Хромосомні aberrації, на відміну від генних мутацій, за відсутності близькоспорідненого парування зустрічаються лише в гетерозиготному стані в поєднанні із нормальними хромосомами або іншими aberrациями. При інбридингу ж можливе утворення гомозиготних особин, що виявить у них дію небажаних хромосомних пошкоджень. В той же час збільшення гомозиготності у інбредних особин дає можливість консолідувати стадо за бажаними фенотиповими ознаками та стабілізувати спадковість певних генотипів [3, 4]. Тому для селекціонера важливо мати інформацію про розмах і складові генетичної мінливості, як додатковий критерій добору у підконтрольному йому стаді.

Метою наших досліджень була оцінка кариотипової мінливості корів-первісток української червоно-рябої молочної породи різного рівня спорідненості.

Матеріали і методи досліджень. Об'єктом досліджень було маточне поголів'я української червоно-рябої молочної породи, яке розводиться в ДП «ДГ «Христинівське» Інституту розведення і генетики тварин імені М.В.Зубца НААН. На основі аналізу матеріалів зоотехнічного обліку з комп'ютерної інформаційної системи управління молочним скотарством «Інтесел Орсек» відібрали корів з різним ступенем спорідненості (103 гол.), з яких 47% (49 гол.) отримані шляхом неспорідненого парування, 34% (35 гол.) – отримані із застосуванням віддаленого інбридингу і 14% (14 гол.) – помірного інбридингу. Методом кровозмішення отримано 5% (5 гол.) дослідженого поголів'я. Корови інбредні на бугаїв Бернато 359855968 (лінія Хановера), Май 5573 (лінія Імпрувера), Джупі 114386896 (лінія Чіфа).

Цитогенетичний аналіз виконали у відділі генетики і біотехнології Інституту розведення і генетики тварин імені М.В.Зубця НААН з використанням спеціальних методик і відповідного обладнання.

Зразки крові (5–10 мл) для цитогенетичного дослідження відбирали у корів з хвостової вени в стерильні шприци з розчином гепарину. Всю процедуру здійснювали з максимальним дотриманням стерильності. Зразки крові поміщали у термоконтейнер за температури 2–4⁰ С і передавали в лабораторію протягом 2–4 годин.

Для отримання препаратів хромосом використовували культуру лейкоцитів периферійної крові тварин. Короткострокову культуру готували за методом Moorhead et al [8]. Лімфоцити (0,5 мл) культивували 72 годин в середовищі RPMI-1640 (5 мл) з додаванням мітогену фітогемаглютинину (ФГА) і 15% аутологічної сироватки у термостаті за 37⁰С. За 2 години до завершення культивування в середовище додавали розчин колхіцину. Далі суспензію центрифугували (1000 об./хв., 10 хв.), інкубували в гіпотонічному розчині KCL (0,54%) протягом 50 хвилин, фіксували сумішшю етилового спирту з льодяною оцтовою кислотою (співвідношення 3:1) в такій послідовності: додавали нашаруванням фіксатор до клітинної суспензії, звільненої від гіпотонічного розчину, і витримували 90 хвилин за температури +4⁰С.

Потім суспензію центрифугували при 1000 об./хв. протягом 7 хвилин, відбирали супернатант, додавали фіксатор і ще раз центрифугували за тих же умов. Знову відбирали супернатант, додавали необхідну кількість свіжого фіксатора і розкапували суспензію на чисті охоложені предметні скельця. Препарати фарбували рутинно фарбником Гімза (Gimza Merk) і аналізували під мікроскопом Axiostar plus (Carl Zeiss, Німеччина).

В аналіз метафазних клітин включали такі цитогенетичні показники: частку анеуплоїдних і поліплоїдних клітин, частоту клітин з структурними абераціями хромосом (хромосомні розриви, фрагменти хромосом, асинхронне розщеплення центромерних районів хромосом – АРЦРХ). При підрахунку поліплоїдних клітин використовували як допоміжний прийом підрахунок статевих хромосом, кожна з яких відповідає одному гаплоїдному набору.

Биометричну обробку результатів досліджень проводили методами варіаційної статистики відповідно до Н. А. Плохинського [5] з використанням стандартного пакету прикладних статистичних програм, при цьому прийняті значення порогу достовірності різниці: *P > 0,95; **P > 0,99; ***P > 0,999.

Результати досліджень. В результаті аналізу препаратів хромосом у жодної корови не було виявлено грубих конституціональних аномалій хромосомного набору. В той же час вивчення неконституціональної каріотипової мінливості показало, що наряду із нормальними диплоїдними клітинами в культурі лімфоцитів певна їх частина має аномалії геномного типу і структурні аберації хромосом (табл. 1).

1. Каріотипова мінливість аутбредних та інбредних корів-первісток

Частота клітин Cell frequency	Варіанти підбору батьківських пар			
	аутбридинг (n = 49)	інбридинг / inbreeding		
		близький (n = 5)	помірний (n = 14)	віддалений (n = 35)
з абераціями	12,5 ± 0,40***	18,5 ± 0,62	11,8 ± 0,33***	12,1 ± 0,71 ***
анеуплоїдних	4,20 ± 0,70	4,90 ± 0,55	2,78 ± 0,72	2,50 ± 0,70
поліплоїдних	0,77 ± 0,32	0,41 ± 0,02	0,57 ± 0,20	0,86 ± 0,71
з розривами хромосом	3,35 ± 0,19*	5,50 ± 0,84***	2,35 ± 0,22*	2,31 ± 0,60***
з фрагментами хромосом	3,20 ± 1,74	3,90 ± 0,94	1,85 ± 0,33	2,86 ± 0,90
з АРЦРХ	3,06 ± 1,43	5,85 ± 0,74*	2,78 ± 0,49	2,36 ± 0,70*

Середній рівень абераційних клітин найвищим виявився у близькоспоріднених тварин, що вірогідно перевищує показники, відмічені у аутбредних корів на 6,0%, з віддаленим та помірним ступенем інбридингу – на 6,4 та 6,7 при P < 0,999 у всіх випадках (рис. 1).



Рис. 1. Частота клітин з абераціями у корів різного ступеня спорідненості

Частота анеуплоїдних клітин у близькоспоріднених первісток перевищує цей показник у аутбредних тварин з недостовірною різницею. Така ж недостовірна різниця за рівнем анеуплоїдних клітин виявлена і між аутбредними і інбредними особинами від помірнього і віддаленого ступеня спорідненості. Дещо вищу загальну частоту клітин з анеуплоїдією можна, очевидно, пояснити артефактним походженням, що пов'язано із технічними прийомами під час обробки культури і приготування препаратів хромосом. Встановлено, що маніпуляції, які проводяться під час приготування препаратів хромосом, зокрема перенесення на предметне скло клітин після їх культивування в гіпотонічному середовищі, може призводити до втрати частини хромосомного набору. В той же час втрата хромосом може мати і іншу природу і бути результатом елімінації пошкоджених хромосом.

Наявність індивідуальних відмінностей за даним показником, на думку окремих авторів, залежить від гормональних впливів, інші вважають, що існує зв'язок частоти виявлених анеуплоїдних клітин із продуктивними характеристиками тварин [3, 7, 10].

Частка поліплоїдних клітин у всіх досліджених корів не перевищує одного відсотку, що є нормою для великої рогатої худоби. Різниця між групами аутбредних і інбредних тварин недостовірна.

У структуру загальної оцінки генетичного вантажу в популяціях сільськогосподарських тварин входить інформативний цитогенетичний показник: частота і види аберацій хромосом. Аналізом хромосом на стадії метафази нами виявлені розриви хромосом, хромосомні і хроматидні пробіли, фрагменти хромосом і хроматид, несинхронність розходження хромосом у процесі мітозу і їх частоти появи (рис. 2).

Частота клітин з розривами хромосом в середньому коливається від 2,31% у клітинах корів з віддаленим до 5,50% у тварин з близьким інбридингом і різниця між цими показниками (3,19%) є статистично достовірною ($P < 0,999$), як і різниця між аутбредними і тваринами з помірним інбридингом ($P < 0,95$).

Різниця між аутбредними і інбредними тваринами за частотою клітин, де зустрічаються фрагменти хромосом, виявилась недостовірною.

Корови з типами інбридингу віддалений-близький за показником АРЦРХ (асинхронності розходження центромерних районів хромосом в кінці метафази) вірогідно різняться на 3,49% ($P < 0,95$), з меншим значенням у тварин, отриманих внаслідок віддаленого інбридин-

гу. В літературі зустрічаються припущення про тісний зв'язок АРЦРХ з механізмами формування анеуплоїдних клітин [1].

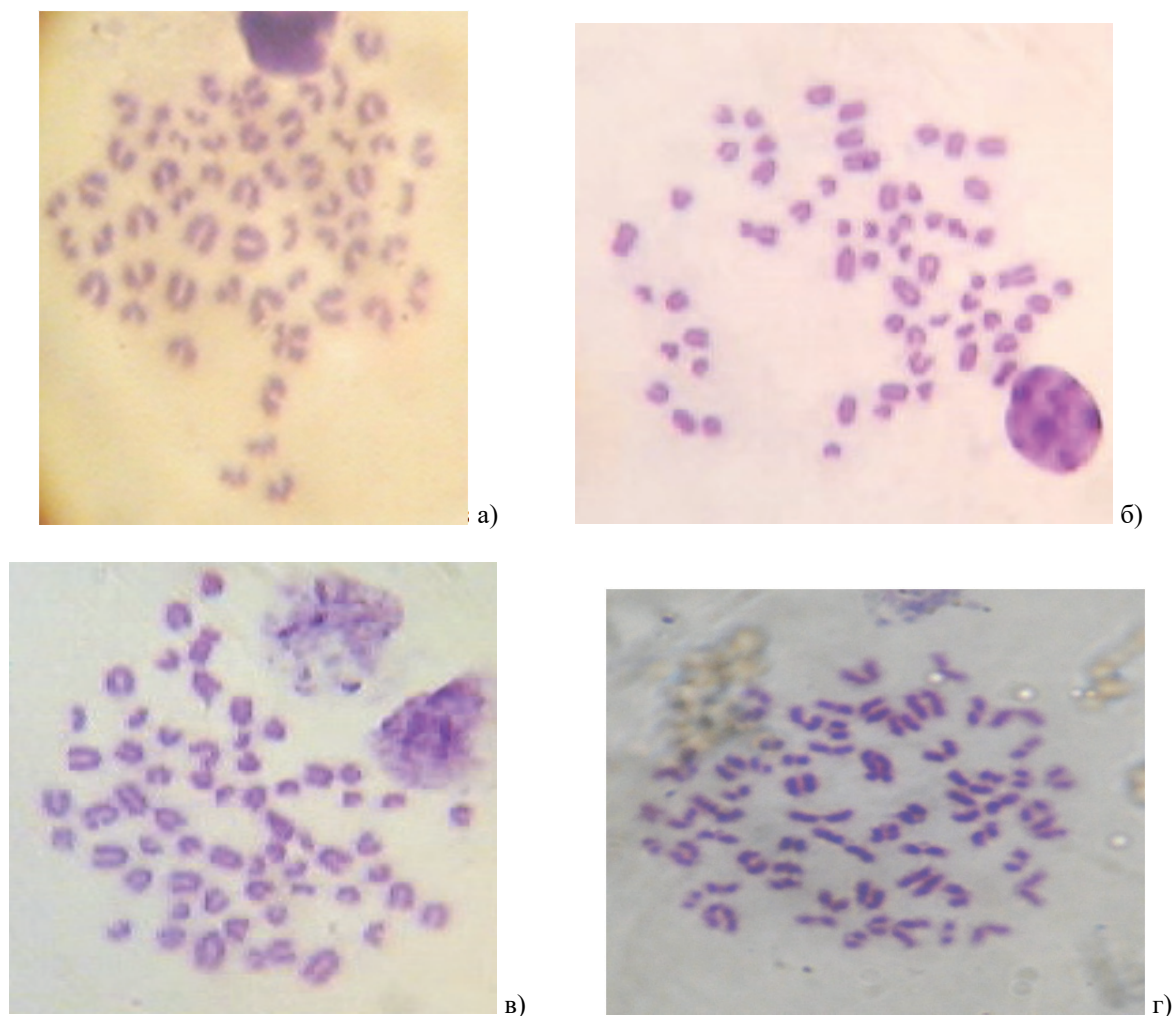


Рис. 2. Каріотиби корів української червоно-рябї молочної породи (ДП ДГ «Христинівське»): а, б) в нормі; в) містить хромосому з розривом; г) містить окремі фрагменти хромосом.
Збільшення: об. $\times 100$; ок. $\times 10$.

Для оцінки відтворної здатності у корів різного ступеню спорідненості сформували три групи з урахуванням функціональних порушень репродуктивної системи: I група – тварини з наявністю мертвонароджень і спонтанних викиднів, II група – корови з сервіс-періодом після першої лактації не менше 150 днів, III група – корови, у яких сервіс-період після першої лактації становив 51–90 днів (умовно контрольна група).

Із 103 досліджених за цитогенетичними показниками у корів різного ступеня спорідненості, до групи тварин з порушеною відтворною здатністю (I група) потрапили 24 корови (23,3% від дослідженого поголів'я) (табл. 2). Найбільшу частку в цій групі склали корови, отримані в результаті віддаленого інбридингу (11,6%). У групі корів із сервіс-періодом понад 150 днів найбільше було аутбредних особин (16,5%). У III групі (з сервіс-періодом у корів 50–90 днів) виявилось найбільше аутбредних корів і тварин, отриманих у результаті віддаленого інбридингу. Їх частки були однакові і склали по 8,7% кожна. Таким чином, залежності стану репродуктивної системи корів від їх спорідненості не встановлено.

У корів з порушеною відтворювальною здатністю, незалежно від ступеня їх спорідненості, частота клітин з хромосомами, що мають структурні аберації, на 4,2–3,5% більша ($P < 0,999$), ніж у корів з відтворювальною функцією в нормі. У межах кожної групи корів за

виявом відтворювальної здатності різниця у частоті хромосомних аберацій (ХА) між аутбредними і інбредними тваринами недостовірна.

2. Рівень хромосомних аберацій у групах корів з різною відтворювальною здатністю з урахуванням методів підбору батьківських пар

Групи корів	аутбридинг		інбридинг					
	число корів у групі, (% від загальної кількості досліджених корів)	клітин з ХА, %	близький		помірний		віддалений	
			частка корів у групі, %	клітин з ХА, %	частка корів у групі, %	клітин з ХА, %	частка корів у групі, %	клітин з ХА, %
I група (корови з порушеною відтворювальною здатністю)	6 (5,8%)	20,9 ± 0,8***	3 (2,91%)	23,3 ± 0,9	3 (2,91%)	20,4 ± 0,9	12 (11,6%)	21,9 ± 0,7
II група (сервіс-період більше 150 днів)	17 (16,5%)	17,4 ± 0,5***	1 (0,97%)	21,3 ± 0,7	5 (4,85%)	20,6 ± 0,2	14 (13,6%)	20,4 ± 0,3
III група (сервіс-період 50-90 днів)	9 (8,7%)	16,7 ± 0,4***	1 (0,97%)	18,9 ± 0,5	6 (5,8%)	17,9 ± 0,4	9 (8,7%)	17,1 ± 0,5

На основі характеристики каріотипової мінливості з урахуванням груп за відтворювальною здатністю аутбредних і інбредних корів оцінили за рівнем генетичного ризику: низький рівень генетичного ризику (НРГР), середній рівень генетичного ризику (СРГР) і високий рівень генетичного ризику (ВРГР) (рис. 3). Показники частоти геномних і хромосомних мутацій каріотипу виражають рівень загальної резистентності і потенціал реалізації життєво важливих функцій організму тварин.

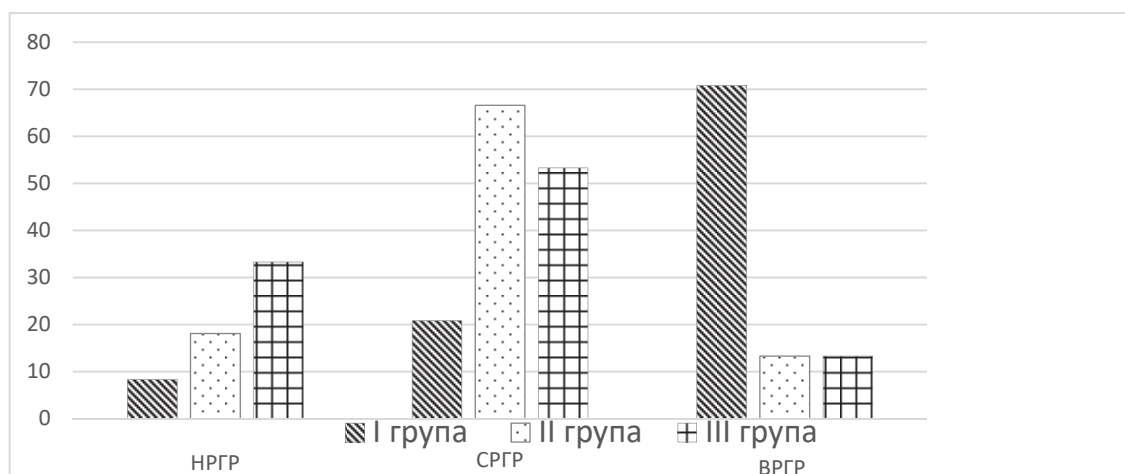


Рис. 3. Розподіл корів різного ступеня спорідненості за рівнем генетичного ризику. (умовні позначення на рисунку: НРГР – низький рівень генетичного ризику, СРГР – середній рівень генетичного ризику, ВРГР – високий рівень генетичного ризику)

Аналіз генетичної структури популяції червоно-рябої молочної породи показав, що у групі низького генетичного ризику найбільшу частку складають корови з сервіс-періодом 50–90 днів (III група). Корів з проблемами репродуктивної системи (I група) найбільше виявлено у групі високого генетичного ризику.

Висновки. Частота геномних і структурних порушень каріотипу, які виявлені у корів української червоно-рябої молочної породи, достатньо об'єктивно відображають стан їх репродуктивної системи. Цитогенетичне дослідження корів української червоно-рябої молоч-

ної породи дозволяє не лише оцінити насиченість популяції небажаними показниками каріо-типової нестабільності, а і дає змогу використати отримані результати для прогнозування рівня репродуктивної здатності корів у ранньому віці.

Вдячності. Автори статті висловлюють щиру вдячність керівнику фермерського господарства «Бах і сім'я» Бах Наталії Сергіївни за допомогу в проведенні цитогенетичних досліджень овець романівської породи.

БІБЛІОГРАФІЯ

1. Кленовицкий, П. М. Влияние генетических и средовых факторов на кариотип и распространенность хромосомных аномалий у сельскохозяйственных животных – автореф. дис. ... д-ра биол. наук. – М. : Дубровицы, 1997. – 38 с.

2. Бакай, Ф. Р. Анеуплоидия у голштинизированного крупного рогатого скота в связи с показателями воспроизводительной способности / Ф. Р. Бакай, А. С. Семёнов // Естественные науки. Журнал фундаментальных и прикладных исследований. – Астрахань. – 2009. – № 2. – С. 189–191.

3. Кузнецов, В. М. Инбридинг в животноводстве: методы оценки и прогноза / В. М. Кузнецов. – Киров, НИИСХ Северо-Востока, 2000. – 66 с.

4. Некрасов, Д. Типы спаривания с учетом инбридинга и пожизненная молочная продуктивность коров / Д. Некрасов, О. Зеленовский // Молочное и мясное скотоводство. – 2004. – № 5. – С. 19–21.

5. Плохинский, Н. А. Руководство по биометрии для зоотехников / Н. А. Плохинский. – М. : Колос, 1969. – 256 с.

6. Vig, B. K. Sequence of centromere separation: occurrence, possible significance and control. *Cancer Genet. Cytogenet.* – 1983. – Vol. 8. – № 3. – P. 249–274.

REFERENCES

1. Klenovickij, P. M. 1997. *Vlijanie geneticheskikh i sredovyh faktorov na kariotip i rasprostranennost' hromosomnyh anomalij u sel'skohozjajstvennyh zhivotnyh – Influence of genetic and environmental factors on karyotype and prevalence of chromosomal abnormalities in farm animals.* Avtoreferat dis. ... doktora nauk – Abstract of the dis. ... doctors of science. Moscow, 38 (in Russian).

2. Bakaj, F. R. 2009. Aneuploidija u golshтинizirovannogo krupnogo rogatogo skota v svjazi s pokazateljami vosproizvoditel'noj sposobnosti – Aneuploidy in Holsteinized cattle in connection with indicators of reproductive. *Estestvennye nauki. Zhurnal fundamental'nyh i prikladnyh issledovanij. Astrahan' – Natural Sciences. Journal of Fundamental and Applied Research.* Astrakhan. 2:189–191 (in Russian).

3. Kuznecov, V. M. 2000. *Inbriding v zhivotnovodstve: metody ocenki i prognoza – Inbreeding in Animal Husbandry: Methods of Assessment and Forecasting.* Kirov, NIISH Severo-Vostoka, 66 (in Russian).

4. Nekrasov, D. 2004. Tipy sparivanija s uchetom inbridinga i pozhiznennaja molochnaja produktivnost' korov – Types of mating with inbreeding and lifelong dairy productivity of cows. *Molochnoe i mjasnoe skotovodstvo. – Dairy and beef cattle.* 5:19–21.

5. Plohinskij, N. A. 1969. *Rukovodstvo po biometrii dlja zootehnikov – Guide to Biometrics for livestock.* Moscow : Kolos, 256 (in Russian).

6. Vig, B. K. 1983. Sequence of centromere separation: occurrence, possible significance and control. *Cancer Genet. Cytogenet.* 8(3):249–274.

