

5. Kalendar' R.N. 1994. Komp'yuternaya prohramma dlya postroenyaya evolyutsyonnykh derevev na osnove elektroforehramm DNK y belkov. Materyaly konferentsyy «Molekulyarno-henetycheskiye markery v selektsii rastenyu». Kyev. V 25-26, 187-196
6. Tamura K. J. Dudley, M. Nei, S. Kumar. 2004. MEGA 4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0/Molecular Biology and Evolution. V. 24, 1596-1599.
7. Plokhynskyy N.A. 1969. Byometrya. M.: «Kolos», 368 (in Russian).
8. O.I. Metlyts'ka, Yu. V. Subota, S.I. Taran, K.V. Kopylova. 2012. Henetychni osoblyvosti vnutrishnotypovoy i strukturyzatsiyi bdzholnykh simey ukrayins'koyi porody. Zbirnyk naukovykh prats PDATU. V. 20, 180-182 (in Ukraine).
9. Kozhukhova N.Э., Varenyk B.F., Syvolap Yu.M. 2005. Prohnozyruyushchyy potentsyal DNK – markerov v heterozyznoy selektsyy kukuruzy. Tsytolohyya y henetyka. V39, 14-20. (in Russian).
10. Papp V. V. , S. S. Kerek, E. I. Keyl . Pogliblene vivchennya deyakih morfologichnih oznak karpatskih bdzhil, Yih porodna charakteristika ta diferentsiatsiya za dopomogoyu programnogo zabezpechennya «Beemorph». Silskiy gospodar. 2013. 11–12. p 25–31.; 2014. 1–2. p. 35–37. (in Ukrainian)

УДК 636.27.034.084.4:576.316.7 (477)

КАРІОТИПОВА МІНЛИВІСТЬ КОРІВ УКРАЇНСЬКОЇ ЧЕРВОНО-РЯБОЇ МОЛОЧНОЇ ПОРОДИ З РІЗНОЮ ВІДТВОРНОЮ ЗДАТНІСТЮ

М. М. ПЕРЕДРІЙ¹, В. В. ДЗІЦЮК²

¹ДП ДГ “Христинівське” Інституту розведення і генетики тварин імені М.В. Зубця НААН (Христинівка, Україна)

²Інститут розведення і генетики тварин імені М.В. Зубця НААН (Чубинське, Україна)
dzitsiuk@yandex.ua

В статті наведені результати цитогенетичного дослідження корів української червоно-рябої молочної породи з різною відтворною здатністю. Культивування лімфоцитів, приготування цитогенетичних препаратів, класифікація та облік аберацій хромосом здійснювали за загальноприйнятими методиками. У каріотипах тварин із порушеною відтворною здатністю виявлено достовірно більшу частоту клітин з анеуплоїдним і поліплоїдним наборами хромосом, а також клітин із хромосомними абераціями, ніж у корів з нормальними репродуктивними функціями. Встановлено, що у всіх досліджених тварин існує позитивний кореляційний зв'язок між сервіс-періодом і основними цитогенетичними показниками. Отримані результати досліджень дають підставу використовувати показники каріотипової мінливості в якості критерію оцінки репродуктивних характеристик корів молочного стада.

Ключові слова: цитогенетичне дослідження, хромосоми, аберації, відтворна здатність корів, сервіс-період

KARYOTYPE VARIABILITY OF THE COWS OF UKRAINIAN RED-AND-WHITE DAIRY CATTLE BREED WITH VARIED REPRODUCTIVE ABILITY

M. M. Peredry¹, V. V. Dzitsiuk²

¹ State Enterprise Research Farm «Khrystynivka» (Khrystynivka, Ukraine)

² Institute of Animal Breeding and Genetics n.d.a. M.V. Zubets of NAAS (Chubynske, Ukraine)

The article describes the results of cytogenetic research on the cows of Ukrainian Red-and-White dairy cattle breed with varied reproductive ability. The cultivation of lymphocytes, preparing the cytogenetic samples, classification and registration of chromosome aberrations were held using conventional methods. The karyotypes of the animals with impaired reproductive ability revealed significantly greater frequency of cells with aneuploid and polyploid sets of chromosomes, as well as the cells having chromosome aberrations, compared to the cows with normal reproductive functions.

It was stated that all studied animals have a positive correlation between the service period and the major cytogenetic indicators. The obtained results give the reason to use indicators of karyotype variability as a criterion for assessing the reproductive performance of milk herd cows.

Keywords: cytogenetic research, chromosomes, aberrations, reproductive ability of cows, service period

КАРИОТИПИЧЕСКАЯ ИЗМЕНЧИВОСТЬ КОРОВ УКРАИНСКОЙ КРАСНО-ПЕСТРОЙ МОЛОЧНОЙ ПОРОДЫ С РАЗНОЙ ВОСПРОИЗВОДИТЕЛЬНОЙ СПОСОБНОСТЬЮ

Н. Н. Передрий¹, В. В. Дзицюк²

¹ГП ОХ “Христиновское” Института разведения и генетики животных имени М.В.Зубца НААН (Христиновка, Украина)

²Институт разведения и генетики животных имени М.В. Зубца НААН (Чубинское, Украина)

В статье приведены результаты цитогенетического исследования коров украинской красно-пестрой молочной породы с разной воспроизводительной способностью. Культивирование лимфоцитов, приготовление цитогенетических препаратов, классификация и учет aberrаций хромосом осуществляли по общепринятым методикам. В кариотипах животных с нарушенной воспроизводительной способностью выявлено достоверно большую частоту встречаемости клеток с анеуплоидным и полиплоидным наборами хромосом, а также клеток с хромосомными aberrациями, чем у коров с нормальными репродуктивными функциями. Установлено, что у всех исследованных животных существует положительная коррелятивная связь между сервис-периодом и основными цитогенетическими показателями. Полученные результаты исследований представляют возможность использовать показатели кариотипической изменчивости в качестве критерия оценки репродуктивных характеристик коров молочного стада.

Ключевые слова: цитогенетическое исследование, хромосомы, aberrации, воспроизводительная способность коров, сервис-период

Інтенсивний розвиток молочного скотарства передбачає зростання валового виробництва молока за рахунок підвищення його генетичного потенціалу. Селекція, спрямована на ріст продуктивності, призводить до посилення обмінних процесів в організмі тварини і наближає її до межі фізіологічних можливостей, що обумовлює хромосомну нестабільність і як наслідок збільшення ризиків мутагенезу [1, 2, 6]. Відомо, що генетичний вантаж популяцій тварин представлений широким спектром не тільки генних мутацій, а і aberrаций хромосом, які поділяються на кількісні зміни в каріотипі – анеуплоїдії (поліплоїдія, гіперплоїдія, гіпоплоїдія) і структурні перебудови (транслокація хромосом, інверсії, делеції, нестачі, дуплікації та ін.) Надлишок або нестача хромосом у тварини, як правило, призводить до загибелі ембріона на ранніх стадіях розвитку. Винятки становлять носії моносомії, трисомії і деяких інших варіантів анеуплоїдії за статевими хромосомами, які виживають, але є безплідними. Живі носії структурних перебудов хромосом часто не мають виражених фенотипових відхилень. Проте в гаметогенезі у них формуються статеві клітини з незбалансованим набором хромосом, що призводить до появи генетичного браку та особин з різним ступенем пошкодження генотипу [9].

Оптимальним шляхом діагностування спадкових мутаційних змін і їх наслідків є цитогенетичний моніторинг каріотипової мінливості. Якщо раніше цитогенетичні дослідження мали на меті вивчення лише нормального каріотипу, то нині цитогенетики поступово скеровують пріоритет своїх досліджень до вивчення каріотипових аномалій, їх частоти і зв'язку з життєво важливими функціями організму тварин. Саме цитогенетичні методи, на думку багатьох вчених, є провідними для вивчення мутагенності різних чинників і їх наслідків у тваринництві [5, 6, 7].

Рання цитогенетична оцінка тварин дає змогу виявити шкідливі мутації, які можуть негативно впливати на продуктивні і відтворні якості. Порушення відтворної здатності корів ви-

являється часто і, як правило, до них відносять збільшення тривалості сервіс-періоду, виникнення порушень ембріонального розвитку, мертвонародження і викидні. Дослідження каріотипу і ретельний аналіз спадкової інформації маточного поголів'я стад допоможе встановити і усунути причину репродуктивних збоїв корів.

Метою дослідження є вивчення каріотипової мінливості корів з нормальними і порушеними відтворними якостями.

Матеріали і методи дослідження. Матеріалом для досліджень були результати індивідуальної оцінки тварин української червоно-рябої молочної породи ДП ДГ «Христинівське» за матеріалами зоотехнічного обліку та експериментальними цитогенетичними даними. Для аналізу даних зоотехнічного обліку використовували пакет програм СУМС «Інтесел Орсек». Лабораторні дослідження провели в лабораторії біотехнології Інституту розведення і генетики тварин імені М.В. Зубця. Аналіз каріотипу здійснили у 75 корів.

Для проведення цитогенетичних досліджень у корів відбирали кров з хвостової вени в стерильні шприци з розчином гепарину. Короткострокову культуру готували за методом Moorhead et al [8]. Культивування клітин проводили протягом 72 годин в термостаті за 37 ° С. Далі суспензію центрифугували (1000 об/хв, 10 хв), інкубували в гіпотонічному розчині КСЛ (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 +4 ° С.

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 охолоджені предметні скельця. Препарати фарбували фарбником Гімза (Gimza Merk).

В аналіз метафазних клітин включали 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.

Аналіз відтворної здатності здійснювали за показниками: тривалість сервіс-періоду і міжотельного періоду, індексом осіменіння, частотою мертвонароджень і абортів.

Біометричну обробку результатів досліджень проводили методами варіаційної статистики відповідно до Н. А. Плохинського [4], Г. Ф. Лакина [3] з використанням стандартного пакету прикладних статистичних програм.

Результати досліджень. Для цитогенетичного дослідження за матеріалами зоотехнічного обліку сформували три групи корів залежно від показників їх відтворної здатності: I група, чисельністю 17 голів складається з тварин з порушеною відтворною здатністю. До II групи включили 33 корови, сервіс-період яких складає не менше 150 днів; III група – 25 корів із сервіс-періодом 51–90 днів.

Дослідження лімфоцитів крові корів з різною відтворною здатністю виявили різницю у рівні хромосомної нестабільності. Під хромосомною нестабільністю розуміють порушення у геномному апараті клітини у вигляді неспецифічних хромосомних аберацій, які виникають, як правило, в процесі поділу клітини (мітози чи мейозі). Проявляється хромосомна нестабільність у виникненні різних хромосомних аномалій, зокрема анеуплоїдії, поліплоїдії, розривів хромосом та хромосомних асоціацій.

Із форм числових порушень хромосом найчастіше виявляється анеуплоїдія. Аналіз кількості анеуплоїдних клітин у тварин з різною відтворною здатністю показали, що достовірно більша частка клітин з анеуплоїдією зустрічається в каріотипі тварин I групи, тобто у тварин з порушеною відтворною здатністю – 10,5±2,38 % (таблиця).

У корів II групи частота клітин з анеуплоїдним числом хромосом у клітинах крові знизилась до 6,3±1,45%. Менша майже вдвічі в корів цієї групи і частота клітин з поліплоїдним

набором хромосом (з $1,0 \pm 0,01$ до $0,45 \pm 0,16$) і на 15% зі структурними абераціями хромосом (з $14,82 \pm 2,87$ до $12,5 \pm 2,87$).

У корів III групи (з нормальною відтворною здатністю) клітин з анеуплоїдним хромосомним набором виявлено в 2,3 рази менше, ніж у корів з порушеною відтворною здатністю (I група) ($P > 0,999$).

Частота геномних і структурних аберацій у корів з різною відтворною здатністю

Групи тварин	n	Клітин з аберацями наборами хромосом, %		
		анеуплоїдних	поліплоїдних	зі структурними абераціями
I група	17	$10,5 \pm 2,38$	$1,0 \pm 0,01$	$14,82 \pm 2,87$
II група	33	$6,3 \pm 1,45$	$0,45 \pm 0,16$	$12,5 \pm 2,87$
III група	25	$4,46 \pm 0,73$	$0,17 \pm 0,18$	$10,67 \pm 3,28$

Анеуплоїдія у корів всіх досліджених груп формувалась, в основному, за рахунок гіпоплоїдних клітин (91,59%) за незначної частки гіперплоїдних клітин (8,41%). Вважається, що основним джерелом утворення анеуплоїдних клітин є нерозходження хромосом в мітозі, гіпоплоїдію наряду з нерозходженням хромосом може спричинити відставання хромосом в анафазі та елімінація аберацями хромосом. Підвищений рівень анеуплоїдії у тварин з порушеною відтворною функцією пов'язаний, очевидно, зі збоєм метаболічних процесів у тварини внаслідок патологічних процесів, що негативно вплинули на формування і реалізацію репродуктивної здатності.

Аналіз поліплоїдних клітин свідчить про достовірну різницю в їх частоті між першою ($1,0 \pm 0,01$) і другою та третьою групами корів ($0,45 \pm 0,16$ і $0,17 \pm 0,18$ відповідно) ($P > 0,99$). Існує багато думок і гіпотез щодо ролі і причин появи поліплоїдних клітин в соматичних клітинах тварин. Поліплоїдія є збільшенням кількості ДНК в клітині – одного із показників посиленої метаболічної активності, яка може відобразитись на синтезі РНК і білку в поліплоїдній клітині порівняно з диплоїдною. Стотиссотково поліплоїдні ембріони у великої рогатої худоби відмирають на ранніх стадіях онтогенезу. У мозаїчній формі поліплоїдні клітини різної плоїдності ($3n$, $4n$ і більше) виявляються досить часто. Уявлення про поліплоїдні клітини як форми клітинної дегенерації, які існували раніше, нині переглянуті внаслідок проведених останнім часом досліджень. Досліджено, що підвищену частку поліплоїдних клітин виявляли у крові тварин, хворих на лейкоз. І тому, на думку вчених, підбір тварин з урахуванням стабільності каріотипу може сприяти ефективності заходів, спрямованих на викорінення лейкозу великої рогатої худоби. Багатьма роботами доведена наявність значно вищого рівня поліплоїдних клітин у тварин м'ясного напрямку продуктивності порівняно з тваринами молочного, причому існує достовірний зв'язок між їх кількістю і мірою гіпертрофії м'язів. Є підстави припускати, що поява певної кількості поліплоїдних клітин пов'язано із відновними процесами, регенерацією, функціональною активністю органів і тканин.

Серед вивчених груп виявлені значні відмінності у частоті аберацій хромосом, серед яких у більшості випадків спостерігались розриви і пробіли, зокрема хроматидні пробіли, хромосомні і хроматидні розриви та делеції і утворені внаслідок цього фрагменти генетичного матеріалу. Слід відмітити, що в каріотипах корів, які досліджували, ми не виявили конституціональних перебудов хромосом, в тому числі і транслокацій Робертсонівського типу. У тварин I групи частота хромосомних аберацій виявилась на третину вищою аналогічного показника тварин II і III груп. Різниця частот між вищим і нижчим груповим значенням цього показника склала 4,15%.

В ході аналізу каріотипів тварин всіх груп зустрічались корови, у яких не виявлено жодних хромосомних аберацій, так і тварини, в клітинах крові яких містилась висока частка аномальних клітин (від 0,00 до 19,24%). Тому, очевидно, слід говорити про індивідуальну характеристику корів, оскільки тварини з нормальними репродуктивними даними можуть мати

іноді високі значення окремих цитогенетичних аномалій. І, навпаки, за невисоких значень окремих цитогенетичних аномалій можна зустріти чітку репродуктивну патологію. Стабільність хромосомного апарату контролюється багатьма генами, зокрема і имми, продукти яких беруть участь у процесах репарації [10]. Очевидно, що саме складність цієї ознаки перебуває в основі індивідуальної каріотипової мінливості.

Для успішної селекції за певною ознакою важливо встановити величину і напрям зв'язку між ознаками. Нами були визначені коефіцієнти кореляції між тривалістю сервіс-періоду та окремими показниками каріотипової нестабільності (рисунок).

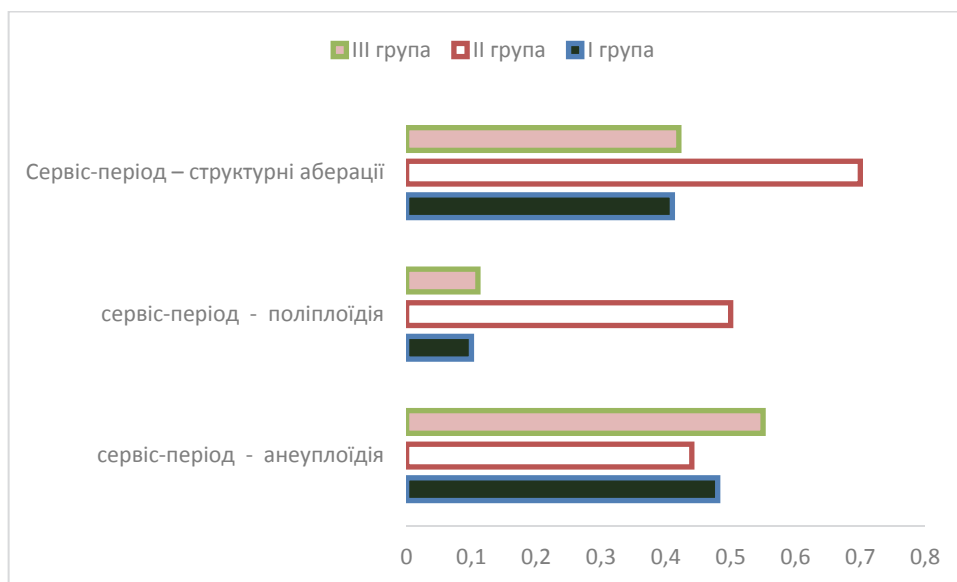


Рис. Кореляція між сервіс-періодом і показниками каріотипової нестабільності

Встановлено, що у всіх групах досліджених тварин існує позитивний кореляційний зв'язок між сервіс-періодом і основними цитогенетичними показниками. Найвищі додатні значення кореляції ($r = 0,70$; $r = 0,50$; $r = 0,44$) встановлені між тривалістю сервіс-періоду і частотою структурних аберацій, сервіс-періодом і поліплоїдією, сервіс-періодом і анеуплоїдією відповідно у корів II групи, у яких сервіс-період тривав 150 днів і більше. У корів I групи найвища позитивна кореляція ($r = 0,48$) встановлена між тривалістю сервіс-періоду і анеуплоїдією. Для III групи, визначеної нами як контрольної, теж встановлений позитивний зв'язок ($r = 0,55$) між сервіс-періодом і анеуплоїдією.

Таким чином, встановлені кореляції між рівнем каріотипової нестабільності і однією із характеристик відтворної здатності (сервіс-періодом) свідчать, що рівні каріотипової нестабільності у корів в достатній мірі можуть характеризувати їх відтворні якості. Результати досліджень доводять, що вища частота аномальних клітин зустрічається переважно у корів з порушеними відтворними функціями. Отже, можна зробити висновок, для оцінки індивідуальних якостей корів молочного стада показники каріотипової нестабільності доцільно використовувати як критерій оцінки відтворних якостей корів.

БІБЛІОГРАФІЯ

1. Качура, В. С. Хромосомные нарушения у крупного рогатого скота (*Bos taurus* L.) / В. С. Качура // Цитология и генетика. – 1982. – Т. 16, № 4. – С. 60–71.
2. Жигачев, А. И. Цитогенетический контроль быков / А. И. Жигачев // Зоотехния. – 1989. – № 6. – С. 24–26.
3. Лакин, Г. Ф. Биометрия : учеб. пособие для биолог. спец. вузов – 4-е изд., перераб. и доп. / Г. Ф. Лакин. – М. : Высш. шк., 1990. – 352 с.

4. Плохинский, Н. А. Руководство по биометрии для зоотехников / Н. А. Плохинский. – М. : Колос. – 1969. – 256 с.
5. Bongso, T. A. Prenatal diagnosis of sex in cattle by amniocentesis / T. A. Bongso, P. K. Basrur // *Vet. Rec.* – 1975. – Vol. 9. – N. 6. – P. 124–126.
6. Gustavsson, I. Chromosome aberrations and their influence on the reproductive performance of domestic animals : a review / I. Gustavsson // *Z. Tierzuchtg. Zuchtgsbiol.* –1980. – N. 97. – P. 176–195.
7. Jannuzzi, L. Methodologies applied on domestic animal chromosomes. From Methods in Artificial Mammalian Chromosomes / V. Sgaramella, S. Eridani (eds) // *Molecular Biology.* – 2003. – Vol. 240. – P. 15–34.
8. Chromosome preparations of leucocytes cultured human peripheral blood / P. S Moorhead, P. C. Nowell, W. J. Mellman, D. M. Batipps, D. A. Hungerford // *Exp. Cell Res.* – 1960. – N. 20. – P. 613–616.
9. Cytogenetic monitoring of farm-animals under conditions of environmental-pollution / J. Rubes, L. Borcovec, Z. Horinova, J. Urbanova, I. Prorokova, L. Kulikova // *Mutation Res.* – 1992. – №. 283. – P. 199–210.
10. Samper, E. Mitochondrial oxidative stress causes chromosomal instability of mouse embryonic fibroblasts / E. Samper, D. G. Nicholls, S. Melov // *Aging Cell.* – 2003. – №. 2. – P. 277–285.

REFERENCES

1. Kachura, V. S. 1982. Hromosomnye narusheniya u krupnogo rogatogo skota (*Bos taurus* L.) – Chromosomal abnormalities in cattle (*Bos taurus* L.). *Citologija i genetika.* – *Cytology and Genetics.* 16(4):60–71 (in Russian).
2. Zhigachev, A. I. 1989. Citogeneticheskij kontrol' bykov – Cytogenetic control of the bulls. *Zootehnija – Animal husbandry.* 6: 24–26 (in Russian).
3. Lakin, G. F. 1990. Biometrija: Ucheb. posobie dlja biolog. spec. vuzov – 4-e izd., pererab. i dop. – Biometrics: Proc. Benefit for the biologist. specialist. high schools. M. : Vyssh. shk., 352 (in Russian).
4. Plohinskij, N. A. 1969. Rukovodstvo po biometrii dlja zootehnikov – Guide to Biometrics for livestock. M. : Kolos. 256 (in Russian).
5. Bongso, T. A., and P. K. Basrur. 1975. Prenatal diagnosis of sex in cattle by amniocentesis. *Vet Rec.* 9(6): 124–126 (in Russian).
6. Gustavsson, I. 1980. Chromosome aberrations and their influence on the reproductive performance of domestic animals – a review. *Z. Tierzuching.* 97 :176–195.
7. Jannuzzi, L. 2003. Methodologies applied on domestic animal chromosomes. From Methods in Molecular Biology, vol. 240: Artificial Mammalian Chromosomes, V. Sgaramella, S. Eridani (eds), Humana Press, Totowa, NJ, 15–34.
8. Moorhead, P. S., P. C. Nowell, W. J. Mellman, D. M. Batipps, and D. A. Hungerford, 1960. Chromosome preparations of leucocytes cultured human peripheral blood. *Exp. Cell Res.* 20: 613–616.
9. Rubes, J. L. Borcovec, Z. Horinova, J. Urbanova, I. Prorokova, and L. Kulikova. 1992. Cytogenetic monitoring of farm-animals under conditions of environmental pollution. *Mutation research. Mutation research letters.* 283:199–210.
10. Samper, E., D. G. Nicholls, and Melov S. 2003. Mitochondrial oxidative stress causes chromosomal instability of mouse embryonic fibroblasts. *Aging Cell.* 2:277–285.