https://doi.org/10.15407/animbiol24.04.017
UDC 636.2.034:576.316
Received 13.07.2022 ▪ Revision 05.10.2022 ▪ Accepted 19.11.2022 ▪ Published online 30.12.2022

Хромосомна нестабільність чистопородних і кросбредних корів молочного напряму продуктивності

В. В. Дзіцюк[1], Л. Ф. Стародуб[1], Т. М. Димань[2]
valentynadzitsiuk@gmail.com

[1]Інститут розведення і генетики тварин імені М. В. Зубця НААН,
вул. Погребняка, 1, с. Чубинське, Бориспільський р-н, Київська обл., Україна
[2]Білоцерківський національний аграрний університет,
пл. Соборна, 8/1, м. Біла Церква, Київська обл., 09117, Україна

Викладено результати досліджень мінливості каріотипових ознак чистопородних і кросбредних корів молочного напряму продуктивності. Матеріалом для досліджень слугували проби периферійної крові чистопородних корів-первісток української червоно-рябої молочної і української чорно-рябої молочної порід, а також кросбредних корів, отриманих від схрещування корів української червоно-рябої молочної породи з бугаями монбельярдської (ДП «ДГ «Нива» Інституту розведення і генетики тварин імені М. В. Зубця НААН»). Приготування цитогенетичних препаратів, аналіз морфології, ідентифікацію і класифікацію аберацій хромосом здійснювали за загальноприйнятими методиками. Аналіз клітин проводили під мікроскопом *Axiostar plus* (*Carl Zeiss*, Німеччина) з імерсійним збільшенням у 1000 разів та мікрофотографували. В усіх дослідженнях як параметри хромосомної нестабільності визначали частоту аберантних метафаз і спектр хромосомних аберацій. Враховували ознаки: частоти анеуплоїдних і поліплоїдних клітин, клітин із передчасним розходженням центромерних районів хромосом (ПРЦХ), клітин зі структурними аберраціями хромосом (розриви, фрагменти і асоціації негомологічних хромосом). У результаті аналізу каріотипів корів-первісток чистопородного і кросбредного походження встановлено, що частка диплоїдних клітин у нормі становить в середньому 85%; решта, майже 15% — соматичні клітини із числовими і структурними аномаліями. У кросбредних корів встановлено вірогідно вищі частоти ($P<0,001$) анеуплоїдних (у півтора рази), поліплоїдних (на 27%), структурних аберацій хромосом (на 20%) порівняно з чистопородними коровами українських червоно-рябої і чорно-рябої молочних порід. Клітин, що містять хромосоми з розривами і фрагментами, на 15–20% більше виявили теж у помісних первісток. Результати цитогенетичного дослідження вказують на більшу хромосомну нестабільність кросбредних корів порівняно з чистопородними. Однією із причин цього явища може бути вплив методів розведення, зокрема кросбридинг.

Ключові слова: чистопородні і кросбредні корови, цитогенетичні дослідження, каріотип, аберації хромосом, хромосомна нестабільність

Цитогенетичні дослідження дозволяють подивитись на геном у цілому: виявити число хромосом і описати їх морфологію, діагностувати небажані аберації і рівень хромосомної нестабільності, який є чинником природної мінливості. Хромосомна нестабільність або неспецифічні порушення каріотипу — це тип нестабільності геному, що охоплює зміни генетичної інформації на рівні хромосом [1]. Хромосомна нестабільність трапляється в будь-якому організмі, навіть, у генетично здорових тварин і в невеликій кількості не спричинює порушень їх життєдіяльності [6]. Велика кількість хромосомних аномалій свідчить про порушення генетичного апарату, що призводить до збою репродуктивної і продуктивної функції тварини, а також може бути причиною хвороб чи фенотипових змін.

Хромосомна нестабільність може бути наслідком як природної мінливості, так і впливу екологічних чинників — таких, як радіаційне чи хімічне ураження, наявність паразитів в організмі, антибіотики, віруси чи вакцини [2]. У літературі є повідомлення про високий рівень хромосомної нестабільності у високопродуктивних тварин як частини посиленого метаболізму на клітинному рівні [10].

Зокрема, тривають дискусії з приводу впливу методів розведення сільськогосподарських тварин на стабільність їх каріотипу [9]. Однак досі ще залишаються недостатньо вивченими цитогенетичні характеристики особин, залучених до селекційного процесу, зокрема до міжвидового і міжпородного схрещування.

У зв'язку з цим, актуальними є дослідження цитогенетичної структури тварин, отриманих в результаті різних селекційних методів, зокрема кросбридингу.

Матеріали і методи

Дослідження провели у відділі генетики і біотехнології тварин Інституту розведення і генетики тварин імені М. В. Зубця НААН та у ДП «ДГ «Нива» цього ж Інституту.

Матеріалом для досліджень периферійної крові чистопородних корів-первісток української червоно-рябої молочної (УЧеРМ) і української чорно-рябої молочної (УЧРМ) порід, а також кросбредних корів, отриманих від схрещування корів української червоно-рябої молочної породи з бугаями монбельярдської (УЧеРМ×М).

Для приготування препаратів хромосом цільну венозну кров культивували впродовж 48 годин за температури +37ºС у середовищі RPMI 1640 (*Sigma*, США) з додаванням 0,1 мл/мл ФГА (фітогемаглютинин, *Sigma*, США) і 15% ембріональної телячої сироватки. За дві години до закінчення терміну культивування для припинення ділення клітин вносили колхіцин (*Serva*, Німеччина). Центрифугуванням отримували осад клітин, який обробляли гіпотонічним розчином KCl (0,075 М) впродовж 20 хв. Фіксацію клітин здійснювали у трьох змінах суміші метанол-оцтової кислоти у співвідношенні 3:1. Отриману в останній порції фіксатора клітинну суспензію бажаної густини краплями наносили на охолоджене зволожене предметне скло.

Для рутинного фарбування хромосом використовували 2%-ний розчин Гімза (*Merk*, Німеччина). Аналіз метафаз проводили під мікроскопом *Axiostar plus* (*Carl Zeiss*, Німеччина) з імерсійним збільшенням у 1000 разів та фотографували.

Статистичну обробку експериментальних даних здійснювали за допомогою *Microsoft Office Excel 2003*.

Результати й обговорення

У результаті аналізу каріотипів корів-первісток чистопородного і кросбредного походження встановлено, що частка диплоїдних клітин у нормі (у великої рогатої худоби нормою є 2n=60, XY; 2n=60, XX) становить в середньому 85%. Решта, майже 15% — соматичні клітини з різними порушеннями у каріотипі: зі зміною числа хромосом чи структурними аберраціями. Аналіз препаратів хромосом у досліджених тварин виявив анеуплоїдні, поліплоїдні клітини, структурні порушення хромосом у вигляді розривів, пробілів і фрагментів, асоціації негомологічних хромосом, а також частку клітин із передчасним розходженням центромерних районів хромосом, тобто із несинхронністю мітотичного поділу (ПРЦХ) (табл.).

Анеуплоїдні клітини трапляються з різною частотою у тварин усіх досліджених груп. У складі анеуплоїдних клітин гіпоплоїдні і гіперплоїдні клітини виявили приблизно з однаковою кількістю, тобто у цьому дослідженні анеуплоїдія є істинною, а не результатом методичних огріхів у приготуванні препаратів хромосом. Найбільше анеуплоїдних клітин зафіксовано у кросбредних первісток — 17,52%, що у півтора рази вище (P<0,001), ніж у корів УЧеРМ і УЧРМ — 12,84 і 11,53% відповідно.

Табл. Цитогенетичні показники чистопородних і кросбредних корів
Table. Cytogenetic indicators of purebred and crossbred cows

Показник Parameter		Порода / Breed		
		УЧеРМ	УЧРМ	УЧеРМ×М
Кількість тварин / Number of animals		30	30	30
Кількість досліджених метафаз / The number of investigated metaphases		950	900	925
Всього аберантних клітин / Total aberrant cells, %		16,5±0,21***	17,0±0,09	25,8±0,13***
Частота геномних аберацій, % Frequency of genomic aberrations, %	анеуплоїдія / aneuploidy	12,84±0,17	11,53±0,20	17,52±0,12
	поліплоїдія / polyploidy	2,02±0,09	2,50±0,22	3,40±0,07
Частота хромосомних аберацій, % Frequency of chromosomal aberrations, %	розриви / chromosome breaks	2,40±0,28	3,12±0,90	3,36±0,12
	фрагменти / fragments	2,25±0,98*	2,60±0,050	3,05±0,80*
Асоціації хромосом / Associations of chromosomes		–	–	3,35±0,07
Клітини із передчасним розходженням центромерних районів хромосом Cells with premature separation of centromeric regions of chromosomes		3,18±0,15	2,47±0,17	6,82±0,39

Примітка. * — P<0,05, ** — P<0,01, *** — P<0,001.
Note. * — P<0.05, ** — P<0.01, *** — P<0.001.

У кросбредних корів виявлено підвищений рівень поліплоїдних клітин — 3,40%, який на 27% переважає аналогічний показник у чистопородних особин порід УЧеРМ і УЧРМ, і ця різниця є статистично значущою (P<0,001). В пулі поліплоїдних клітин виявлено в основному тетраплоїди і невелику кількість триплоїдів. При цьому частоти анеуплоїдних і поліпоїдних клітин у корів УЧеРМ і УЧРМ практично не відрізнялись. Цей показник, на нашу думку, пов'язаний з енергією росту тварин, а не з пошкодженням апарату сегрегації хромосом, як вважають окремі дослідники [3]. Це підтверджують і результати цитогенетичних досліджень інших вчених, які свідчать про асоціацію поліплоїдії із регенерацією і функціональною активністю органів і тканин у тварин [4].

У тварин усіх досліджених груп виявлено структурні аберації хромосом, серед яких — розриви, фрагменти і асоціації негомологічних хромосом. Клітин, які містять хромосоми із розривами і фрагментами, виявили на 15–20% більше у помісних тварин порівняно з чистопородними.

Інформативним є показник ПРЦХ, який характеризує синхронізацію у часовому вимірі мітотичних процесів і наглядно ілюструє процеси, пов'язані зі стабільністю ядра у різних тварин. Результати аналізу показали значно більшу кількість клітин з несинхронністю мітотичного поділу у корів, отриманих внаслідок міжпородного схрещування.

Дослідження хромосомної нестабільності сільськогосподарських тварин за різних селекційних прийомів, проведені іншими дослідниками, підтверджують вплив методів розведення, зокрема інбридингу і кросбридингу, на їхній геном [7, 8]. Інші дослідники аргументовано доводять, що селекційні методи впливають на прояв анеуплоїдії і поліплоїдії, і, можливо, і на інші каріотипові ознаки [9]. Вони вважають, що до геномних мутацій тварин можуть призвести певні методи розведення, зокрема з інбредністю тварин пов'язують підвищення частки анеуплоїдних клітин.

Методи розведення тварин, як вважають окремі дослідники [5], призводять також і до структурних хромосомних аберацій у потомків. Отримані внаслідок різних варіантів схрещувань тварини, які мають нормальний фенотип, можуть бути гомозиготними за нелетальними інверсіями. У таких тварин змінюється послідовність зчеплення генів, але кон'югація хромосом і подальша рекомбінація відбувається нормально.

Відомо, що за кросбридингу як селекційного методу розведення внаслідок гетерозису реалізуються кращі ознаки життєздатності і продуктивності у гібридів порівняно з батьківськими формами. Генетичною основою гетерозису є різке збільшення у потомків гетерозиготності, яка утворюється під час схрещування порід, далеких за походженням і відмінних за генофондом. На цитогенетичному рівні це може проявлятись як певний рівень хромосомної нестабільності, що підтверджують отримані нами результати досліджень.

Індійські дослідники з *University of Hyde Rabad*, провівши детальний каріометричний аналіз двох груп бугаїв (помісей джерсейської і голштинської порід з іншими породами), виявили каріологічні особливості помісних тварин. Хромосоми помісних і чистопородних тварин різнилися за відносною довжиною і співвідношенням довжин плечей статевих хромосом [8].

Існує думка, що схрещування тварин, навіть споріднених порід, але отриманих за різних селекційних систем у різних екологічних умовах, призводить до деконсолідації спадковості і руйнування генних адаптивних комплексів [11]. Ці автори у вивченні поліплоїдії у тварин великої рогатої худоби герефордської породи виявили її зв'язок з методом підбору батьківських пар. Найменшу плоїдність спостерігали в групі трипородних помісей (5,2%) і в тварин, отриманих у результаті лінійного кросу (6,5%). Автори припускають, що це пояснюється впливом міжпородного і внутрішньопородного гетерозису. Дещо вищою є плоїдність в інбредних тварин (7,3%), найнижчою — у групі чистопородних герефордів.

Доцільно взяти до уваги, що під час створення складних багатокомпонентних порід тварин цитогенетичні особливості (як індивідуальні, так і породні) здатні виконувати роль генетичних маркерів. Завдяки дослідженням ядерних структур соматичних клітин можна оцінити стан спадкового апарату тваринного організму з огляду на різну продуктивність, виявити механізми, що призводять до зниження продуктивності, яка часто супроводжує інтенсивну селекцію за іншими показниками, і усунути причини. За допомогою цитогенетичних методів можна виявити нові джерела генетичної мінливості, і, найважливіше, не допустити поширення шкідливих хромосомних аберацій у популяціях тварин.

Висновки

Результати цитогенетичного дослідження свідчать про більшу хромосомну нестабільність кросбредних корів порівняно з чистопородними. Однією з причин цього явища може бути вплив методів розведення, зокрема кросбридинг.

Перспективи подальших досліджень

Зважаючи на важливість і недостатнє вивчення питання хромосомної нестабільності у зв'язку із селекційними методами у великої рогатої худоби, актуальним є продовження досліджень у цьому напрямі.

1. Bakhoum SF, Silkworth WT, Nardi IK, Nicholson JM, Compton DA, Cimini D. The mitotic origin of chromosomal instability. *Curr. Biol.* 2014; 24 (4): PR148–R149. DOI: 10.1016/j.cub.2014.01.019.
2. Heng HH, Bremer SW, Stevens JB, Horne SD, Liu G, Abdallah BY, Ye KJ, Ye CJ. Chromosomal instability (CIN): what it is and why it is

crucial to cancer evolution. *Cancer Metast. Rev.* 2013; 32: 325–340. DOI: 10.1007/s10555-013-9427-7.

3. Holečková B, Schwarzbacherová V, Galdíková M, Koleničová S, Halušková J, Staničová J, Verebová V, Jutková A. Chromosomal aberrations in cattle. *Genes (Basel)*. 2021; 12 (9): 1330. DOI: 10.3390/genes12091330.
4. Lozano CB, Meza LC, de la Colina FF, Bañuelos VR, Báez AJJ. Effect of lymphocyte polyploidy/aneuploidy on fertility of Holsein cows in the state of Zacatecas, Mexico. *Abanico Vet.* 2013; 3 (3): 22–29. Available at: https://www.medigraphic.com/cgi-bin/new/resumenI.cgi?IDARTICULO=46588
5. Popescu CP. Chromosomes of the cow and bull. *Adv. Sci. Comp. Med.* 1990; 34: 41–71 DOI: 10.1016/B978-0-12-039234-6.50007-0.
6. Rajagopalan H, Nowak MA, Vogelstein B, Lengauer C. The significance of unstable chromosomes in colorectal cancer. *Nat. Rev. Cancer.* 2003; 3: 695–701. DOI: 10.1038/nrc1165.
7. Raudsepp T, Chowdhary BP. Chromosome aberrations and fertility disorders in domestic animals. *Ann. Rev. Anim. Biosci*. 2016; 4: 15–43. DOI: 10.1146/annurev-animal-021815-111239.
8. Sahoo AK, Choudhuri G, Koley N, Ghosh SK. Cytogenetic studies on the metaphase chromosomes in the taurus-indicus crossbred breeding bulls. *Indian J. Anim. Health*. 1992; 31 (2): 1–10.
9. Van den Bosch T, Derks S, Miedema DM. Chromosomal instability, selection and competition: factors that shape the level of karyotype intra-tumor heterogeneity. *Cancers (Basel)*. 2022; 14 (20): 4986. DOI: 10.3390/cancers14204986.
10. Wójcik E, Szostek M. Assessment of genome stability in various breeds of cattle. *PLOS One.* 2019. 14 (6): 0217799. DOI: 10.1371/journal.pone.0217799.
11. Zartman DI, Fechheimer NS. Somatic aneuploidy and polyploidy in inbred and linecross cattle. *J. Anim. Sci.* 1967; 26 (4): 678–682. DOI: 10.2527/jas1967.264678x.

Chromosomal instability of purebred and crossbred dairy cows

V. Dzitsiuk[1], L. Starodub[1], T. Dyman[2]
valentynadzitsiuk@gmail.com

[1]Institute of Animal Breeding and Genetics named after M. V. Zubets NAAS,
1 Pohrebniaka str, Chubynske village, Boryspil district, Kyiv region, 08321, Ukraine
[2]Bila Tserkva National Agrarian University,
8/1 Soborna sq., Bila Tserkva, Kyiv region, 09117, Ukraine

The article presents the results of research on the karyotype characteristics variability in purebred and crossbred dairy cows. The material for the research was peripheral blood samples of purebred firstborn cows of the Ukrainian red-spotted dairy and Ukrainian black-spotted dairy breeds, as well as crossbred cows obtained from crossing Ukrainian red-spotted with Montbeliard bulls (DG "Nyva" SE of the Institute of Animal Breeding and Genetics named after M. V. Zubets NAAS. Preparation of cytogenetic preparations, analysis of morphology, identification and classification of chromosome aberrations were carried out according to generally accepted methods. We performed cell analysis with the *Axiostar plus* microscope (*Carl Zeiss*, Germany) under immersion magnification of 1000 times and took microphotographs. In all studies, the frequency of aberrant metaphases and the spectrum of chromosomal aberrations were determined as parameters of chromosomal instability. The following signs were taken into account: the frequency of aneuploid and polyploid cells, cells with premature separation of the centromeric regions of chromosomes (CRC), cells with structural aberrations of chromosomes (breaks, fragments and associations of non-homologous chromosomes). As a result of the analysis of karyotypes of firstborn cows of purebred and crossbred origin, it was established that the proportion of diploid cells in the norm is on average 85%. The remaining almost 15% are somatic cells with numerical and structural abnormalities. Crossbred cows have significantly higher frequencies ($P<0.001$) of aneuploid (one and a half times), polyploid (by 27%), structural aberrations of chromosomes (by 20%) than in purebred cows of the Ukrainian red-spotted and black-spotted dairy breeds. 15–20% more cells containing chromosomes with breaks and fragments were also found in crossbred firstborns. The results of the cytogenetic study indicate greater chromosomal instability in crossbred cows compared to purebred cows. One of the reasons for this phenomenon may be the influence of breeding methods, in particular crossbreeding.

Key words: purebred and crossbred cows, cytogenetic studies, karyotype, chromosome aberrations, chromosomal instability

Dzitsiuk V, Starodub L, Dyman T. Chromosomal instability of purebred and crossbred dairy cows. *Biol. Tvarin*. 2022; 24 (4): 17–20. DOI: 10.15407/animbiol24.04.017.