

ОСОБЛИВОСТІ ХРОМОСОМНОГО НАБОРУ ОВЕЦЬ РОМАНІВСЬКОЇ ПОРОДИ

Х. Т. ТИПИЛО, В. В. ДЗИЦЮК

*Інститут розведення і генетики тварин імені М.В.Зубця НААН (Чубинське, Україна)
butterfly221192@gmail.com*

В роботі наводяться результати цитогенетичного дослідження овець романівської породи. Встановлена індивідуальна хромосомна мінливість досліджених тварин. Виявлена наявність аберантних клітин з частотою 17,7%, в тому числі анеуплоїдних клітин – 6,25%, поліплоїдних – 0,75% та структурних аберацій хромосом (розриви і пробіли) – 0,25%, поодиноких фрагментів 0,37%, клітин з асинхронним розходженням центромерних районів хромосом (АРЦРХ) 2,5%. Результати цитогенетичного дослідження свідчать, що каріотипи досліджених овець мають характерний для даного виду тварин набір і структуру хромосом з індивідуальною хромосомною мінливістю.

Ключові слова: цитогенетика, хромосоми, каріотип, аберації, вівці, романівська порода

FEATURES OF CHROMOSOMAL SET OF SHEEP OF ROMANOV BREED

H. T. Tipilo, V. V. Dzitsiuk

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

The results of cytogenetic research of sheep of the Romanov breed are presented in the work. The individual chromosomal variability of the investigated animals is established. The presence of aberrant cells with a frequency of 17.7%, including aneuploid cells – 6.25%, polyploidy – 0.75%, and structural aberrations of chromosomes (gaps) – 0.25%, single fragments 0.37%, cells with asynchronous divergence of centromeric regions of chromosomes (ARCSH) of 2.5%.

Keywords: cytogenetics, chromosomes, karyotype, aberrations, sheep, Romanov breed

ОСОБЕННОСТИ ХРОМОСОМНОГО НАБОРА ОВЕЦ РОМАНОВСКОЙ ПОРОДЫ

Х. Т. Типило, В. В. Дзицюк

Інститут розведення і генетики живих тварин імені М.В.Зубця НААН (Чубинське, Україна)

В работе приводятся результаты цитогенетического исследования овец романовской породы. Установлено наличие аберрантных клеток с частотой встречаемости 17,7%, в том числе анеуплоидные клеток – 6,25%, полиплоидных клеток – 0,75% и структурных аберраций хромосом (разрывы и пробелы хромосом) – 0,25%, единичных фрагментов 0,37%, клеток с асинхронным расхождением центромерных районов хромосом (АРЦРХ) – 2,5%. Результаты цитогенетического исследования свидетельствуют о том, что каріотипы исследованных овец имеют характерный для данного вида набор и структуру хромосом с индивидуальной хромосомной изменчивостью.

Ключевые слова: цитогенетика, хромосомы, каріотип, аберрации, овцы, романовская порода

Вступ. Романівська порода овець існує вже понад 200 років і має відмінні вовно-шубні якості, високу плодючість, поліестричність, скороспілість а також поставляє повноцінні продукти харчування для населення (високоякісну баранину, сало, молоко і різні продукти, виготовлені з нього). Романівські вівці легко пристосовуються до різного клімату, мають велику витривалість, не потребують спеціального догляду і великих витрат на початку запуску ферми, що робить цю породу найбільш бажаною для роботи на нових господарствах.

До романівської породи протягом тривалого часу виявляють великий інтерес багато вівчарів світу. Завдяки універсальній продуктивності романівські вівці активно використовуються для покращення порід в багатьох країнах з розвиненим вівчарством. Однак в Україні чисельність поголів'я овець романівської породи невисока. Для збереження і розвитку породи потрібно використовувати сучасні підходи для оцінки її внутріпородної різноманітності. Одними з найперспективніших для популяційно-генетичних досліджень є цитогенетичні, які дозволяють дослідити цілісність хромосомного набору і не допустити розповсюдження в популяції небажаних генетичних аномалій.

В породоутворювальному процесі селективне значення мають спонтанні хромосомні аберації, які закріплюються в поколіннях. Рівень хромосомного поліморфізму є додатковою характеристикою племінної цінності тварин, що може бути враховано при відборі тварин бажаного типу. Аналіз хромосомного поліморфізму овець є основою для формування нових знань про динаміку генетичної структури в популяціях тварин.

Цитогенетика тварин зібрала значні знання про вплив каріотипу на процеси індивідуального розвитку. За допомогою цитогенетичних досліджень виявляють зміни в хромосомах, які передаються потомству і відповідним чином впливають на ознаки організму тварин. Вивчення поліморфізму хромосом дає можливість аналізувати геном будь якого виду тварин, навіть якщо зовні абсолютно одноманітний. Поряд з виявленням тварин-носіїв спадкових аномалій і використанням методів блокування генетичних дефектів знання хромосомного поліморфізму дає можливість представити відносно специфіки спадкового матеріалу і виявлення окремих структурних або числових особливостей каріотипу, для якого характерна співвідносна (або кореляційна за Дарвіном) мінливість.

Спадкові аномалії, які виникли внаслідок мутацій в генах і хромосомах, розглядаються як генетичний вантаж популяцій. Доведений зв'язок спадкових хромосомних аномалій з ембріональною смертністю плода, сповільненням темпів розвитку, аномаліями статевої диференціації тварин, зниженням фертильності [1]. Як правило збільшення нестійкості хромосомного апарату в овець пов'язано з зниженням відтворної функції [2].

Аномалії хромосом у овець можуть спричиняти значний негативний вплив на відтворну здатність, внаслідок нездатності вироблення життєздатних гамет або ранньої ембріональної смертності, як наслідок призводити до значних економічних втрат. Відповідно до експериментальних даних втрати потомства внаслідок різноманіття хромосомних аномалій (ембріональні, плідні, перинатальні) складають 20–30% [3].

В літературі описані випадки наявності зв'язку цілого ряду патологічних станів організму тварин з підвищенням частоти поліплоїдних, анеуплоїдних клітин, фрагментів і розривів хромосом [4, 5, 6].

На сьогодні в багатьох країнах існують національні програми цитогенетичного моніторингу в тваринництві, в тому числі і у вівчарстві. В Україні, не дивлячись на беззаперечну необхідність цитогенетичного контролю, спеціальні програми тільки починають виходити за стіни лабораторій і розвиватися лише у великих науково-дослідних центрах.

Матеріали та методи дослідження. Об'єктом дослідження було поголів'я овець романівської породи ($n = 10$), яке розводять в племінному господарстві "Бах і сім'я" (Київська область). Матеріалом для отримання хромосомних препаратів була кров овець у віці від 1 до 3-ох років, яку відбирали з яремної вени (5–10 мл). Кров відбирали за максимальних умов дотримання стерильності (перед взяттям крові поверхню шкіри, разом із місцем введення голки, стерилізували 70% етиловим спиртом) в одноразові шприци, оброблені розчином гепарину. Зразки крові поміщали в термоблок при температурі 2–4°C і передавали в лабораторію протягом 2-х годин. До зразків крові додавалась відомість з назвою господарства, дати взяття крові, індивідуального номера тварини, статі, породи.

Цитогенетичне дослідження проводилось у лабораторії генетики Інституту розведення і генетики тварин імені М.В.Зубця (с. Чубинське) з використанням спеціальних методик та відповідного обладнання. Для отримання препаратів хромосом використовували зразки ку-

льтури лейкоцитів периферичної крові тварин. Лімфоцити (0,5 мл) культивували протягом 72 годин в поживному середовищі RPMI-1640 (2 мл) з додаванням інактивованої сироватки великої рогатої худоби (0,5 мл), конканаваліну (0,1 мл) та гентаміцину (0,001 мл на 1 мл середовища). За 2 години до завершення культивування в середовище додавали розчин колхіцину у кінцевій концентрації 0,05 мкг/мл. Гіпотонічну обробку проводили з використанням 0,56 М розчину KCL протягом 30 хвилин з наступною фіксацією у свіжоприготовленому та охолодженому фіксаторі – крижаній оцтовій кислоті (3:1). Рутинне забарвлення препаратів хромосом проводили барвником Гімза. Аналіз клітин під мікроскопом проводили під імерсійним збільшенням у 1000 разів та мікрофотографували. Для аналізу і фотографування відбирали ті метафазні пластинки, в яких хромосоми знаходились окремо одна від одної. На одному препараті (склі) досліджували від однієї до десяти метафазних пластинок, а щоб проаналізувати каріотип, аналізували 50 і більше метафазних пластинок.

Отримані експериментальні дані опрацьовували методом варіаційної статистики з використанням комп'ютерних програм EXCEL.

Результати досліджень. Результати цитогенетичного аналізу овець романівської породи, показали, що всі вони мають хромосомний набір, типовий для свійської породи овець. Хромосомний набір досліджених овець представлений 54 хромосомами, з них 26 пар аутосом і одна пара статевих хромосом (XX або XY). До складу аутосом входять три пари великих метацентриків і 23 пари акроцентричних хромосом різної величини. У всіх вивчених зразках ряд аутосом представлений трьома парами великих метацентриків. Решту 23 пари складають ряд поступово спадаючих по величині акроцентричних хромосом. Більшість з них мають термінально розташовану центромеру. В овець акроцентричні хромосоми не мають істотної різниці в розмірах, що ускладнює їх ідентифікацію без диференційного забарвлення. Розмір хромосом коливається від 1 до 7 мкм. Розмір акроцентриків варіює від 2,68 у четвертій парі до 0,95 мкм – у 26-ї парі. X-хромосома – найбільший акроцентерик з розміром 3,04 мкм, Y-хромосома – найменший метацентерик з розміром 0,64 мкм і має вигляд круглої плями (рис. 1).

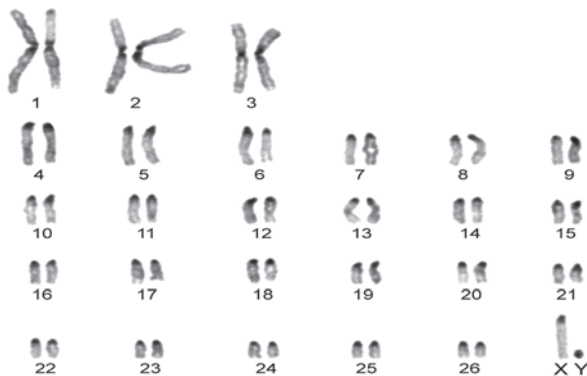


Рис. 1. Каріотип барана ($2n = 54$)

Результати метафазного аналізу дозволили зафіксувати певну частину стабільних аберацій. Серед 457 метафазних пластинок виявлено 81 аберантну клітину (17,7%), з них анеуплоїдних клітин – 6,25%, поліплоїдних – 0,75%, клітин з розривами хромосом – 0,25%, частота парних фрагментів хромосом – 0,37% та частота клітин з асинхронним розходженням центромерних районів хромосом (АРЦРХ) склала 2,5% (табл. 1).

1. Цитогенетичний аналіз овець

Вівці, голів	Число метафаз	Всього аберантних клітин, %	Частота геномних аберацій, %		Частота структурних аберацій хромосом, %		
			анеуплоїдних клітин	поліплоїдних клітин	розриви	фрагменти	АРЦРХ
10	457	17,7	6,25 ± 2,17	0,75 ± 0,25	0,25 ± 0,25	0,37 ± 0,18	2,5 ± 0,56

Оскільки частота аберантних клітин ($n = 240$) у невеликій популяції складає 17,7%, то це свідчить про те, що виявлені порушення в хромосомному наборі овець носять не випадковий характер і мають спадкову основу.

Аналіз препаратів хромосом виявив 6,25% анеуплоїдних клітин. Анеуплоїдія – геномна мутація, яка полягає в зміні числа хромосом, що є некратним гаплоїдному, в нашому дослідженні представлена переважно гіпоплоїдами і сформована за рахунок маленьких акроцентриків. Стабільність показників анеуплоїдії в овець підтверджена дослідженнями багатьох цитогенетиків і може вважатися видовою особливістю. Причиною анеуплоїдії, очевидно, є нерозходження хромосом у мітозі, втрата окремих хромосом у процесі поділу клітини (рис. 2).

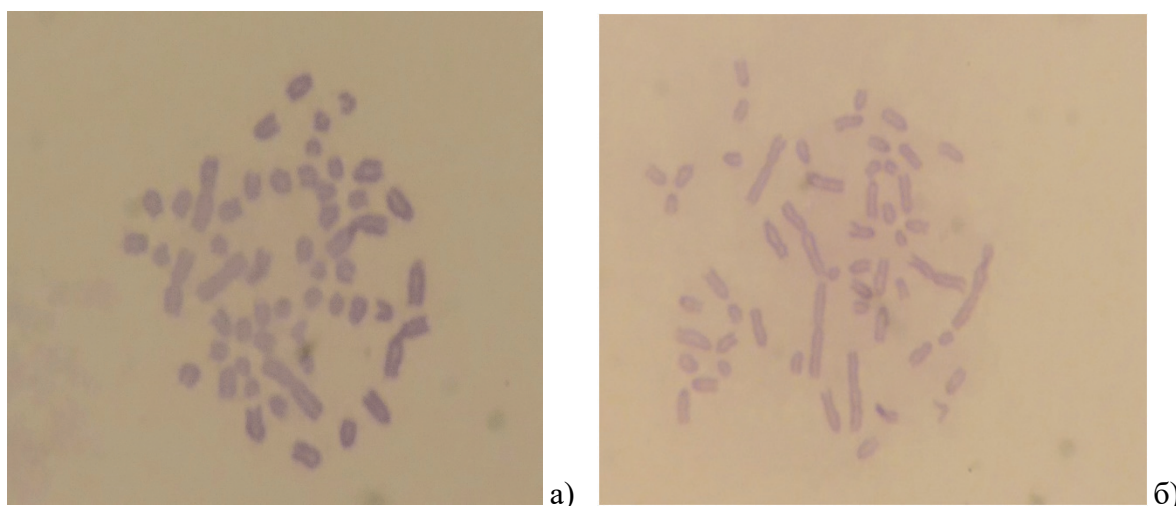


Рис. 2. Метафази з анеуплоїдним набором хромосом клітин: а) $n = 52$; б) $n = 56$

У ході аналізу препаратів хромосом зустрічались поліплоїдні клітини ($3n$, $4n$) з частотою 0,75%. За повідомленнями цитогенетиків, механізм виникнення поліплоїдів остаточно не вивчений і часто розглядається як механізм, створений в ході еволюції для забезпечення стійкості клітин проти незбалансованого геному в диплоїдних клітинах з хромосомною аберацією і нерівномірним поділом хромосом. Іноді поліплоїдії виникають при затримці першого поділу клітини [7]. Деякі дослідники пов'язують виникнення поліплоїдії клітин з віковими особливостями організму [8].

При аналізі цитогенетичних препаратів, у випадках виявлення поліплоїдних клітин, ми намагалися максимально відрізнити їх від накладень кількох метафазних пластинок; аналізувати спіралізацію та забарвлення хромосом; враховували цілісність метафазної пластинки та рівномірний розподіл в ній хромосом (рис. 3).

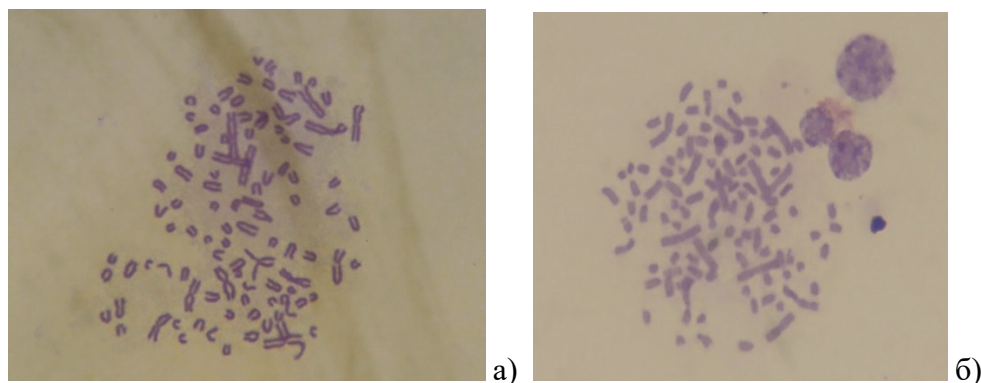


Рис. 3. (а, б). Клітини з поліплоїдним набором хромосом. Збільшення: об. $\times 100$; ок. $\times 10$

В ході цитогенетичного дослідження каріотипів овець нами виявлені структурні аберації хромосом: хроматидні пробіли, хроматидні і хромосомні розриви, окремі фрагменти, асоціації хромосом. Відомо, що обов'язковою умовою виникнення структурної хромосомної перебудови, будь-якого типу, є наявність в хромосомах розриву. Якщо виходити з того, що ДНК представляє собою єдину довгу нитку, яка проходить через всю хромосому, хромосомний розрив передбачає і розрив сахаро-фосфатної основи ДНК. В світловому мікроскопі буває важко відрізнити хромосомні розриви від ахроматичної (незафарбованої) області, яку називають пробілом (рис. 4).

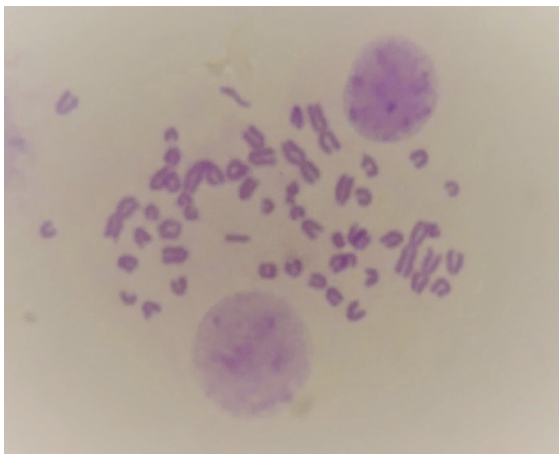


Рис. 4. Метафазна пластинка, в якій є хромосома з пробілом. Збільшення: об. $\times 100$; ок. $\times 10$

Розрив, який відбувся в будь-якому районі хромосоми і який не пошкоджує центромери, призводить до появи вкороченої хромосоми з центромерою і ацентричного фрагмента (рис. 5). Такий фрагмент іноді може формувати маленьке кільце, але оскільки в ньому відсутня центромера, то частіше за все він губиться в наступному мітозі. Таким чином, розрив хромосоми часто призводить до появи клітини у якої відсутній хромосомний сегмент.

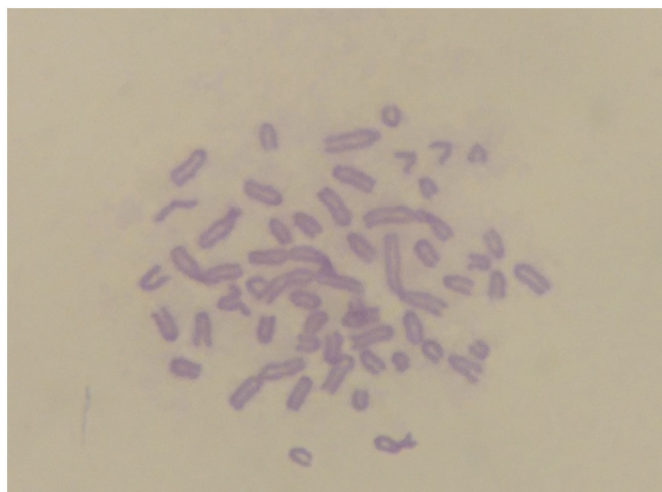


Рис. 5. Метафазна пластинка, в якій є фрагменти хромосом. Збільшення: об. $\times 100$; ок. $\times 10$

Одним із інформативних показників хромосомної нестабільності є явище асинхронності розходження центромерних районів хромосом (далі – АРЦРХ). Вперше АРЦРХ було описано Фітджеральдом [9]. Клітинною з АРЦРХ вважають мітотичну клітину, в якій передчасно розділилась центромера однієї чи декількох хромосом, а решта хромосом зберігають характерну метафазну структуру. Зміна фізичного стану перичентричного гетерохроматину, тобто деконденсація, супроводжується АРЦРХ. Науковці, які вивчали АЦРХ, вважають, що в такій клітині передчасно розділилися центромери одної чи декількох хромосом, а інші зберігають

типову метафазну конфігурацію. Збільшення числа клітин з АРЦРХ пов'язують з виникненням і розвитком окремих захворювань, особливо викликаних трисоміями [10].

Висновок. Таким чином, отримані нами результати цитогенетичного дослідження овець романівської породи свідчать, що їх каріотиби мають характерний для даного виду тварин набір і структуру хромосом. В той же час у досліджених тварин спостерігається індивідуальна хромосомна мінливість, яка в свою чергу може бути пов'язана із їх продуктивними чи відтворними якостями. Даний аргумент є основою для продовження нами досліджень хромосомного поліморфізму овець романівської та інших порід.

БІБЛІОГРАФІЯ

1. Ernst, L. K. Monitoring of genetic freight in black and motley, golshtinsky and ayrshirsky breeds of cattle / L. K. Ernst, A. I. Zhigachev, I. A. Kudryavtseva // *Zootekhniya*. – 2007. – № 3. – P. 5–10.
2. Riggs, P. K. Fragile sites in domestic animals : molecular insights and challenges / P. K. Riggs, M. Ronne // *Cytogenet. Genome Res.* – 2009. – № 126. – P. 97–109.
3. Edey, T. N. Prenatal mortality in sheep; a review / T. N. Edey // *Anim. Breed. Abstr.* – 1969. – № 37. – P. 43–58.
4. Bruere, A. N. *Cytogenetics* / A. N. Bruere // 1969. – № 8. – P. 209.
5. Pawlowitzki, I. H. *Dtsch. med. Wschr.* / I. H. Pawlowitzki // 1966. – № 91. – P. 1094.
6. Тоцький, В. М. *Генетика*. / В. М. Тоцький // Одеса : Астропринт, 2002 – 710 с.
7. Cetogenetic screening of livestock populations in Europe: an overview / A. Ducos, T. Revay, A. Kovacs, A. Hidas, A. Pinton, A. Bonnet-Garnier, L. Molteni, E. Slota, M. Switonski, M. V. Arruga, W. A. Haeringen, I. Nicolae, R. Chaves, H. Guedes-Pinto, M. Andersson, L. Iannuzzi // *Cytogen. Genome Res.* – 2008. – Vol. 120. – № 1–2. – P. 26–41.
8. Molecular cytogenetic diagnosis and somatic genome variations / S. G. Vorsanova, Y. B. Yurov, I. V. Soloviev, I. Y. Iourov // *Curr. Genom.* – 2010. – Vol. 11. – № 6. – P. 440–446.
9. Fitzgerald, P. H. Evidence for therepead primary non-disjunction of chromosome 21 as result of premature centromere division (PCD) / P. H. Fitzgerald, S. A. Archer, C. M. Morris // *Hum. Genet.* – 1986. – Vol. 72, № 5. – P. 58–62.
10. Андреев, С. Г. Пути обменных взаимодействий хромосомных повреждений, приводящих к внутривхромосомным аберрациям, зависят от структуры интерфазных хромосом / С. Г. Андреев, Ю. А. Эйдельман // *Радиационная биология. Радиоэкология*. – 2001. – Т. 41, № 5. – С. 469–474.

REFERENCES

1. Ernst, L. K., A. I. Zhigachev, and I. A. Kudryavtseva 2007. Monitoring of genetic freight in black and motley, golshtinsky and ayrshirsky breeds of cattle. *Zootekhniya*. 3:5–10.
2. Riggs, P. K., and M. Ronne. 2009. Fragile sites in domestic animals: molecular insights and challenges. *Cytogenet. Genome Res.* 126:97–109.
3. Edey, T. N. 1969. Prenatal mortality in sheep; a review. *Anim. Breed. Abstr.* 37:43–58.
4. Bruere, A. N. 1969. *Cytogenetics*. 8:209.
5. Pawlowitzki, I. H. 1966. *Dtsch. med. Wschr.* 91:1094.
6. Totskiy, V. M. 2002. *Genetyka – Genetics*. Odessa: *Astroprint*, 710 (in Ukrainian).
7. Ducos, A., T. Revay, A. Kovacs, A. Hidas, A. Pinton, A. Bonnet-Garnier, L. Molteni, E. Slota, M. Switonski, M. V. Arruga, W. A. Haeringen, I. Nicolae, R. Chaves, H. Guedes-Pinto, M. Andersson, and L. Iannuzzi. 2008. Cetogenetic screening of livestock populations in Europe: an overview. *Cytogen. Genome Res.* 120(1–2):26–41.
8. Vorsanova, S. G., Y. B. Yurov, I. V. Soloviev, and I. Y. Iourov. 2010. Molecular cytogenetic diagnosis and somatic genome variations. *Curr. Genom.* 11(6):440–446.

9. Fitzgerald, P. H., S. A. Archer, and C. M. Morris. 1986. Evidence for therepead primary non-disjunction of chromosome 21 as result of premature centromere division (PCD). *Hum. Genet.* 72(5):58–62.

10. Andreev, S. G. Puti obmennyh vzaimodejstvij hromosomnyh povrezhdenij, privodjashhih k vnutrihromosomnym aberracijam, zavisjat ot struktury interfaznyh hromosom – The ways of exchange co-operations of chromosomal damages resulting inwardly chromosomal aberrations depend on the structure of interphases chromosomes. *Radyats. byolohyya. – Radyoekolohyya.* 41(5):469–474 (in Russian).

