

УДК 636.234.082:576.316

DOI: <https://doi.org/10.31073/abg.69.11>

МІНЛИВІСТЬ ЦИТОГЕНЕТИЧНИХ ПАРАМЕТРІВ У БУГАЇВ ГОЛШТИНСЬКОЇ ПОРОДИ ЧОРНО-РЯБОЇ ТА ЧЕРВОНО-РЯБОЇ МАСТІ

Л. Ф. СТАРОДУБ, В. О. БАМБУРА

*Інститут розведення і генетики тварин імені М.В. Зубця НААН (Чубинське, Україна),**<https://orcid.org/0000-0002-4000-807X> – Л. Ф. Стародуб**<https://orcid.org/0009-0004-617--6432> – В. О. Бамбура**Starodublf@gmail.com*

Носії хромосомних аберацій, у яких не виявляється фенотипових або поведінкових ефектів, можуть бути включені до процесу розведення, що призводить до значних економічних втрат через ветеринарні огляди та витрати, пов'язані з утриманням стерильного або нефертильного плідника, протягом багатьох років. Аналіз хромосом залишається ключовою процедурою скринінгу хромосомних аберацій у цитогенетичних лабораторіях тварин. Мета роботи: моніторинг каріотипової мінливості плідників великої рогатої худоби.

Цитогенетичний моніторинг показав, що модальне число хромосом відповідало видовій нормі і становило $2n = 60XY$, фундаментальне число каріотипу дорівнювало ($FN = 62$), лейкоцитарний химеризм ($60XX/60XY$) був відсутній. Конституційних аномалій у вигляді Робертсонівських транслокацій виявлено не було. Середня частота геномних порушень (анеуплоїдії) у досліджених плідників голштинської породи червоно-рябої масті становила $1,6 \pm 0,36\%$ та у чорно-рябих – $1,4 \pm 0,22\%$ і не перевищувала показники, характерні для виду. Кратного збільшення хромосом (поліплоїдії) виявлено не було. Структурні порушення (розриви хромосом) становили $2,0 \pm 0,50\%$ та $2,2 \pm 0,38\%$ відповідно. Частота асинхронного розходження центромірних районів хромосом у плідників голштинської породи червоно-рябої масті дорівнювала – $1,3 \pm 0,47\%$ та $1,8 \pm 0,75\%$ у чорно-рябих голштинів. Частка клітин із мікроядрами була в межах спонтанного рівня, характерного для ссавців, що утримуються за умов відсутності прямого генотоксичного впливу і коливалася від 0,5% до 3,0 %, ліміт частки двоядерних лімфоцитів був 2,9-4,0% та частка клітин, що діляться (МІ) дорівнювала 2,0-8,0%. Встановлено, що досліджені плідники голштинської породи чорно-рябої та червоно-рябої масті характеризувалися стабільними цитогенетичними показниками соматичного мутагенезу.

Ключові слова: голштини червоно-рябої та чорно-рябої масті, цитогенетичний контроль, анеуплоїдія, розриви хромосом, мікроядра, двоядерні лімфоцити, мітотичний індекс

VARIABILITY OF CYTOGENETIC PARAMETERS IN BLACK-AND-WHITE AND RED-AND-WHITE HOLSTEIN BULLS

L. F. Starodub, V. O. Bambura

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

Carriers of chromosomal aberrations that do not exhibit phenotypic or behavioral effects may be included in the breeding process, resulting in significant economic losses due to veterinary examinations and costs associated with maintaining sterile or infertile sires for many years. Chromosome analysis remains a key screening procedure for chromosomal aberrations in animal cytogenetic laboratories. The aim of the work was to study the variability of the karyotype of cattle sires.

Cytogenetic monitoring showed that the modal number of chromosomes corresponded to the species standard and was $2n = 60XY$, the fundamental number of the karyotype was ($FN = 62$), leukocyte chimerism ($60XX/60XY$) was absent. Constitutional anomalies in the form of Robertsoni-

an translocations were not detected. The average frequency of genomic disorders (aneuploidies) in the studied Holstein Red-and-White bulls was $1.6 \pm 0.36\%$ and Holstein Black-and-White bulls – $1.4 \pm 0.22\%$ and did not exceed the indicators characteristic of the species. A multiple increase in chromosomes (polyploidy) was not detected. Structural disorders (chromosome breaks) were $2.0 \pm 0.50\%$ and $2.2 \pm 0.38\%$, respectively. The frequency of asynchronous divergence of centromeric regions of chromosomes in Holstein Red-and-White bulls offspring was $1.3 \pm 0.47\%$ and $1.8 \pm 0.75\%$ in Holstein Black-and-White ones. The proportion of cells with micronuclei was within the spontaneous level typical for mammals kept in the absence of direct genotoxic effects and ranged from 0.5‰ to 3.0‰, the limit of the proportion of binuclear lymphocytes was 2.9–4.0‰ and the proportion of dividing cells (MI) was 2.0–8.0‰. It was established that the studied Holstein Black-and-White and Holstein Red-and-White bulls offspring were characterized by stable cytogenetic indicators of somatic mutagenesis.

Keywords: Holstein Black-and-White and Red-and-White bulls, cytogenetic control, aneuploidy, chromosome breaks, micronuclei, binuclear lymphocytes, mitotic index

Вступ. Клінічні цитогенетичні дослідження великої рогатої худоби тривають понад півстоліття і чітко продемонстрували, що хромосомні аномалії пов'язані з вродженими порушеннями, втратою ембріонів, зниженням фертильності та безпліддям. Зміни в кількості хромосом або їх структурі зазвичай призводять до геномного дисбалансу та впливають на поділ мейотичних клітин, гаметогенез і життєздатність зигот і ембріонів. Генетично збалансовані хромосомні зміни, такі як транслокації, можуть передаватися, спричиняючи проблеми з фертильністю у наступних поколіннях. У випадках, коли хромосомні аберації не виявляють фенотипових або поведінкових ефектів, носії можуть бути включені до процесу розведення, що призведе до значних економічних втрат через ветеринарні огляди та витрати, пов'язані з утриманням стерильного або нефертильного плідника протягом багатьох років. Таким чином, цитогенетичний скринінг потенційних племінних тварин і клінічна цитогенетична оцінка проблемних плідників мають економічне значення для тваринництва, а також для власників і заводчиків.

Під час піку клінічної цитогенетики великої рогатої худоби у 1970–1990-х роках опубліковано чимало інформації щодо виявлених аномальних каріотипів. У наступні роки результати були добре розглянуті в багатьох оглядових статтях, деякі конкретно зосереджувались на цитогенетиці великої рогатої худоби (Khatun et al., 2011).

У скотарстві та свинарстві зниження плодючості може залежати від ранніх ембріональних втрат через незбалансованість хромосомного набору в гаметогенезі або на початкових стадіях ембріогенезу (Fechheimer, 1979). Доктор медичних наук Ернст Б. Хук (1978), який проводив свої дослідження у Канаді та США зазначав, що 50–60% спонтанних абортів у першому триместрі вагітності та 5% мертвороджень у людей обумовлено хромосомними аномаліями.

У популяції великої рогатої худоби поряд з видовою сталістю каріотипу зустрічаються тварини з різними цитогенетичними відхиленнями від норми, зокрема з транслокацією аутосом 1/29 (робертсонівська транслокація), фенотиповий ефект якої проявляється у зниженні відтворювальної здатності. Вважається, що до 37% ембріонів ВРХ гине до народження через різноманітні хромосомні аномалії (Holečková et al., 2021).

Незважаючи на швидкий розвиток нових молекулярних методів (матричні платформи, секвенування наступного покоління), аналіз хромосом залишається ключовою процедурою скринінгу хромосомних аберацій у цитогенетичних лабораторіях тварин.

Метою нашої роботи був моніторинг каріотипової мінливості плідників великої рогатої худоби.

Методи та матеріали. Для дослідження цитогенетичної нестабільності бугаїв був використаний біологічний матеріал, одержаний із периферійної крові плідників голштинської породи чорно-рябої ($n = 2$ гол.) та червоно-рябої масті ($n = 2$ гол.) української селекції госпо-

дарства ПрАТ Полтаваплемсервіс (рис. 1). У цьому господарстві правильно організована система зоотехнічних заходів: організація повноцінної годівлі; відповідні технологічні умови утримання, постійний ветнагляд, що забезпечує знаходження тварин у нормальному функціональному стані.



Рис. 1. Плідники голштинської породи

Цитогенетичні препарати отримували із лімфоцитів периферійної крові, взятої із яремної вени, використовуючи стандартну методику (Moorhead, et al., 1960). Для культивування клітин крові використовували середовище RPMI-1640, сироватку крові великої рогатої худоби (ембріональну), антибіотик гентаміцин, мітоген – речовину, яка стимулює мітотичне ділення лімфоцитів у культурі (фітогемаглютинін типу Р). Суміш культивували в термостаті при температурі $+37^{\circ}\text{C}$ протягом 48 год. За дві години до фіксації в культуру вводили підігрітий до 37°C розчин колхіцину в кінцевій концентрації 0,3–0,5 мкг/мл культурального середовища. Для гіпотонізації використовували свіжоприготовлений 0,55%-ний розчин хлористого калію. Після закінчення гіпотонізації, культуру центрифугували, надосадову рідину зливали, а до осаду додавали охолоджену до $+4^{\circ}\text{C}$ фіксуючу рідину, змішуючи одну частину льодяної оцтової кислоти з трьома частинами метилового (або етилового) спирту. Отримані

препарати, після їх фарбування готовим барвником Гімза, аналізували на предмет хромосомної мінливості під імерсійним збільшенням мікроскопа у 1000 разів і мікрофотографували (рис. 2).

У процесі досліджень враховували: числові порушення хромосом – анеуплоїдію (А), поліплоїдію (ПП), клітини із асинхронністю розщеплення центромірних районів хромосом (АРЦРХ), структурні аберації – розриви хромосом (ХР). На цих самих препаратах підраховували кількість двоядерних лімфоцитів (ДЯ) та одноядерних лімфоцитів із мікроядрами (МЯ), мітотичний індекс (МІ). Частоту ДЯ, МЯ, МІ вираховували на 1000 клітин (%) (рис. 3).

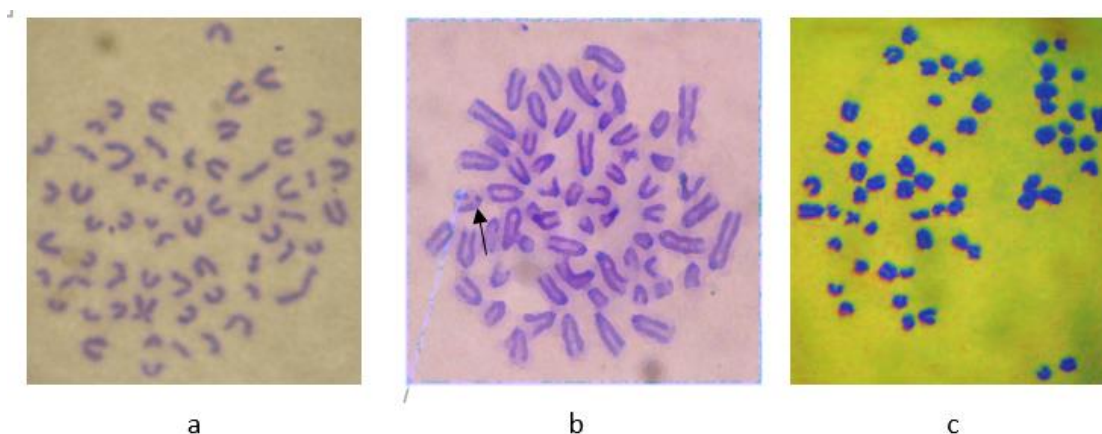


Рис. 2. Метафазні пластинки каріотипу бугая голштинської породи чорно-рябої масті: а- каріотип у нормі ($2n = 60$); б – хромосомний розрив (розрив показано стрілкою); с- чисельні порушення хромосом (анеуплоїдія, $2n = 59$). $36. \times 1000$ разів

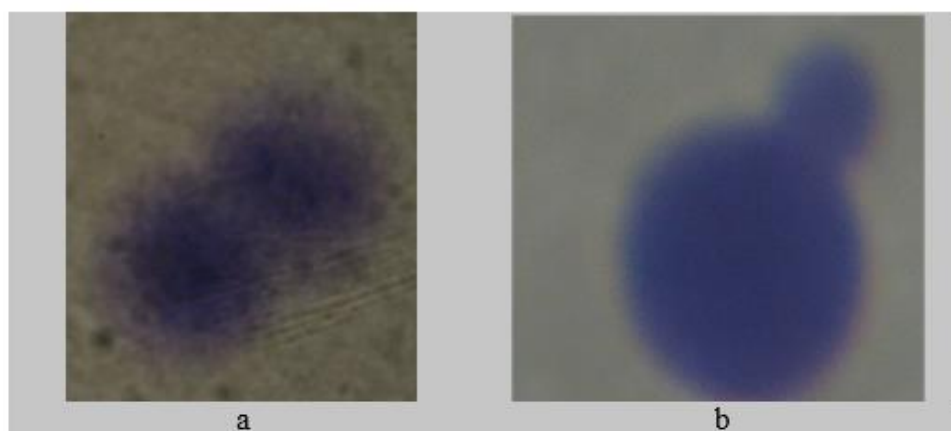


Рис. 3. Цитогенетичні параметри клітин: а – двоядерний лімфоцит; б – лімфоцит із мікроядром

Усі біометричні показники розраховували відповідно прийнятих методик. Статистичний аналіз проводили за допомогою програмного пакету Statistica 6.0 та Exel (Microsoft Office 2007). Статистичний обробіток даних проводили в стандартному пакеті Microsoft Excel із використанням інтегрованої надбудови програми Statisti XL 2.0 (<http://www.statistixl.com/>) (Peakall et al., 2012).

Результати досліджень та обговорення. Цитогенетичними дослідженнями встановлено, що хромосомний набір плідників великої рогатої худоби становив $2n = 60$. Всі аутосоми акроцентричні з поступовим зменшенням розміру. Статеві хромосоми – субметацентричні: Х – хромосома є великим субметацентриком та у Y – хромосома у вигляді самого дрібного субметацентричного елементу набору. Фундаментальне число каріотипу дорівнювало ($FN = 62$).

Генетичний аналіз на основі цитогенетичних маркерів дозволяє виділяти тварин із підвищеним рівнем хромосомної нестабільності як групу ризику, пов'язану з порушенням систем репарації та можливими прихованими запальними процесами. Дослідження каріотипу плідників голштинської породи чорно-рябої та червоно-рябої масті не виявило хромосомних аномалій у вигляді різних типів центричного злиття (CF). У бугаїв голштинської породи американської селекції поширене явище химеризму (60XX/60XY) із характерною зниженою відтворною здатністю. Всі протестовані нами тварини мали характерний нормальний каріотип (60XY), лейкоцитарний химеризм (60XX/60XY) був відсутній (Seguin et al., 2000).

Спонтанний соматичний прояв цитогенетичної мінливості досліджених плідників наведено у таблиці.

*Хромосомний поліморфізм плідників голштинської породи чорно-рябої та червоно-рябої масті ($M \pm m$), %
АРЦРХ – асинхронне розходження центромірних районів хромосом*

Масть тварини	Кількість тварин (гол.)	Вік, роки	Анеуплоїдія	АРЦРХ	Хромосомні розриви
Червоно-ряба	2	4 р.	$1,6 \pm 0,36$	$1,3 \pm 0,47$	$2,0 \pm 0,50$
Чорно-ряба	2	2 р.	$1,4 \pm 0,22$	$1,8 \pm 0,75$	$2,2 \pm 0,38$

Спектр спонтанної хромосомної мінливості досліджених тварин виявлено у вигляді генетичних та структурних мутацій. Чисельні аномалії у плідників великої рогатої худоби проявляються дуже рідко через їх фенотипову видимість тяжких соматичних дефектів із подальшим вибракуванням селекціонерами або ранньою ембріональною смертністю (Iannuzzi et al., 2021). У літературі описані результати цитогенетичного аналізу 30 голів голштино-фрізьких бугаїв із різною фертильністю. Так, у групи бугаїв із низькою якістю сперми чисельні порушення хромосом (анеуплоїдія) більше ніж на 8,02% перевищували групу тварин із високоякісною спермою. Поліплоїдія у цієї групи бугаїв становила 3,8% (Saad et al., 2016).

Межі мінливості числових порушень хромосом (анеуплоїдії) у досліджених нами плідників голштинської породи червоно-рябої масті становили 1,5–2,1% та у чорно-рябих – 1,2–2,4% і не перевищували показників 7,6%, характерних для виду. Кратного збільшення хромосом (поліплоїдії) виявлено не було.

Структурні хромосомні аномалії, зазвичай, пов'язані з нижчою фертильністю порівняно з тваринами з нормальним каріотипом. Вчені, які досліджували голштино-фрізьких бугаїв, встановили, що у тварин із низькою якістю сперми розриви хромосом дорівнювали 5,8% та 1,1% у групи бугаїв із високоякісною спермою. Асинхронне розходження центромірних районів хромосом (АРЦРХ) у цих тварин відповідно дорівнювало 4,9 та 0,42% (Saad et al., 2016). У досліджених нами бугаїв господарства ПрАТ Полтаваплемсервіс хромосомні розриви не перевищували 2,2%, а частота прояву АРЦРХ була не вище 1,8%.

Частка клітин із мікроядрами була в межах спонтанного рівня, характерного для ссавців, що утримуються за умов відсутності прямого генотоксичного впливу (Костенко та ін., 2017) і коливалася від 0,5‰ до 3,0‰, ліміт частки двоядерних лімфоцитів був 2,9–4,0‰ та частка клітин, що діляться (МІ), дорівнювала 2,0–8,0‰.

Висновок. Встановлено, що досліджені плідники голштинської породи чорно-рябої та червоно-рябої масті характеризуються стабільними цитогенетичними показниками соматичного мутагенезу, що вказує на те, що племпідприємство утримує і використовує плідників високої племінної (генетичної) цінності.

REFERENCES

- Fechheimer, N. S. (1979). Cytogenetics in Animal Production. *Journal of Dairy Science*, 62 (5), 844–853. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(79\)83336-6](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(79)83336-6).
- Holečková, B., Schwarzbacherová, V., Galdíková, M., Koleníčová, S., Halušková, J., & Staničová, J. (2021). Chromosomal Aberrations in Cattle. *Genes*, 12 (9), 1330. <https://doi.org/10.3390/genes12091330>.

- Hook, E. B. (1978). Spontaneous deaths of fetuses with chromosomal abnormalities diagnosed prenatally. *N Engl J Med.*, 299, 1036–1038. <https://doi.org/10.1056/NEJM197811092991903>.
- Iannuzzi, A., Parma, P., & Iannuzzi, L. (2021). Chromosome Abnormalities and Fertility in Domestic Bovids: A Review. *Animals*, 11 (3), 802. <https://doi.org/10.3390/ani11030802>.
- Khatun, M. R., Arifuzzaman, Md., & Ashraf, A. (2011). Karyotype for Identification of Genetic Abnormalities in Cattle. *Asian Journal of Animal and Veterinary Advances*, 6 (2), 117–12. <https://doi.org/10.3923/ajava.2011.117.125>.
- Kostenko, S. O., Jus, P. P., Konoval, O. V., Sydorenko, O. V., Starodub, L. F., & Dragulyan, M. V. (2017). *Vydovi osoblyvosti polimorfizmu ta henomnoi nestabilnosti svyni sviiskoi (Sus scrofa) i velykoi rohatoi khudoby (BosTaurus) za tsyto- ta DNK markeramy* [Species-specific features of polymorphism and genomic instability of domestic pigs (*Sus scrofa*) and large cattle (*BosTaurus*) by cyto- and DNA markers]. Comprint. [In Ukrainian].
- Moorhead, P. S., Nowell, P. C., Mellman, W. J., Battips, D. M., & Hungerford, D. A. (1960). Chromosome Preparations of Leukocytes Cultured from Human Peripheral Blood. *Experimental Cell Research*, 20, 613–616. [http://dx.doi.org/10.1016/0014-4827\(60\)90138-5](http://dx.doi.org/10.1016/0014-4827(60)90138-5).
- Peakall, R., & Smouse, P. E. (2012). GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research-an update. *Bioinformatics*, 28, 2537–2539. <http://www.statistixl.com>.
- Saad, M. F., Saeed, A. M., & El-nagar, H. A. (2016). Chromosomal analysis to predict early fertility in bovine bulls. *1st International Conference on Tropical Animal Science and Production (TASP 2016)*. Thailand. <http://repo.unand.ac.id/id/eprint/20548>.
- Seguin Brad, E., Zhang Ting, Q., Buoen Lance, C., Weber Alvin, F., Ruth George, R., & More View (2000). Cytogenetic survey of Holstein bulls at a commercial artificial insemination company to determine prevalence of bulls with centric fusion and chimeric anomalies. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 216, 65–67. <https://doi.org/10.2460/javma.2000.216.65>.

Одержано редколегією 25.04.2025 р.

Прийнято до друку 14.05.2025 р.