

ЦИТОГЕНЕТИЧНИЙ КОНТРОЛЬ ВЕЛИКОЇ РОГАТОЇ ХУДОБИ ЧЕРВОНОЇ ПОЛЬСЬКОЇ ПОРОДИ

Л.Ф. СТАРОДУБ, кандидат сільськогосподарських наук

Інститут розведення і генетики тварин НААН

Проведено цитогенетичний моніторинг корів червоної польської локальної породи української селекції. Встановлено хромосомну мінливість: підвищення кількісних порушень хромосом (анеуплоїдії) у 3 рази порівняно з рівнем спонтанної мінливості та структурні порушення (хромосомні розриви) у 20% тварин із розмахом мінливості 10-50%.

Ключові слова: червона польська порода, цитогенетичний контроль, анеуплоїдія, структурні порушення хромосом, мікроядерний тест.

У процесі розвитку нових технологій все більша увага приділяється породам, які найбільш відповідають їх вимогам. Таким чином, існує ризик втрати генетичного різноманіття, притаманного тваринам локальних порід з їх широким спектром генотипів, адаптованих до різних умов. Ці тварини можуть стати селекційним матеріалом, необхідним для створення нових порід і удосконалення існуючих [13]. Тому нині особливо гостро постає питання збереження генофонду локальних порід, що за рівнем продуктивності поступаються перед сучасними породами, але в їхньому генотипі є цінні якості, які сучасні породи поступово втрачають [1]. На жаль нині поза увагою залишається генетичний потенціал тварин локальних порід. Червона польська порода української селекції належить до локальних порід і перебуває на межі повного зникнення. Серед усіх порід великої рогатої худоби вона не досліджена, тому актуальним є аналіз її каріотипової мінливості.

Цитогенетичний аналіз дозволяє виявляти тварин-носіїв конституційних порушень каріотипу, оцінювати рівень соматичного мутагенезу в клітинах їх

крові, виявляти наявність генотоксичних факторів, виділяти особин із стабільним каріотипом [15].

Метою роботи було проведення цитогенетичного контролю корів червоної польської локальної породи української селекції і аналіз ретроспективних даних тварин червоної польської породи, яких розводили на території Польщі та порівняння результатів досліджень.

Матеріал і методика досліджень. Цитогенетичні контроль здійснювали у корів червоної польської породи (25гол.) господарства ПрАТ «Мшанецьке» Тербовлянського району Тернопільської області. Умови утримання тварин відповідають технології вирощування та виробництва молока. На час забору крові у тварин господарство знаходилося на карантині у зв'язку з появою випадків захворювання на туберкульоз. Територія, на якій розташоване господарство, характеризується особливим паратиповим чинником – підземні води села Мшанець збагачені сірководнем і використовуються для потреб сільськогосподарського підприємства.

Для порівняльної оцінки цитогенетичних досліджень, здійснених нами, був проведений ретроспективний аналіз літературних даних цитогенетичного моніторингу тварин червоної польської породи за період 1964-1998 р. р., яких розводили на території Польщі.

Цитогенетичні препарати готували із лімфоцитів периферійної крові, яку брали із яремної вени тварини. Для культивування клітин крові в лабораторії заготовляли стерильні флакони; фасували середовище RPMI-1640 (у стерильному боксі) приблизно по 5 мл у один флакон з 15-20 % - ною сироваткою крові великої рогатої худоби (бажано ембріональної). До культури додавали антибіотики з розрахунку 0,001 мл гентаміцину на 1 мл середовища, 0,5 мл цільної крові, а також мітоген - речовину, яка стимулює мітотичне ділення лімфоцитів у культурі. Фітогемаглютинін типу Р додавали у дозі 0,02 мл, типу М – 0,2 мл на 10 мл культуральної суміші. Суміш культивували в термостаті при температурі +37° С протягом 48-72 год., періодично струшуючи флакони. За дві години до фіксації в культуру вводили підігрітий до 37° С розчин колхіцину в кінцевій концентрації 0,3-0,5 мкг/мл культурального

середовища. Для гіпотонізації використовували свіжоприготовлений 0,55%-ний розчин хлористого калію. Гіпотонізацію проводили протягом 20 хв у термостаті при температурі +37° С. Після закінчення гіпотонізації культуру центрифугували, надсадкову рідину зливали, а до осаду обережно по стінці пробірки додавали охолоджену до +4° С фіксуєчу рідину, змішуючи одну частину льодяної оцтової кислоти з трьома частинами метилового (або етилового) спирту. Після цього осад ресуспендували і центрифугували, повторюючи цю операцію 2-3 рази. Суспензію клітин автоматичним дозатором із висоти 20-30 см наносили на чисті охолоджені предметні скельця. Висушували скло на повітрі. Отримані препарати, після їх фарбування готовим барвником Гімза, аналізували на предмет хромосомної мінливості під імерсійним збільшенням мікроскопа у 1000 разів і мікрофотографували [16].

У процесі досліджень враховували: кількісні порушення хромосом – анеуплоїдію (А), поліплоїдію (ПП), клітини із асинхронністю розщеплення центромірних районів хромосом (АРЦРХ), структурні аберації – розриви хромосом (ХР), Робертсонівську транслокацію (Rb-транслокація 1/29). На цих самих препаратах підраховували кількість двоядерних лімфоцитів (ДЯ) та одноядерних лімфоцитів із мікроядрами (МЯ), мітотичний індекс (МІ), апоптозні клітини. Частоту ДЯ, МЯ, МІ вираховували на 1000 клітин (%).

Результати досліджень: Сучасний масив червоної польської худоби господарства ПрАТ «Мшанецьке» створений у результаті систематичного використання племінного матеріалу споріднених червоних порід: червоної датської, естонської, бурої латвійської, англерської, в основному через завезених плідників. Особливістю тварин цього масиву є їх висока витривалість, добра пристосованість до умов вологого клімату і кормів, вирощених на кислих ґрунтах, висока оплата корму, здатність швидко відновлювати кондицію при виході на пасовище, значна тривалість продуктивного використання [17].

Як відомо, для вдосконалення цієї породи в Польщі використовувалися бугаї-плідники англерської породи і помісні, від схрещування тварин порід

польська червона, датська червона і англєрська. У зв'язку з цим, тварини червоної польської породи генетично досить неоднорідні [7].

Одержані результати цитогенетичного аналізу корів червоної польської породи української селекції господарства ПрАТ «Мшанецьке» показали, що для тварин характерні кількісні порушення каріотипу, зокрема анеуплоїдія, яка становить 30%. Відсоток анеуплоїдних клітин суттєво перевищує (у 3 рази) рівень спонтанної хромосомної мінливості за цією ознакою, характерною для тварин великої рогатої худоби [2]. Для повнішого вивчення причини появи метафаз із анеуплоїдією у лімфоцитах периферійної крові, досліджуваних тварин розділили на дві групи, відповідно до кількісного порушення хромосом (таблиця).

Аналіз каріотипу корів червоної польської породи за спонтанного мутагенезу

Група тварин	Кількісні порушення, анеуплоїдія, %	Хромосомні розриви, %	Лімфоцити із мікроядром, %	Двоядерні лімфоцити %	Мітотичний індекс, %	Апоптоз, %
I	19,1±4,35	8,3±8,00	2,1±1,22	2,6±0,80	5,1±0,66	7,4±2,6
II	52,0±2,030	2,0±2,0	4,8±1,25	5,0±1,06	6,6±0,75	8,8±2.2
M± m	30,0 ± 3,2	6,0 ±4,51	3,5±0,61	3,0±0,73	6,5±0,93	8,2±2.5

У тварин першої групи частка клітин з анеуплоїдією становила 10-25 %, середній показник – 19,1 %, у тварин другої групи – 52 %. Різниця середніх величин за цією ознакою виявилася статистично достовірною при $P > 0,999$. У двох груп тварин частка клітин із анеуплоїдією була значно вищою за спонтанний рівень (1,5-8,3 %) цієї мінливості [2]. На нашу думку, появі такої аномалії може передувати декілька причин. По-перше, корови червоної польської породи української селекції є дуже складними помісними тваринами, при створенні яких використовували багато порід [18]. Такі чинники селекційного процесу можуть призводити до підвищеного рівня кількісних порушень хромосом. Наша думка підтверджується дослідженнями проведеними вченими на міжвидових, міжпородних та чистопородних тваринах

великої рогатої худоби. Аналіз каріотипових характеристик показав, що загальне число клітин із абераціями у помісних тварин удвічі більше порівняно з чистопородними тваринами [5].

Структурні порушення хромосом у представників цієї породи проявилися у вигляді хромосомних розривів. Середня частота їх становила 6%. Це не перевищує рівня спонтанної хромосомної мінливості (0,17-11,1%), характерної для великої рогатої худоби [2]. Особливістю структурних порушень хромосом у тварин, яких досліджували, є те, що ця аберація проявилася лише у 20 % корів і розмах її мінливості становив 10-50%.

Ще однією із причин виникнення змін у хромосомному апараті корів можуть бути збудники туберкульозу. Оскільки, віруси, бактерії й інші мікроорганізми здатні спричиняти порушення апарату поділу клітин, змінюючи при цьому процес розходження хромосом, а також сприяти виникненню хромосомних аберацій [6], а в цьому господарстві були зареєстровані випадки захворювання на туберкульоз. На нашу думку, високий рівень хромосомних розривів у 20% тварин є результатом підвищеної чутливості до інфекційних процесів.

Для повнішої оцінки соматичного мутагенезу у корів господарства ПрАТ «Мшанецьке» використовували мікроядерний тест. За даними літератури, підвищена частота мікроядер (МЯ) у клітинах периферійної крові добре узгоджується із знайденою у них підвищеною частотою анеуплоїдії і тенденцією до відносно великої частоти метафаз із ХА, які є джерелом формування клітин із мікроядрами [9, 12]. Для тварин першої групи частота лімфоцитів із мікроядрами становила 2,1‰, що не перевищувала параметрів цитогенетичних показників великої рогатої худоби (lim 1,00-3,67‰) за спонтанного мутагенезу [5]. Для тварин другої групи частка клітин лімфоцитів із мікроядром становила 4,8‰, що у 2,2 рази більше порівняно з тваринами першої групи. Оскільки, наявність мікроядер у лімфоцитах периферійної крові є показником генотоксичного впливу на організм тварини [6], нами був проведений кореляційний аналіз для встановлення взаємозв'язку кількості лімфоцитів із анеуплоїдією і лімфоцитів із мікроядрами. Визначено помірно

виражену залежність між цитогенетичними показниками соматичних клітин для тварин першої групи $r=0,5035$ та сильно виражену залежність для тварин другої групи $r=0,7011$, але ці показники є невірними. Кореляційний аналіз показав середню силу зв'язку між лімфоцитами з мікроядрами і розривами хромосом. Частка апоптозних клітин у корів двох груп суттєво не відрізнялася, а середня величина її становила 8,2%, що в 4 рази більше за спонтанний рівень цитогенетичної мінливості [5]. За даними Ильинских при інфекційних процесах відбуваються апоптичні зміни в клітинах [6]. Середній показник частки двоядерних лімфоцитів у цьому стаді корів становив 3,0%, що характерно для тварин порід молочного напрямку умовно контрольної групи [14]. Проте у тварин другої групи частка двоядерних лімфоцитів була у 2 рази більшою порівняно з першою групою корів. Вчені припускають, що двоядерні клітини можуть виникати як компенсація дії генотоксичних агентів для підтримки генотоксичного балансу в популяціях [5].

Паратиповий чинник (сірководень у воді) може призвести до підвищення анеуплоїдії та хромосомних розривів у тварин цього господарства. Проте це не може бути однією із основних причин виникнення мутацій, оскільки у тварин відбуваються коадаптаційні процеси до умов їх утримання. Вплив води із підвищеним вмістом сірководню на стабільність каріотипу у корів потребує подальшого вивчення.

Вивчення нестабільності каріотипу популяції тварин, яких розводили у Польщі, показало наявність робертсонівської транслокації 1/29, частота якої становила 14%. Це конститутивне цитогенетичне порушення не було виявлене у корів червоної польської породи української селекції господарства ПрАТ «Мшанецьке». Аналіз літературних джерел [8,7] щодо поширення транслокації 1/29 у тварин порід у різних країнах світу показав, що у корів порід червона датська та англійська робертсонівська транслокація 1/29 не зареєстрована. Отже у тварин червоної польської породи, яку розводили на території Польщі протягом 1964-1998 р.р. робертсонівська транслокація виникла «denovo». Однією з причин такої мутації можуть бути токсичні речовини хімічної природи, які забруднювали Балтійське море і негативно впливали на

навколишнє середовище цієї країни. Адже 1946-1948 р.р. – це період затоплення у Балтійському морі понад 400 тис. тонн хімічної зброї гітлерівського вермахта. Природна розгерметизація бомб із хімічним наповнювачем відкрила рахунок формуванню прихованих наслідків для структури і функцій геному у європейського населення і у сільськогосподарських тварин [11].

Висновки

1. При породотворчому процесі цитогенетичний контроль є необхідним як маркер, який характеризує стабільність каріотипу тварин.

2. Серед досліджених тварин червоної польської породи української селекції виявлено підвищення кількісних порушень хромосом (анеуплоїдії) у 3 рази порівняно з рівнем спонтанної хромосомної мінливості.

3. Структурні порушення хромосом (хромосомні розриви) проявилася у 20% тварин і розмах мінливості становив 10-50%.

4. Причиною виникнення хромосомної мінливості у тварин червоної польської породи української селекції можуть бути породотворчі процеси, інфікованість тварин збудником туберкульозу, а також дія паратипових чинників (якість води). Вплив води із підвищеним вмістом сірководню на стабільність каріотипу потребує подальшого вивчення.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Розведення сільськогосподарських тварин / [Басовський М.З., Буркат В.П., Вінничук В.П. та ін.]; під ред. М.З. Басовського. – Біла Церква: Білоцерківський державний аграрний університет, 2001. – 399 с.

2. Визначення генетичних аномалій у великої рогатої худоби: методичні рекомендації [М.І. Бащенко, К.В. Копилов, М.Л. Добрянська та ін.] – Чубинське: НДІ розведення тварин. - 2011. – 35 с.

3. Глазко Т. Т. Частоты встречаемости цитогенетических аномалий в клетках крови крупного рогатого скота разных направлений продуктивности при

действиинизких доз ионизирующего излучения / Т. Глазко, С. Е. Дубицкий, Г. Ю. Косовский // Сельскохозяйственнаябиология. – 2007. - №6. – С. 58-62.

4. Дзіцюк В.В. Хромосомний поліморфізм окремих видів і порід сільськогосподарських тварин : автореф. дис. на здобуття наук. ступеня доктора с.-г. наук : спец. 03.00.15 « Генетика» / В.В. Дзіцюк. – Чубинське, 2009. – 30 с.

5. Джус П.П. Видоспецифічність дестабілізації каріотипів сільськогосподарських тварин за радіаційного та інфекційного впливу : автореф. дис. на здобуття наук. ступеня канд. біол. наук : спец. 03.00.15 «Генетика» / П.П. Джус. – К., 2012. – 20 с.

6. Ильинских Н.Н. Использование микроядерного теста в скрининге и мониторинг емутagens / Н. Н. Ильинских, И. Н. Ильинских, В. Н. Некрасов // Цитология и генетика. – 1988. – № 1. – С. 67–72.

7. Ewa Slota Chromosome aberrations in cattle / Ewa Slota // Biuletyn informacyjny IZ, R. XXXV – 1997, – №4. – P 17-27.

8. Качура В. С. Хромосомные нарушения у крупного рогатого скота (BOS TAURUS L.) / В. С. Качура // Цитология и генетика. — 1982. — № 4. — С. 60—70.

9. Kovaks G.B., Sadah, Hoene E. Binucleate cells in a human renal cell carcinoma with 34 chromosome/ G.B. Kovaks, Sadah, E. Hoene //Cancer Genet. Cytogenet. - 1988. - 31. - P. 211-216.

10. Ковалева О. А. Цитогенетические аномалии в соматических клетках млекопитающих / О. А. Ковалева // Цитология и генетика. — 2008. — № 1.— С. 58–72

11. Коновалов В.С. Эколого-генетический бумеранг 50 лет спустя (история, состояние и возможные генно-протеомные диагностики) / В.С. Коновалов // Матеріали Міжнародної конференції «Зелена» економіка: перспективи впровадження в Україні, 24-25 квітня 2012 р. – К., 2012. – С.384-388.

12. Relationship between genotoxicity biomarkers in somatic and germ cells: findings from a biomonitoring study / [Migliore L., Colognato R., Naccarati A. et.al.] // Mutagenesis. – 2006. – №21 (2) P.149-152

13. Селекція сільськогосподарських тварин / [Мельник Ю.Ф., Коваленко Ю.П., Угнівенко А.М. та ін.]; під ред. Ю.Ф. Мельника, В.П.Коваленка, А.М.Угнівенка. – К., 2008. – 445 с.

14. Сафонова Н. Меж – и внутр. породная цитогенетическая нестабильность у крупного рогатого скота / Н. Сафонова, Т. Глазко // Збірник наукових праць інституту агроєкології та біотехнології УААН – 2000. - № 4. – С.198-209.

15. Семенов А.С. Цитогенетический скрининг в различных популяциях голштинизированного скота: автореф. дис. на соискание ученой степени доктора сельскохозяйственных наук. спец. 06.02.07 «Разведение, селекция и генетика сельскохозяйственных животных» / А.С. Семенов. — Новосибирск, 2010. — 16 с.

16. Шельов А.В. Методика приготування метафазних хромосом лімфоцитів периферійної крові тварин / А. Шельов, В. Дзіцюк. – К.: Аграрна наука, 2005. -240с.

17. Ящук Т. Адаптаційна здатність і природна резистентність помісних корів червоної польської породи / Т. Ящук, Я. Стравський // Розведення і генетика тварин. – 2012. - № 46. – С.119-122.

18. Ящук Т. Перспективи використання у селекційному процесі наявного масиву худоби червоної польської породи [Електронний ресурс]: тези конференції. / Т.Ящук, Б.Тихонова // Статті» конф. 20-21. 10. 2011 р.» секція 1 Сільськогосподарські науки. – Режим доступу. : http://confiapv.at.ua/publ/konf_20_21_shovtnja_2011_r/sekcija_1_silskogospodarski_nauki/perspektivi_vikoristannj... 10.02.2013

ЦИТОГЕТИЧЕСКИЙ КОНТРОЛЬ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА КРАСНОЙ ПОЛЬСКОЙ ПОРОДЫ

Л.Ф. СТАРОДУБ

Проведен цитогенетический мониторинг коров красной польской породы украинской селекции. Установлено хромосомная изменчивость: повышенные количественные нарушения хромосом (анеуплоидия) в 3 раза по сравнению с

уровнем спонтанной изменчивости и структурные нарушения (хромосомные разрывы) у 20% животных в пределах 10-50%.

Ключевые слова: красная польская порода, цитогенетический контроль, анеуплоидия, структурные нарушения хромосом, микроядерный тест.

CYTOGENETIC CONTROL OF CATTLE OF RED POLISH BREED

L.F. Starodub

A cytogenetic monitoring of local Polish red cattle breed of Ukrainian selection was held. The chromosome variation was established: increasing quantity of violations of chromosomes (aneuploidy) in a 3-fold compared with the level of spontaneous variability and structural abnormalities (chromosome breaks) in 20% of animals with scale variation of 10-50%.

Keywords: Red Polish breed, cytogenetic control, aneuploidy, structural abnormalities of chromosomes, micronucleus test.