

CITOGENETINIAI GALVIJŲ TYRIMAI

Natalija Krasnopiorova, Ilona Miceikienė

*Lietuvos veterinarijos akademija, Gyvūnų veisimo ir genetikos katedra,
K. Janušausko gyvūnų genetikos laboratorija, Tilžės g. 18, Kaunas, LT-47181; el. paštas:natalija@lva.lt*

Santrauka. Norint planingai gerinti ūkiškai naudingas galvijų savybes, reikia pakankamai turėti labai produktyvių ir ypatingomis veislinėmis savybėmis pasižyminčių reproduktorių. Pradėjus taikyti stambaus masto selekcijos priemones, vertingiausiais buliais galima gerinti dideles gyvulių grupes, todėl vieno buliaus vaidmuo labai išauga. Masiškas bulių gerintojų ir jo palikuonių panaudojimas gali ne tik pagerinti palikuonių produktyvumą, bet ir išplatinti recesyvines užslėptas anomalijas. Dalį šių genetinių anomalijų galima nustatyti atliekant citogenetinę chromosomų analizę. Šio darbo tikslas buvo ištirti chromosomų skaičiaus ir struktūros pokyčius bei įvertinti veislės įtaką chromosominių aberacijų dažniui tarp veislinių buliukų. Ištyrus Panevėžio veislininkystės buliukus, paveldimų chromosomų skaičiaus ar struktūros pakitimų nerasta. Rastas vidutinis chromosominių aberacijų dažnis – 0,04 aber./ląst., vidutinis pakitusių ląstelių kiekis – 13,04 proc. Dažniausiai sutinkama chromosominė aberacija buvo chromatidžių trūkiai. Veislė apsprendžia 32,6 proc. aberacijų dažnio, 29,1 proc. spragų dažnio įvairavimo.

Raktažodžiai: chromosoma, kariotipas, chromosominės aberacijos.

CYTOGENETICAL CATTLE INVESTIGATIONS

Natalija Krasnopiorova, Ilona Miceikienė

Lithuanian Veterinary Academy, Department of Animal Breeding and Genetics, K. Janušauskas Laboratory of Animal Genetics, Tilžės 18, Kaunas LT-47181, Lithuania, E-mail: natalija@lva.lt

Summary. In order to make methodical improvement of farm animal traits it is necessary to have sufficient number of very productive high breeding value sires. While using broad scale selection tools, with high value bulls it is possible to improve large herds of animals so the role of one sire grows significantly. The usage of such bulls and their progeny on large scale can improve not only production but also can distribute recessive hidden anomalies. Part of these genetic anomalies is possible to test by cytogenetical analysis of chromosomes. The aim of this study was to test deviations of chromosome number and structure and to evaluate breed influence to the frequency of aberrations between young sires. Heritable deviations of chromosome number or structure have not been found between young bulls kept in enterprise "Panevėžys". The mean number for chromosome aberrations was 0.04 aber./cell, the mean number of cells with deviations 13.04 %. The most frequent chromosome aberration was found to be chromosome gap. The breed influences 32.6 % variation of chromosome frequency, 29.1 % of gaps frequency variation.

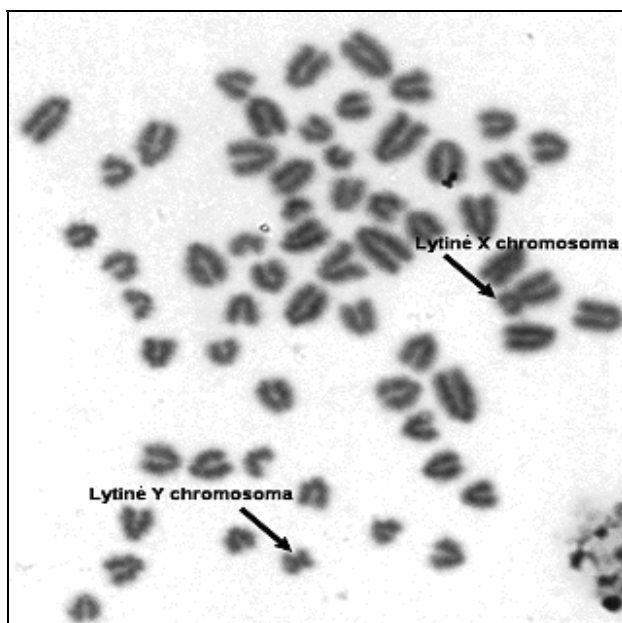
Key words: Chromosome, karyotype, chromosome aberrations.

Įvadas. Kaip rodo mokslininkų tyrimai, reproduktorių vertinimas pagal fenotipinius požymius ir palikuonių savybes dar ne visai atspindi reprodukcinės savybes, jų įtaką embrioniniam mirtingumui ir veršelių išėigai (Rieck, 1984; Dain, Bridge, 1978). Tą galima nustatyti tik atlikus specialius genotipo tyrimus. Bulių genotipe galimi įvairūs chromosomų skaičiaus ir struktūros pokyčiai. Tarp galvijų dažniausiai nustatomos lytinių chromosomų anomalijos ir pirmos bei dvidešimt devintos chromosomų susijungimai – translokacijos (Gustavsson, 1979; Schmutz et al., 1994). Šie chromosomų pakitimai turi įtakos apvaisinimo galiai, embrionų mirtingumui ir palikuonių produktyvumui (Norberg et al. 1976). Kadangi minėtos anomalijos paveldimos, bulių atrinkti ir genetinius defektus įvertinti galima atlikti jauname amžiuje. Citogenetiniai gyvulių tyrimai gali būti panaudoti ne tik išaiškinant genetinių anomalijų platintojus, bet ir kuriant produktyvias linijas, tipus, ieškant genetinių chromosominių žymenų.

Medžiagos ir metodai. Mėginiai citogenetiniams tyrimams paimti iš 77 veislinių buliukų Panevėžio veislininkystės įmonėje. Tyrimai atlikti Lietuvos veterinarijos akademijoje, K. Janušausko gyvūnų genetikos laboratorijoje. Tyrimui kraujas imtas į sterilius vakuuminius mėgin-

tuvėlius su heparinu (MBI Fermentas, Lietuva VT100H). Ruošiant chromosomų preparatus, kraujo mėginiai 72 val. kultivuoti terpėje RPMI-1640 MEDIUM (Sigma, USA) su mitogenu lektinu (Sigma, USA). Limfocitų kultūra buvo apdorota kolchicinu (Sigma, USA), vėliau – hipotoniniu tirpalu (Sigma, USA 0,075 M KCl). Chromosomos buvo fiksuotos metanolio ir ledinės acto rūgšties mišiniu (3:1). Prieš vertinant chromosomas buvo dažomos Gimzos dažais (Sigma, USA, 0,4 proc.). Chromosomų preparatai tirti ir analizuoti optiniu mikroskopu „Nikon“ su imersiniu objektyvu. Kiekvienam individui buvo tiriami po 100 metafazių ir stebimi bei registruojami šie kokybiniai ir kiekybiniai chromosomų pokyčiai: poliploidija ($3n$, $4n$...), aneuploidija ($2n \pm 1,2$...), chromosominės aberacijos – chromatidžių trūkiai (delecija D_1), chromosomų trūkiai (delecija D_2), fragmentai (F_1 , F_2), žiedinės chromosomos (Z), dicentrikai (Dic), spragos (S_1 , S_2).

Statistinė duomenų analizė. Atliekant statistinę duomenų analizę buvo apskaičiuoti šie rodikliai: bendras procentas pakitusių ląstelių; chromatidžių trūkiai proc.; chromosomų trūkiai proc.; fragmentų proc.; spragų proc.; žiedinių chromosomų ir dicentrikų procento aberacijų skaičius, tenkantis vienai ląstelei.



1 pav. Buliaus kariotipas be pakitimų (autorė N. Krasnopiorova)

Veislės įtaka chromosominių aberacijų kiekiui įvertinta vienfaktorinės dispersinės analizės būdu. Statistinė duomenų analizė atlikta R paketu (Gentlemen, Ihaka, 1997).

Tyrimų rezultatai. Ištirus galvijų chromosomas rasta, kad naminių galvijų kariotipą ($2n$) sudaro 60 chromosomų: 58 autosomos ir dvi lytinės chromosomos. Karvės chromosomų rinkinio citogenetinė formulė yra $2n = 60 = 58 A + XX$, o buliaus $2n = 60 = 58 A + XY$. Kariotipą sudaro 29 poros akrocentrinių autosomų; X chromosoma yra didelis submetacentrikas, Y chromosoma – mažas submetacentrikas (1 pav.). Tikslią homologinių chromosomų identifikaciją galima nustatyti atlikus chromosomų diferencinį dažymą.

Citogenetinius tyrimus atlikome 77 veisliniams buliukams. Kiekvienam ištirta po 100 chromosominių metafazinių plokštelių, iš viso – 7700 metafazinių chromosomų. Jei chromosomų skaičiaus ar struktūros pokyčiai randami visuose 100 kariotipų, tai toks chromosomų pakitimas yra paveldimas, ir tokie gyvuliai turi būti brokuojami ir eliminuojami, kad sėklinant bulių sperma neišplatintų genetiškai defektų galvijų populiacijoje.

Chromosominių aberacijų dažnis tarp tirtų individų įvairavo nuo 0 iki 0,09 aber./ląst., spragų – nuo 2 iki 17 proc. Vidutinės tirtos imties aberacijų dažnis buvo 0,04 aber./ląst., atskirų individų ląstelių su pakitimais įvairavo nuo 3 iki 28 proc., vidutinis imtyje – 13,04 proc. (Lentelė).

Lentelė. Veislinių buliukų chromosomų aberacijų dažnis

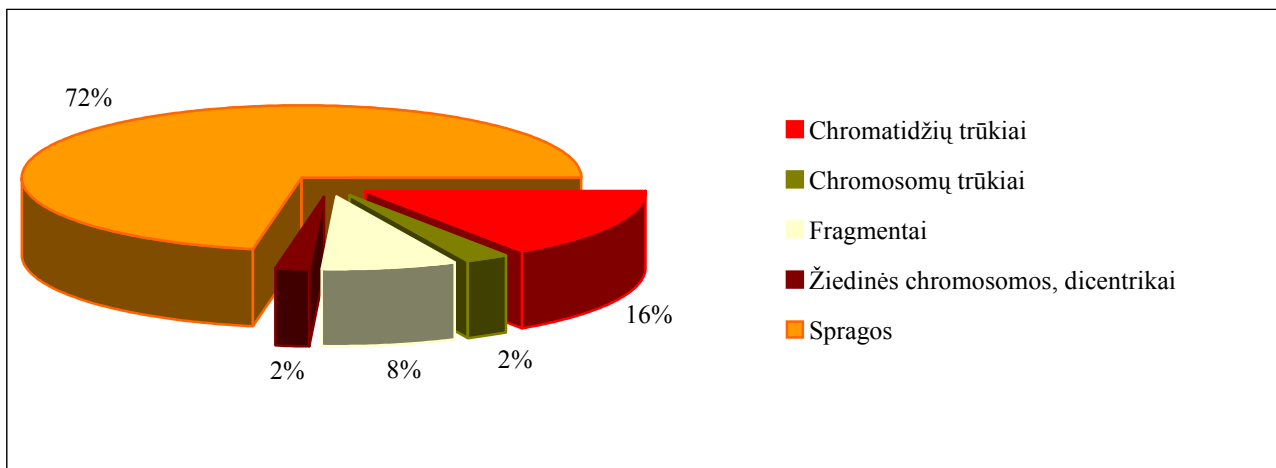
Rodikliai	Bendras pakitusių ląstelių skaičius, %	Chromatidžių trūkiai, %	Chromosomų trūkiai, %	Fragmentai, %	Žiedinės chromosomos, dicentrikai, %	Aberacijų skaičius vienai ląstelei, %	Spragos, %
Vidurkis	13,04	1,92	0,34	0,96	0,29	0,04	9,51
Vidurkio paklaida	0,62	0,15	0,07	0,13	0,06	0,00	0,49
Standartinis nuokrypis	5,43	1,35	0,57	1,12	0,51	0,02	4,28
Įvairavimo koeficientas	8,77	8,77	8,77	8,77	8,77	8,77	8,77

Ištirus chromosominių aberacijų spektrą, chromatidžių trūkiai sudarė 16 proc., fragmentai – 8 proc., o chromosomų trūkiai ir žiedinės chromosomos – po 2 proc. (2 pav.).

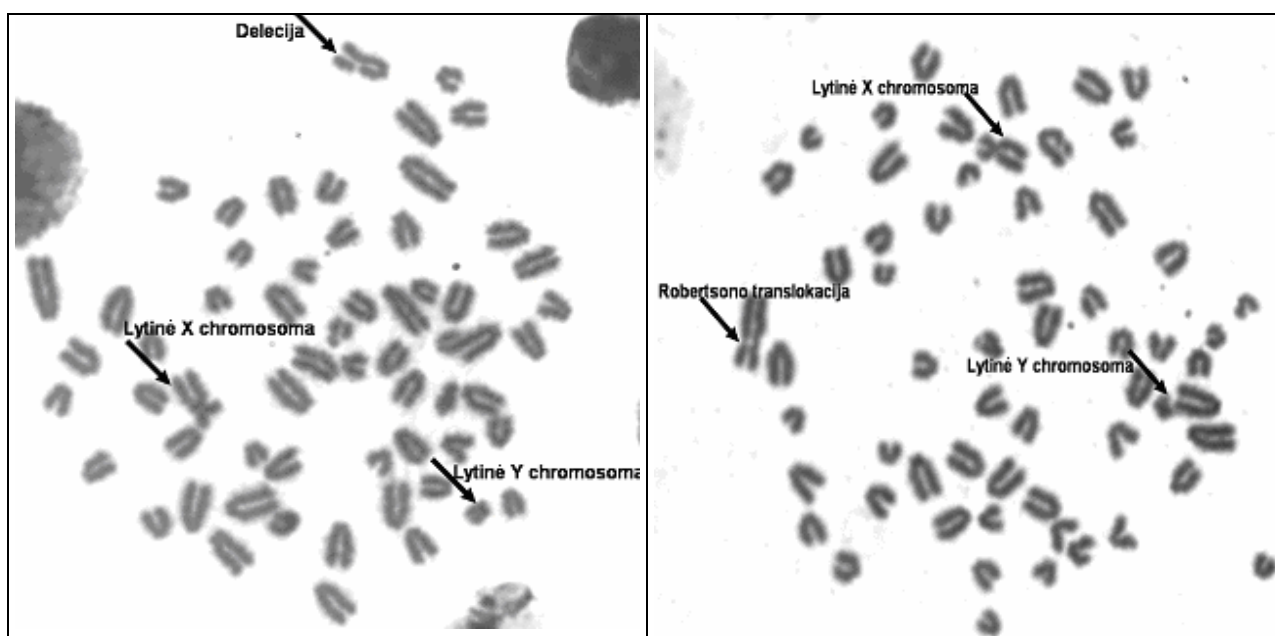
Net 72 proc. visų rastų pažaidų sudarė spragos – t.y. nevisiškas chromosomos struktūros pažeidimas, kuris yra reparuojamas arba išsivysto į chromosomines ar chromatidines delecijas (3 pav.). Didelis spragų kiekis byloja apie genomo nestabilumą.

Tarp atskirų individų šis procentas siekia net 16–17.

Nė vienam iš mūsų tirtų bulių nebuvo rasti chromosomų skaičiaus ar struktūros pakitimai visuose tirtose to gyvulio ląstelėse (100 ląstelių), todėl nė vienas iš jų chromosominių defektų neperduos palikuonims. Remiantis ankstesniais mūsų tyrimų rezultatais, dviem buliams buvo rasta 1/29 Robertsono translokacija (4 pav.), du buliai mozaikiški (XY/XXY ir 1 XY/XYY) ir dviem atvejais rastas ląstelių su XX/XY lytinių chromosomų deriniais chimerizmas (Janušauskas ir kt., 1994).

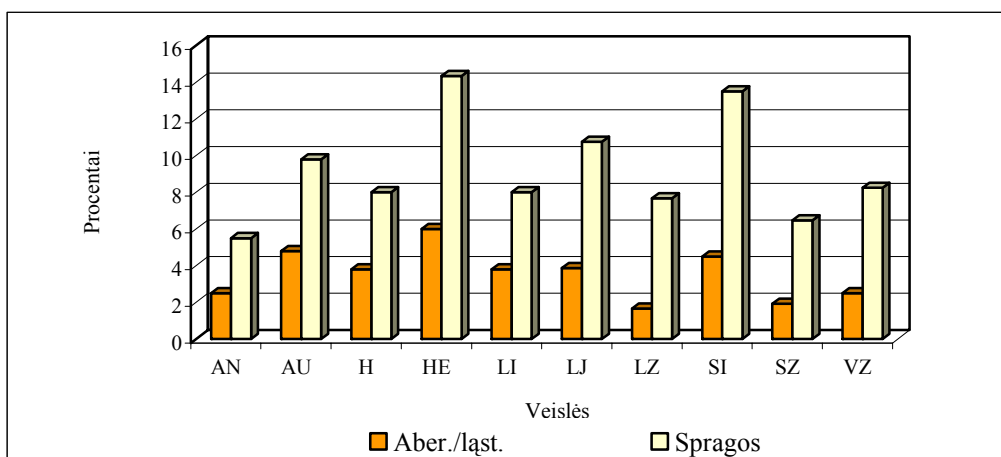


2 pav. Galvijų chromosominių aberacijų dažnis



3 pav. Pakitęs buliaus kariotipas: delecija (autorė N. Krasnopiorova)

4 pav. Pakitęs buliaus kariotipas: 1/29 chromosomos Robertsono translokacija (autorė N. Krasnopiorova)



5 pav. Skirtingų veislinių buliukų chromosominių aberacijų dažnis

Mūsų tiriami gyvuliai buvo laikomi vienodomis sąlygomis, juos veikė vienodi aplinkos faktoriai, be išsiskiriančio mutageno, todėl tyrėme bendrą individų aberacijų dažnį. Vienfaktorinės dispersinės analizės būdu įvertinome veislės įtaką chromosominių aberacijų dažniui. Mūsų tyrimų duomenimis, veislė apsprendžia 32,6 proc. ($p < 0,01$) aberacijų dažnio, 29,1 proc. ($p < 0,01$) spragų dažnio ir 38,2 proc. ($p < 0,01$) bendro pakitusių ląstelių dažnio (5 pav.).

Aptarimas ir išvados. Galvijų, kaip ir kitų žemės ūkio gyvulių, populiaciniai citogenetiniai tyrimai nėra labai dažnai atliekami, nes yra imlūs laikui ir lėšoms. Literatūros duomenimis, Prancūzijoje ištirta apie 5000 galvijų (Frebling et al., 1987), Šveicarijoje (Tschudi, 1984) ir Vengrijoje (Kovac, 1984) – po 3000 gyvulių. Jungtinėse Valstijose 2000 galvijų ištyrė N. S. Fehheimer (1973) ir F. E. Eldrige (1984), Australijoje 1100 galvijų tyrė C. R. Halnan (1976). Afrikoje ištirta tik 500 galvijų (Popescu and Legault, 1979; Nel et al., 1995), Pietų Amerikoje – maždaug tiek pat (Moraes et al., 1980; Pinheiro et al., 1981), Lietuvoje – apie 2000 (Janušauskas ir kt., 1996; Miceikienė ir kt., 1994).

Chromosominių aberacijų dažnis nerodo gyvulio sveikatingumo būklės tiesiogiai, bet nusako organizmo geno nestabilumą, tačiau tiek literatūros (Bongso, 1976; Galloway, Norman, 1976; Gustavsson, 1980; Hare, Singh, 1979), tiek mūsų tyrimų duomenimis, didelis ląstelių su spragomis skaičius koreliuoja su blogomis galvijų reprodukcinėmis savybėmis. Daug ląstelių su spragomis (21proc.) rasta karvių servis periodu (Miceikienė ir kt., 1996; Janušauskas ir kt., 1991). Terminalinių chromatidžių delecijų, apimančių daugelį chromosomų, dažnai aptinkama nuolat abortus patiriančių karvių ląstelėse. Be to, nustatyta, kad karvės, kurioms itin dažnos chromosomų aberacijos, yra nevaisingos.

Chromosomų aberacijų dažnį atskiram gyvuliui gali sukelti įvairūs veiksniai – radiacija, cheminės medžiagos, aplinkos tarša, kartu chromosomų dažnis randamas ir visoje gyvulių populiacijoje. Literatūros duomenimis, chromosominių aberacijų dažnį, be organizmo individualių savybių, veikia galvijų amžius ir veislė (Мицейкене, 1992). Kuo gyvuliai vyresni, tuo chromosominių aberacijų dažnis didesnis, nes ląstelės su amžiumi praranda chromosomų pažaidų reparacines savybes. Tačiau mes šio rodiklio savo tyrimais negalėjome įvertinti, nes visi tirti gyvuliai buvo vienos lyties ir vienodo amžiaus. Vienfaktorinės dispersinės analizės būdu įvertinome veislės įtaką chromosominių aberacijų dažniui. Mūsų duomenimis, veislė statistiškai reikšmingai darė įtaką visų rūšių chromosominių aberacijų kiekiui.

Išvados.

- Ištyrus Panevėžio veislininkystės buliukus, paveldimų chromosomų skaičiaus ar struktūros pakitimų nerasta.
- Rastas vidutinis chromosominių aberacijų dažnis – 0,04 aber./ląst., vidutinis pakitusių ląstelių kiekis – 13,04 proc. Dažniausiai nustatyta chromosominė aberacija buvo chromatidžių trūkiai. Veislė apsprendžia 32,6 proc. aberacijų dažnio, 29,1 proc. įvairuojančio spragų dažnio.
- Aukštas chromosominių aberacijų dažnis kai ku-

riuose gyvuliuose rodo potencialią problemą, kuri gali būti susijusi su pablogėjusiomis reprodukcinėmis savybėmis ir spermos kokybe.

Literatūra

1. Bongso T. A. A review of chromosomal anomalies and their clinical importance in cattle. *Ceylon Veterinary*. 1976. (24). P. 13–17.
2. Dain A. R., Bridge P. S. A chimeric calf with XX/XXY mosaicism and intersexuality. *J. Reprod. Fert.* 1978. (54). P. 197–201.
3. Eldridge F. E. A dicentric Robertsonian translocation in a Dexter cow. *J. Hered.* 1984. (65). P. 353–355.
4. Fehheimer N. S. A cytogenetic survey of young bulls in the USA. *Vet. Rec.* 1973. (93) P. 535–536.
5. Freibling J., Foulley J. L., Berland H. M., Popescu C. P., Cribiu E. P., and Darre R. Results de l'enquete sur la frequence de la translocation 1/29 en race bovine Blonde d'Aquitaine. *Bull. Tech. CRZV INRA*. 1987. (67). P. 49–58.
6. Galloway D. B., Norman J. R. Testicular hypoplasia and autosomal secondary constrictions in bulls. *Proceedings on the 8th International Congress on Animal Reproduction and Artificial Insemination, Krakow*. 1976. (4). P. 710–713.
7. Gentlemen R., Ihaka R. Notes on R: A programming environment for data analysis and graphics. Department of statistics Unerversity of Auckland. 1997.
8. Gustavsson I. Chromosome aberrations and their influence on the reproductive performance of domestic animals – a review. *Z. Tierzuchtg. Zuchtungsbiol.* 1980. (97). P. 176–195.
9. Gustavsson I. Cytogenetics of farm animals. Distribution and effects of the 1/29 Robertsonian translocation in cattle. *J. Dairy Sci.*, 1979. (62). P. 825–935.
10. Halnan C. R. E. Autosomal deletion and infertility in cattle. *Veterinary Record*. 1976. (91). P. 572.
11. Hare W. C. D., Singh E. L. Cytogenetics in animal reproduction. Commonwealth Agric. Breaux, Slough, England. 1979. P. 96.
12. Janušauskas K., Jakutis V., Miceikienė I., Veislinių bulių citogenetiniai tyrimai. Lietuvos veterinarijos akademijos mokslo darbai. 1991. (20). P. 44–49.
13. Janušauskas K., Miceikienė I., Jakutis V., Mikelionis A. Cytogenetic monitoring of cattle under the condition of environmental pollution. *Biologija*, 1994. (15).
14. Janušauskas K., Miceikienė I., Jakutis V., Reinytė R. Cytogenetical testing of bulls in Lithuania. *Baltic Animal Breeding Conference*. 1996. P. 65–66.
15. Kovac A. Progress in eradication of the 1/29 translocation of cattle in Hungary. *Eur. Collog. Cytogenet. Domest. Anim.*, 6th, Zurich. 1984. P. 52–58.
16. Miceikienė I., Janušauskas K. Kėdainių chemijos gamyklos ir Lietuvos elektrinės teršalų genotoksinis poveikis gyvuliams. *Veterinarija ir zootechnika*. 1996. T. 2 (24).
17. Miceikienė I., Maciulevičiūtė L., Dudzevičius J., Lekevičius R., Morkūnas V. The influence of environmental industrial hazards to living organisms. *Symposium Noeld Ecology, Canada, Ontario*. 1994.
18. Moraes J. C. F., Mattevi M. S., Salzano F. M., Poli J. L. E. H., and Erdtmann B. A cytogenetic survey of five breeds of cattle from Brazil. *J. Hered.* 1980. (71). P. 146–148.
19. Nel N., D., Harris E. J., Weiermans S. J. E., and Meyer E. H. H. A 1/29 chromosome translocation in Southern African Nguni cattle. *Genet. Sel. Evol.* 1995. (17). P. 293–302.

20. Norberg H. S., Refsdal A. O., Garm O. N., Nes, N. A case report on X – trisomy in cattle. *Hereditas*. 1976. (82). P. 69–72.
21. Pinheiro L. E. L., Ferrari I., Ferraz J. B. S., and Lobo R. B. High frequency of Robertsonian translocation in a Brazilian cattle breed. *Rev. Bras.* 1981. (4). P. 657–665.
22. Popescu C. P., and Legault C. Une nouvelle translocation reciproque t(4q+;14q-) chez le porc domestique (*Sus scrofa domestica*). *Ann. Genet. Sel. Anim.* 1979. (11). P.361–369.
23. Rieck, G. W. "Allgemeine veterinarmedizinische und allgemeine Teratologie." Enke, Stuttgart. 1984.
24. Schmutz S. M., Barth A. D., and Moker J. S. Klainefelter bull with a 1/29 translocation born to a fertile 61, XXX cow. *Can Vet J.* 1994 March; 35 (3). P. 182–184.
25. Tschudi P. 12 Years of cytogenetic investigation in AI bulls in Switzerland. *Eur. Collog. Cytogenet. Domest. Anim.*, 6th, Zurich. 1984. P. 40–42.
26. Мицейкене И. Исследование влияния биологических и экологических факторов на стабильность генома крупного рогатого скота. Автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата биологических наук. Санкт-Петербург-Пушкин. 1992.