

Monitoring kariotypu koni pod kątem diagnozy wad genetycznych*

Monika Bugno, Ewa Słota

*Instytut Zootechniki- Państwowy Instytut Badawczy,
Dział Immuno- i Cytogenetyki Zwierząt, 32-083 Balice k. Krakowa*

Hodowla koni w Polsce ma długoletnie tradycje i istotne osiągnięcia. Szereg polskich koni, a szczególnie rasy arabskiej, należało do czołówki światowej, jak na przykład ogiery Witeź II i Nabor. Powszechnie znane są polskie stadniny koni w Janowie Podlaskim, Michałowie, Kurozwałkach, Golejewku, Białce i in.

Kształtowanie się wartości konia jest odmienne niż u pozostałych gatunków zwierząt gospodarskich. Znaczną rolę odgrywa ocena eksterieru zwierzęcia, piękno jego budowy, cechy charakteru oraz osiągane przez niego sukcesy sportowe. Ocena wartości rozplodowej odbywa się na ogół w późniejszym okresie życia konia.

Ogiery stają się zdolne do skutecznego krycia w wieku około 23-27 miesięcy. U klaczy pierwsze jajczkowanie obserwuje się w wieku 10-12 miesięcy. Przyjmuje się jednak, że dojrzałość hodowlaną, zależnie od rasy, uzyskują klacze mające 2-5 lat. Płodność koni jest relatywnie niższa niż innych gatunków zwierząt domowych, są to bowiem zwierzęta jedнопłodowe. U klaczy, w porównaniu do innych gatunków zwierząt, wskaźnik zapłodnień jest wysoki i wynosi podczas całego sezonu rozrodczego (u zdrowych klaczy) około 90%. Procent wyżrebien jest jednak znacznie niższy, waha się od 50 do 60% i tylko wyjątkowo może osiągnąć poziom 80%. W jednym cyklu uzyskuje się z reguły 53-56% zażrebien.

Nieprawidłowości liczby lub morfologii chromosomów prowadzą często do śmierci zarodkowej lub okołoporodowej, względnie do ob-

niżenia płodności ich nosicieli. Mogą one powstawać „*de novo*” lub być dziedziczone po rodzicach. Ze względu na wymierne straty ekonomiczne spowodowane nosicielstwem nieprawidłowości kariotypu diagnozy cytogenetyczne mają ogromną wagę dla hodowli zwierząt gospodarskich. W przypadku wystąpienia u klaczy zaburzeń płodności hodowca ponosi bowiem znaczne straty związane z utrzymaniem, próbami zażrebienia lub ewentualnymi próbami leczenia hormonalnego, podejmowanymi czasami w tych przypadkach.

Szerokie zastosowanie badań cytogenetycznych zwierząt w praktyce hodowlanej zaowocowało identyfikacją wielu nieprawidłowości chromosomowych, których efekty polegały często na obniżeniu płodności ich nosicieli. Stwierdzono również, że pewnego rodzaju nieprawidłowości chromosomowe występują z większym nasileniem u konkretnego gatunku.

U koni najczęściej stwierdza się aberracje związane z liczbą chromosomów płciowych. Aneuploidie te są spowodowane wystąpieniem zjawiska *non-disjunctio* podczas podziału komórki i powodują odchylenia od prawidłowego rozwoju osobnika - nosiciela takiej nieprawidłowości.

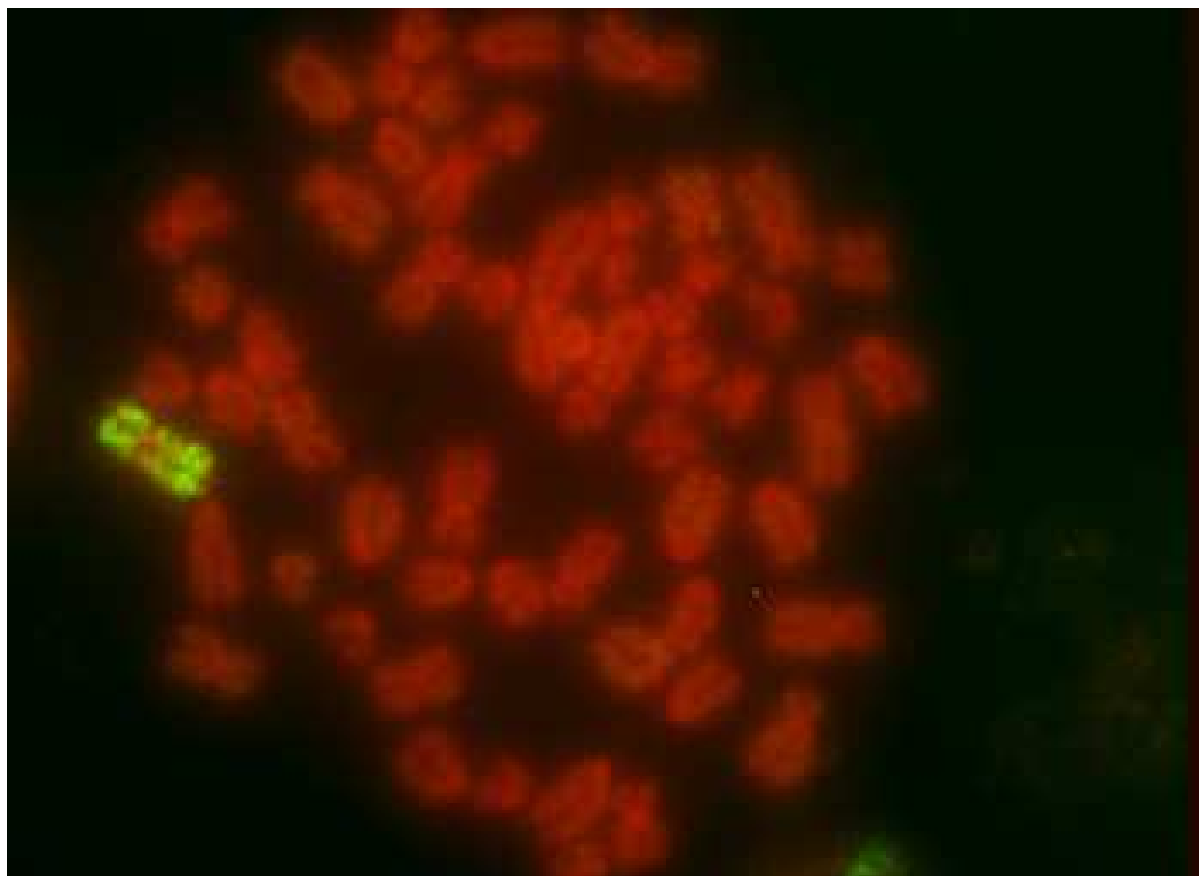
W rezultacie prawidłowego przebiegu mejozy u klaczy, komórka jajowa i ciałka kierunkowe zawierają haploidalne zestawy chromosomów, w tym po jednym chromosomie płci X. Mejoza u ogiera prowadzi do powstania dwóch populacji plemników - jednej, zawierającej haploidalny garnitur autosomów wraz z chromosomem płci X i drugi, niosącej oprócz haploidalnego kompletu autosomów chromosom płci Y. Nierównomierny rozdział chromosomów płci

* Praca wykonana w ramach tematu wieloletniego nr 6011.9.

w niektórych komórkach, przechodzących proces gametogenezy, doprowadza do wytworzenia gamet z nadliczbowymi heterochromosomami lub nie posiadających heterosomu.

Nieprawidłowe pod względem zestawu chromosomów, gamety nie różnią się od gamet prawidłowych ani morfologicznie, ani też pod względem zdolności do zapłodnienia. W wyniku zapłodnienia gamety z nieprawidłową, aneuplo-

idalną liczbą chromosomów normalną gametą powstają zygoty, charakteryzujące się nadmiarem lub niedoborem materiału genetycznego, a rozwijający się z nich zarodek z reguły obciążony jest zespołem wad rozwojowych. W przypadku nieprawidłowej liczby chromosomów płci następują zaburzenia w kształtowaniu się gonad, czego konsekwencją jest niewłaściwy rozwój układu rozrodczego.



Płytkę metafazową klaczy, karyotyp 63,X - *Metaphase plate of a mare, 63,X karyotype*

Kolejną pod względem częstości występowania anomalią chromosomową jest tzw. „odwrócenie płci”. Przyczyną tych defektów jest przypuszczalnie delecja fragmentu chromosomu Y lub defekt autosomalnego genu współdecydującego o rozwoju układu rozrodczego, jak również mutacja genu w chromosomie X.

U koni zdiagnozowano również przypadki wystąpienia dwóch linii komórkowych, różniących się zestawem chromosomów płci XX i XY, będących efektem ciąży bliźniaczej różnopłciowej, przypominającym etiologicznie fry-

martynizm u bydła. Również u koni obserwuje się występowanie anastomoz naczyniowych pomiędzy błonami płodowymi bliźniąt. Konsekwencją tych połączeń jest obecność u osobników urodzonych z ciąży mnogich chimeryzmu komórkowego we krwi, który może wpływać niekorzystnie na płodność nosicieli (głównie klaczy), pochodzących z bliźniąt różnopłciowych.

Z uwagi na to, że konie późno osiągają dojrzałość hodowlaną oraz są przeważnie eliminowane po drugim nieżrebnym sezonie rozrodczym, hodowca ponosi znaczne straty ekono-

miczne związane z utrzymaniem koni obciążonych wadami kariotypu, powodującymi obniżenie płodności bądź niepłodność.

Badania kariotypu koni zapoczątkowane zostały w Dziale Immuno- i Cytogenetyki Zwierząt IZ-PIB pod koniec lat 90. ubiegłego stulecia, jednakże ich intensyfikacja nastąpiła od 2006 r. w wyniku opracowania i wprowadzenia metod cytogene-

tyki molekularnej, tj. fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* (FISH), hybrydyzacji *in situ* z użyciem prymarów komplementarnych do wybranych sekwencji DNA (PRINS) oraz uzyskiwania sond molekularnych specyficznych dla całych chromosomów, bądź też ich fragmentów (ramię chromosomowe, pojedynczy prążek) przy zastosowaniu mikrodysekcji chromosomów z użyciem mikromanipulatora.

Wyszczególnienie <i>Item</i>	Ilość badanych koni <i>No. of horses tested</i>	Zdiagnozowane nieprawidłowości chromosomowe <i>Chromosome abnormalities</i>	Liczba koni z wadą kariotypu <i>No. of horses with karyotype defect</i>	Literatura <i>Literature</i>
		63,X	1 (0,4%)	
Młode konie, losowo wybrane z populacji <i>Young horses, ran- domly chosen from the population</i>	272 (klacze - <i>mares</i>)	63,X/64,XX	7 (2,6%)	Bugno i in., 2007 a
		64,XX/65,XX+31	1 (0,4%)	
		64,XX/64,XY	1 (0,4%)	
	228 (ogierki - <i>colts</i>)	brak - <i>nome</i>	0 (0%)	Bugno i in., 2007 a
Klaczki z problemami rozrodczymi <i>Mares with reproduc- tive problems</i>	215	65,XXX	1 (0,5%)	Bugno i in., 2003 c
		63,X	1 (0,5%)	Bugno i in., 2003 b
		63,X/64,XX	14 (6,5%)	Bugno i in., 2003 b Bugno i in., 2005 Bugno i in., 2006
		63,X/64,XX/65,XXX	3 (1,4%)	Bugno i in., 2006 Bugno i in., 2007 b
		64,XX/65,XXX	1 (0,5%)	Bugno i in., 2006
		64,XX/65,XX+Xp	1 (0,5%)	Bugno i Słota, 2007
		64,XY – sex reversal	1 (0,5%)	Bugno i in., 2003 a
		64,XX/64,XY	2 (0,9%)	Bugno i in., 1999
		63,X/64,XX/65,XX+Xq	1 (0,5%)	dane nieopublikowane <i>unpublished</i>
		63,X/64,XX/64,XX+delY	1 (0,5%)	dane nieopublikowane <i>unpublished</i>

Zastosowanie wyżej wymienionych technik ma ogromne znaczenie zwłaszcza w analizie prawidłowości kariotypu koni, ponieważ u tego gatunku większość zdiagnozowanych wad chromosomów płci występuje w formie mozaiki dwóch lub więcej linii a procentowy udział płytek metafazowych z nieprawidłową liczbą chromosomów jest zazwyczaj bardzo niski. W tym przypadku technika FISH jest niezastąpionym narzędziem, ponieważ wykrycie tej nieprawi-

dłości determinowane jest przez następujące czynniki: typ analizowanych płytek, liczbę analizowanych płytek oraz czułość zastosowanych technik badawczych. Zaletami fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* są natomiast: możliwość prowadzenia analizy na preparatach nawet słabej jakości, wykrywanie sygnału na chromosomach o różnym stopniu spiralizacji i dzięki temu możliwość analizy bardzo dużej liczby komórek.

Stosując sondę molekularną specyficzną

dla chromosomu X konia, zdiagnozowano 26 aneuploidii, wśród których aż 23 występowało w formie mozaiki: 63,X/64,XX (19 osobników), 63,X/65,XXX (1 osobnik), 63,X/64,XX/65,XXX (2 osobniki) oraz 63,X/64,XX/65,XX+Xp. W tym przypadku aberracja została zdiagnozowana dzięki zastosowaniu sond malujących, komplementarnych do poszczególnych ramion chromosomu X koni (Xp oraz Xg), uzyskanych metodą mikrodysekcji. Pozostałe zdiagnozowane ane-

uploidie heterosomów to 2 przypadki monosomii chromosomu X - kariotyp 63,X (fot. 1) oraz trisomia chromosomu X - kariotyp 65,XXX.

Mimo wieloletnich badań wiedza na temat aberracji u zwierząt wymaga licznych uzupełnień. Wprowadzenie do analiz nowoczesnych technik molekularnych zwiększyło możliwość precyzyjnej diagnozy nieprawidłowości kariotypu oraz poznanie biologicznych efektów różnego rodzaju zmian chromosomowych.

Literatura

- Bugno M., Słota E. (2007). Application of arm-specific painting probes of horse X chromosome for karyotype analysis in an infertile hutsul mare with 64,XX/65,XX+Xp karyotype: case report. *Acta Vet. Hung.*, 55, 3: 309-314.
- Bugno M., Słota E., Tischner M., Kozubska-Sobocińska A. (1999). A case of 64,XX/64,XY leukocytic chimerism in a fertile mare of the Wielkopolska breed. *Ann. Anim. Sci.*, 26, 2: 9-16.
- Bugno M., Słota E., Ząbek T. (2001). Two cases of subfertile mares with 64,XX/63,X mosaic karyotype. *Ann. Anim. Sci.*, 1 (2): 7-11.
- Bugno M., Klukowska J., Słota E., Tischner M., Świtoński M. (2003 a). A sporadic case of the sex-reversed mare (64,XY; SRY- negative): molecular and cytogenetic studies of the Y chromosome. *Theriogenology*, 59: 1597-1603.
- Bugno M., Słota E., Tischner M. jr., Tischner M. (2003 b). X chromosome monosomy as one of the reasons for reduced fertility or infertility in the mare. *Ann. Anim. Sci.*, 3 (2): 207-212.
- Bugno M., Słota E., Wieczorek M., Yang F., Buczyński J., Świtoński M. (2003 c). Non-mosaic X-trisomy, detected by chromosome painting, in an infertile mare. *Equine Vet. J.*, 35 (2): 209-210.
- Bugno M., Słota E., Pieńkowska-Schelling A., Schelling C. (2005). An effective method to diagnose X chromosome aneuploidy – the most frequent aberration in the horse. *Rocz. Nauk. Zoot.*, 32 (1): 11-17.
- Bugno M., Pieńkowska-Schelling A., Schelling C., Włodarczyk N., Słota E. (2006). Utilization of the probe generated by chromosome microdissection, for detection of equine X chromosome aneuploidy. *Ann. Anim. Sci.*, 6 (2): 205-210.
- Bugno M., Słota E., Kościelny M. (2007 a). Karyotype evaluation among young horse populations in Poland. *Schweiz. Arch. Tierheilk.*, 149, 5: 227-232.
- Bugno M., Słota E., Pieńkowska-Schelling A., Schelling C. (2007 b). Detection of equine X chromosome mosaicism in a mare using an equine X whole chromosome painting probe (WCPP) - case report. *Acta Vet. Hung.*, 55, 2: 207-213.

MONITORING OF HORSE KARYOTYPE FOR DIAGNOSIS OF GENETIC DEFECTS

Summary

Long-term cytogenetic studies in farm animals, including horses, have identified many chromosome abnormalities, the consequences of which directly affect breeding economics due to reduced fertility or infertility of the carriers. Horse karyotype studies that have been carried out at the Department of Animal Immuno- and Cytogenetics of the National Research Institute of Animal Production for 10 years, have shown chromosome abnormalities in 36 horses, most of which (21 cases) concerned chromosome X monosomy in the form of a mosaic of two cell lines, 63,X/64,XX. Other sex chromosome abnormalities diagnosed included X chromosome monosomy in pure form – 63,X (23 mares); X chromosome trisomy – 65,XXX (1 mare); monosomy in the form of a mosaic of 63,X/65,XXX (1 mare), 63,X/64,XX/65,XXX (3 mares), 64,XX/65,XX + Xp (1 mare), 63,X/64,XX/65,XX + Xq (1 mare); leukocyte chimerism 64,XX/64,XY (2 mares, 1 stallion); sex reversal – 64,XY karyotype in 1 mare and 63,X/64,XX/65,XX + delY karyotype in an intersexual animal. Another abnormality diagnosed among the animals studied was the occurrence of an additional autosomal chromosome in the form of a mosaic – 64,XX/65,XX + 31.