

The Robertsonian translocation and its impact on cattle reproductivity

Khrystyna Typylo, Ilia Mitiohlo, Valentyna Dzitsiuk 

*Institute of Animal Breeding and Genetics
nd.a. M.V. Zubets of National Academy of Agrarian Science of Ukraine,
Kyiv, Ukraine*

The Robertsonian translocation, also known as centric merge of chromosomes, is a common type of chromosomal abnormalities. It is defined as the connection of two acrocentric non-homologous chromosomes in the centromeric regions resulting in the emergence of the single metacentric chromosome. This leads to the reduction of the overall number of chromosomes in the karyotype to 59 for heterozygous and 58 for homozygous carriers instead of a normal value of 60 chromosomes.

The first description of the Robertsonian translocation was made in 1964 by I. Gustavsson and G. Rockborn. They defined it as the merge of the first and the twenty-ninth chromosomes (RT 1/29) in Swedish Red and White breed. The Robertsonian translocation was found in at least 20 other breeds of cattle from 12 different countries after that Popescu i Pech (1991), Pollock i Bowman (1974), Yimer i Rosnina (2014), Nicolas i in. (1995), Rangel-Figueiredo i Iannuzzi (1991), Ducos i in. (2008).

Nowadays we know over 50 described types of the Robertsonian translocations in cattle, and they were formed by different autosomes: 15 and 25 (Iannuzzi et al., 1992), 16/18 (Iannuzzi et al., 1992), 21 and 27 (Berland et al., 1988), 25 and 27 (De Giovanni et al., 1979), 4 and 10 (Bahri-Darwich et al., 1993), 19 and 21 (Pinton et al., 1997), 13 and 21 (Kovacs et al., 1973), 1 and 25 (Stranzinger and Foster, 1976), 3 and 4 (Popescu, 1977), 14 and 24 (Di Berardino et al., 1979), 16 and 20 (Rubes et al., 1996).

According to the numerous researchers,

the heterozygous animals-carriers of the Robertsonian translocations are phenotypically normal, in general. However they can often be infertile because of the emergence of the aneuploid gametes. This leads to the forming of unbalanced sex cells from segregation at meiosis of trivalents in heterozygous carriers and zygotes with monosomy and trisomy (Tateno and Miyake, 1994; Molteni et al., 2005).

At the same time, the researchers note the negative influence of the Robertsonian translocations, particularly – an impact of the translocations 1/29 on the cattle fertility (Schmutz i in., 1991). Thus, the cows carrying the RT 1/29 need a higher mean number of services per conception and a lower conception rate at the first service (Kovacs i in., 1992).

In this paper we made an attempt to compare the fertility of the RT 1/29 carriers and the cows with a normal karyotype, and we announce about the new Robertsonian translocation in Ukrainian Red and White Dairy cattle breed with its phenotypic effect.

Materials and methods

As a part of a cytogenetic monitoring, 91 cows of Red and White dairy breed were studied at the State Enterprise Research Farm «Khrystynivka» (Khrystynivka, Ukraine) and at the Institute of Animal Breeding and Genetics nd.a. M. V. Zubets of NAAS (Chubynske, Ukraine). The preparation of the culture of lymphocytes and chromosomes samples were held by the Moorhead method (Moorehead i in., 1960).

According to this method, 1 ml of animal peripheral blood was added into 5 ml of RPMI 1640 cell culture medium ('Sigma', USA) premixed with the cattle fetal serum and 0.1 ml of phytohemagglutinin (FGA), ('Sigma', USA). The culture had been cultivated for 48 hours at +37°C.

A 0.05%-solution of colchicine ('Serva', Germany) was added in 2 hours before the end of the cultivation process. The post-centrifugation cell residue had been treated with the hypotonic KCl solution (0.75 M) for 20 min at +37°C. The material was fixated and washed with methanol-acetic fixative (3:1) after that.

The G-differential staining was performed according to the M. Seabright method (1971) with modifications.

35–40 metaphases, stained with Giemsa mixture (Merk, Germany), were analyzed for each of the animals, using a 'Carl Zeiss' binocular microscope (Germany).

The coefficient of reproductive capacity of cows was calculated using the following formula:

$$\text{CoRC} = \frac{365}{\text{ICP}}$$

where:
365 – number of days in a year;
ICP – inter-calve period.

Results and discussion

The mitotic chromosomes were studied in 91 cows of Ukrainian Red and White dairy breed within a single herd. The study revealed 83 animals with a modal chromosome number of $2n=60$, 8 animals with a chromosome number of $2n=60$, 7 of which had a Robertsonian translocation 1/29 (Fig. 1). The translocation 1/29 could be spotted even using a routine staining process, as this translocation engaged the smallest and the largest chromosomes in the karyotype. The centromere constitutive heterochromatin could be seen in translocated cells behind a G-banding. All acrocentric chromosomes contained typically large white constitutive heterochromatin blocks inside of centromeric areas, as opposed to

X-chromosomes, where such blocks were practically absent. This fact was considered as an additional proof of the emerged translocation. The frequency of the Robertsonian translocations was at 8.79% for the given herd. All of 7 cows with RT 1/29 were offspring of one particular bull.

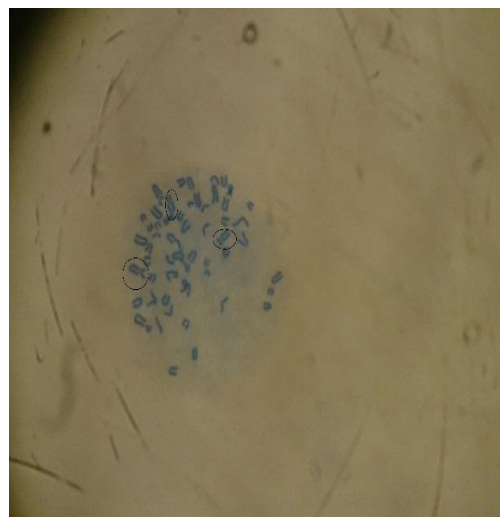


Fig. 1. The karyotype of a cow with the Robertsonian translocation 1/29. Scale 100x10

No homozygous animals having the translocation 1/29 and with the number of chromosomes of $2n=58$ were found in our research.

Our analysis of animal fertility proved the fact that the cows with the 1/29 translocation had a longer service period by 41.66 days ($P<0.001$) and an average insemination index was twice higher in comparison to the animals with a normal karyotype (Table 1). The reproductivity capacity index and the number of services per conception were higher as well.

The negative effect of RT 1/29 on animal fertility had been confirmed by other researchers (Schmutz i in., 1991). According to Bonnet-Garnier et al. (2008), the number of unbalanced gametes in such animals is 2.76% in sperm and 4.06% in eggs.

Table 1. The karyotype distribution in cattle

Karyotype	n	Average service period duration after the first calving	Insemination index – number of services per conception (SPC)	Coefficient of reproductive capacity of cows	Number of stillbirths, miscarriages
Normal karyotype	83	89.78±5.60	1.60	0.88±0.05	–
Rob (1;29)	7	131.44±7,0	3.33	0.76±0.02	2.0

As a result of study, it was stated that out of 8 cows with identified translocations, one cow (inventory number 6040) had the Robertsonian translocation, which appeared from merging of two other autosomes with a set of 59 chromosomes. More than 100 mitoses were analyzed and it was found that 45 of them contained 59 chromosomes, moreover, one chromosome differed from X-chromosomes as well as from RT 1/29. The G-banding proved that the translocated chromosome was dicentric and it was produced with help of 13 and 23 chromosomes. Thus, we had found a new translocation RT 13/23. We could assume that this translocation appeared de novo during hematogenesis or embryogenesis, and this was the first animal from the family to develop an anomaly without passing it to offspring (Fig. 2).

During the period of the farm exploitation of this cow 6040, two phenotypically healthy calves (a bull and a heifer) were born, and one pregnancy was terminated by miscarriage. One of the offspring of this cow (the heifer) did not inherit the translocation from the mother. The karyotype analysis of the bull could not be performed due to its departure from the herd. The karyotype analysis of the mother (the cow Boyka 8644) did not reveal such a translocation. We couldn't find out whether the mutation was inherited from the father (Dyplomat 401497), however. It should be noted that the cytogenetic testing of this fetus' four daughters did not reveal the presence of a translocated chromosome. Any of cytogenetic studies of the eight half-sisters of this animal also did not display any chromosomal abnormalities.

The cow, in which we detected the RT 13/23, yielded 6787 kg during the first lactation, the service period was 188 days after the first calving, and the inter-calve period was 470 days.

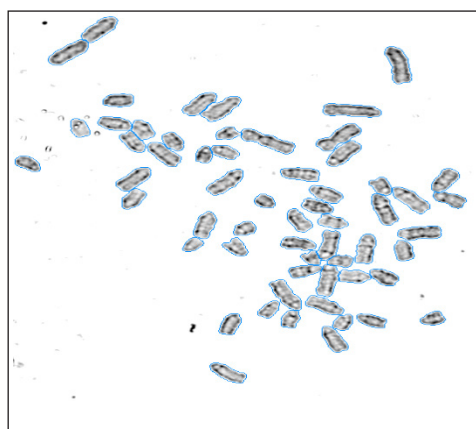
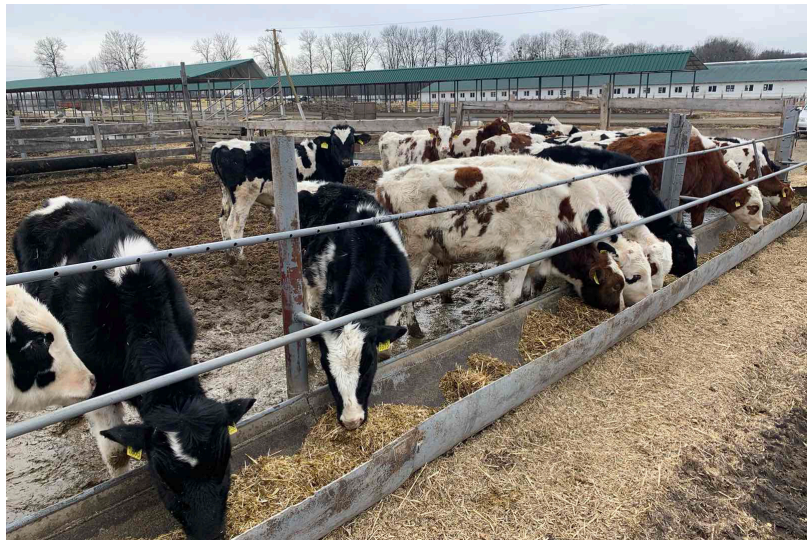


Fig. 2. The metaphase plate of Ukrainian Red-and-White dairy breed of cattle with RT 13/23

We did not find any reports in the literature noting the translocation involving chromosomes 13 and 23 in cattle. Apparently, the RT 13/23 we found is either a little-studied or yet unexplored translocation.

Resume. The article compares fertility of the RT 1/29 carriers as well as cows with normal karyotype. It was found that animals with RT 1/29 had a longer service period by 41.66 days ($P < 0.001$) and an average insemination index was twice higher in comparison to the animals with a normal karyotype.



Ukraińskie bydło mleczne – *Ukrainian dairy cattle breed*

Translokacje robertsonowskie i ich wpływ na reprodukcyjność bydła

Khrystyna Typylo, Ilia Mitiohlo, Valentyna Dzitsiuk 

*Instytut Hodowli i Genetyki Zwierząt, Narodowa Akademia Nauk Rolniczych Ukrainy,
Kijów, Ukraina*

Translokacja robertsonowska (RT), zwana inaczej fuzją centryczną jest często spotykanym zaburzeniem chromosomowym. Określana jako połączenie dwóch niehomologicznych chromosomów akrocentrycznych w rejonie centromeru, powoduje powstanie pojedynczego chromosomu metacentrycznego. Prowadzi to do zmniejszenia całkowitej liczby chromosomów w kariotypie z normalnych 60 do 59 w przypadku osobników heterozygotycznych i do 58 w przypadku osobników homozygotycznych.

Translokację robertsonowską opisali po raz pierwszy I. Gustavsson i G. Rockborn w 1964 r., określając ją jako fuzję chromosomów nr 1 i 29 (RT 1/29) u bydła rasy szwedzkiej czerwono-białej. Od tego czasu stwierdzono ją w ponad 20 rasach bydła w 12 krajach (Popescu i Pech, 1991; Pollock i Bowman, 1974; Yimer i Rosnina, 2014; Nicolas i in., 1995; Rangel-Figueiredo i Iannuzzi, 1991; Ducos i in. (2008).

Jak dotąd, opisano u bydła ponad 50 rodzajów translokacji robertsonowskich, utworzonych przez następujące autosomy: 15 i 25 (Iannuzzi i in., 1992), 16/18 (Iannuzzi i in., 1992), 21 i 27 (Berland i in., 1988), 25 i 27 (De Giovanni i in. 1979), 4 i 10 (Bahri-Darwich i in., 1993), 19 i 21 (Pinton i in., 1997), 13 i 21 (Kovacs i in., 1973), 1 i 25 (Stranzinger i Foster, 1976), 3 i 4 (Popescu, 1977), 14 i 24 (Di Berardino i in., 1979) oraz 16 i 20 (Rubes i in., 1996).

Według wielu badaczy, osobniki heterozygotyczne – nosiciele translokacji robertsonowskich są generalnie osobnikami o normalnym fenotypie, jednak często są niepłodne ze względu na występowanie gamet aneuploidalnych. Prowadzi

to do powstania niezrównoważonych komórek płciowych wskutek mejotycznej segregacji triwalentów u nosicieli heterozygotycznych oraz zygot z monosomią i trisomią (Tateno i Miyake, 1994; Molteni i in., 2005).

Jednocześnie, autorzy zwracają uwagę na negatywne efekty translokacji robertsonowskich, w szczególności translokacji 1;29 na płodność bydła (Schmutz i in., 1991). Tym samym, krowy będące nosicielami translokacji 1;29 potrzebują średnio większej liczby inseminacji na zacielenie i charakteryzują się niższą skutecznością pierwszej inseminacji (Kovacs i in., 1992).

Niniejsza praca porównuje płodność nosicieli translokacji robertsonowskiej 1;29 oraz krów o normalnym kariotypie, jednocześnie opisując pojawienie się nowej translokacji robertsonowskiej u bydła mlecznej rasy ukraińskiej czerwono-białej wraz z jej efektem fenotypowym.

Material i metody

W ramach monitoringu cytogenetycznego przebadano 91 krów mlecznej rasy czerwono-białej w Przedsiębiorstwie Państwowym Gospodarstwie Badawczym „Khrystynivka” (Khrystynivka, Ukraina) oraz w Instytucie Hodowli i Genetyki Zwierząt Narodowej Akademii Nauk Rolniczych Ukrainy (Chubynske, Ukraina). Przygotowanie hodowli limfocytów i próbek chromosomów przeprowadzono według metody Moorheada (Moorehead i in., 1960).

Zgodnie z metodą, 1 ml krwi obwodowej zwierząt dodano do 5 ml podłoża RPMI 1640 (Sigma, USA), wcześniej zmieszanego z surowicą płodów bydłych i 0,1 ml fitohemaglutyniny

(FGA) (Sigma, USA). Pożywkę hodowano przez 48 h w temperaturze $+37^{\circ}\text{C}$.

Na 2 godziny przed zakończeniem hodowli dodano roztwór 0,05% kolchicyny (Serva, Niemcy). Po odwirowaniu, pozostałości komórkowe poddano działaniu hipotonicznego roztworu KCl (0,75 M) przez 20 min w temperaturze $+37^{\circ}\text{C}$. Następnie, materiał przemywano i utrwalano metanolem i kwasem octowym (3:1).

Barwienie różnicujące według Giemsy przeprowadzono metodą Seabrighta (1971) wraz z modyfikacjami.

Dla każdego z osobników analizowano 35–40 płytek metafazowych barwionych mieszaniną Giemsy (Merck, Niemcy) przy użyciu mikroskopu stereoskopowego (Carl Zeiss, Niemcy).

Wskaźnik użytkowości rozplodowej krów obliczono za pomocą wzoru:

$$CoRC - 365/ICP,$$

gdzie:

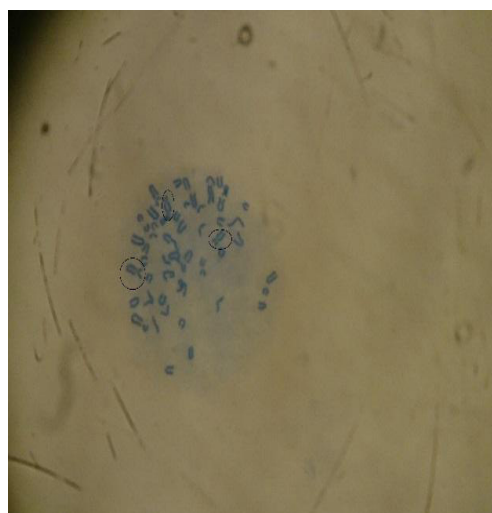
365 – liczba dni w roku,

ICP – okres międzywycieleniowy.

Wyniki i ich omówienie

Chromosomy mitotyczne zbadano u 91 krów rasy ukraińskiej czerwono-białej pochodzących z jednego stada. Zidentyfikowano 83 osobniki z modalną liczbą chromosomów $2n=60$, 8 osobników z liczbą chromosomów $2n=58$, z których 7 było nosicielami translokacji robertsonowskiej 1;29 (rys. 1). Translokacja 1;29 była widoczna nawet przy zastosowaniu rutynowego barwienia, ponieważ dotyczyła najmniejszych i największych chromosomów w karyotypie. Konstytutywną heterochromatynę centromerową zlokalizowano w translokowanych komórkach za prążkami G. Wszystkie chromosomy akro-

centryczne zawierały zazwyczaj duże białe bloki heterochromatyny konstytutywnej wewnątrz obszarów centromerycznych w przeciwieństwie do chromosomów X, w których takie bloki praktycznie nie występowały. Fakt ten stanowi dodatkowe potwierdzenie powstałej translokacji. Translokacja robertsonowska występowała w stadzie z częstością 8,79%. Wszystkie 7 krów z RT 1;29 pochodziło od jednego buhaja.



Rys. 1. Kariotyp krowy z translokacją robertsonowską 1;29. Skala 100x10

Podczas badań nie stwierdzono osobników z translokacją 1;29 i liczbą chromosomów $2n=58$. Przeprowadzona analiza płodności wykazała, że krowy będące nosicielami translokacji 1;29 charakteryzowały się okresem usługi dłuższym o 41,66 dni ($P<0,001$) oraz dwukrotnie wyższym średnim wskaźnikiem inseminacji w porównaniu do osobników o normalnym karyotypie (tab. 1). Również wyższy był indeks zdolności reprodukcyjnej oraz liczba inseminacji potrzebnych do zacielenia.

Tabela 1. Rozkład kariotypów u bydła

Kariotyp	n	Średni okres usługi po pierwszym wycieleniu	Wskaźniki inseminacji – liczba inseminacji na zacielenie (SPC)	Współczynnik zdolności reprodukcyjnej krów	Liczba urodzeń martwych i poronień
Kariotyp prawidłowy	83	89,78±5,60	1,60	0,88±0,05	–
Rob (1;29)	7	131,44±7,0	3,33	0,76±0,02	2,0

Niekorzystny wpływ RT 1;29 na płodność zwierząt potwierdzili inni autorzy (Schmutz i in., 1991). Według Bonnet-Garnier i in. (2008), liczba niezrównoważonych gamet u takich osobników wynosi 2,76% u samców i 4,06% u samic.

Badania własne wykazały, że spośród 8 krów obarczonych translokacjami jedna (nr 6040) była nosicielem translokacji robertsonowskiej powstałej wskutek fuzji dwóch innych autosomów z zestawem 59 chromosomów. Analiza ponad 100 mitoz pokazała, że w 45 z nich występowało 59 chromosomów; co więcej, jeden chromosom różnił się od chromosomów X, jak również od RT 1;29. Na podstawie barwienia według Giemsy stwierdziliśmy, że translokowany chromosom był dicentryczny i powstał przy pomocy 13 i 23 chromosomów. Tym samym, zidentyfikowaliśmy nową translokację RT 13;23. Przyjęliśmy, że translokacja ta powstała *de novo* podczas hematogenezy lub embriogenezy i że był to pierwszy osobnik w rodzinie z tym zaburzeniem, którego nie przekazał swojemu potomstwu (rys. 2).

Podczas użytkowania krowy nr 6040 w gospodarstwie urodziły się dwa fenotypowo normalne cielęta (buhaj i jałówka), a jedna ciąża zakończyła się poronieniem. Jeden z potomków tej krowy (jałówka) nie odziedziczył translokacji po swojej matce. Analizy kariotypu buhaja nie przeprowadzono ze względu na jego eliminację ze stada. Analiza kariotypu matki (krowa Boyka 8644) nie wykazała obecności takiej translokacji, jednak nie udało nam się stwierdzić, czy muta-

cja została odziedziczona po ojcu (Dyplomata 401497). Należy zauważyć, że cytogenetyczne analizy czterech pochodzących od niego córek nie wykazały obecności translokowanego chromosomu. Żadne z badań cytogenetycznych ośmiu półsióstr tego osobnika nie ujawniło nieprawidłowości chromosomowych.

Krowa, u której zidentyfikowaliśmy RT 13;23, wyprodukowała 6787 kg mleka w pierwszej laktacji, jej okres usługi po pierwszym ociehleniu wyniósł 188 dni, a okres międzywycieleniowy trwał 470 dni.

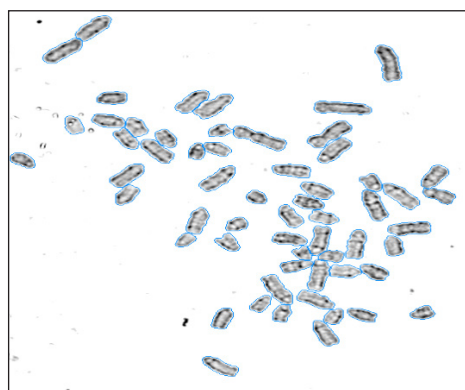


Fig. 2. Płytki metafazowa osobnika rasy ukraińskiej czerwono-białej z translokacją RT 13;23

W dostępnej literaturze nie znaleźliśmy badań stwierdzających translokację w chromosomach 13 i 23 u bydła. Wydaje się, że zidentyfikowana przez nas translokacja RT 13;23 jest słabo zbadana lub nieznaną.

Podsumowanie

Artykuł porównuje płodność nosicielek translokacji robertsonowskiej 1;29 oraz krów o normalnym kariotypie.

Osobniki będące nosicielami translo-

kacji 1;29 charakteryzowały się okresem usługi dłuższym o 41,66 dni ($P < 0,001$) oraz dwukrotnie wyższym średnim wskaźnikiem inseminacji w porównaniu do osobników o normalnym kariotypie.

Literatura – References

- Bahri-Darwich I., Cribiu E., Berland H. i in. (1993). A new Robertsonian translocation in Blonde d'Aquitaine cattle, rob(4;10). *Genet. Sel. Evol.*, 25, 413 (<https://doi.org/10.1186/1297-9686-25-5-413>).
- Berland Y., Sharma A., Gribiu E.P., Darre R., Boshier J., Popescu C.P. (1988). Discovery of new Robertsonian translocation in Blonde D'Aquitaine cattle. *Cytologia*, 53: 685–691.
- Bonnet-Garnier A., Lacaze S., Beckers J.F., Berland H.M., Pinton A., Yerle M., Ducos A. (2008). Meiotic segregation analysis in cows carrying the t(1;29) Robertsonian translocation. *Cytogenet. Gen. Res.*, 120: 91–96; doi: 10.1159/000118744.
- De Giovanni A., Succi G., Molteni L., Castiglioni M. (1979). A new autosomal translocation in “Alpine grey cattle”. *Annales de génétique et de sélection animale*, INRA Editions, 11 (2): 115–120.
- Di Bernardino D., Iannuzzi L., Ferrara L., Matassino D. (1979). A new case of Robertsonian translocation in cattle. *J. Heredity*, 70: 436–438.
- Ducos A., Revay T., Kovacs A., Hidas A., Pinton A., Bonnet-Garnier A., Molteni L., Slota E., Switonski M., Arruga M.V., van Haeringen W.A., Nicolae I., Chaves R., Guedes-Pinto H., Andersson M., Iannuzzi L. (2008). Cytogenetic screening of livestock populations in Europe: an overview. *Cytogenet. Gen. Res.*, 120: 26–41.
- Gustavsson I., Rockborn G. (1964). Chromosome abnormality in three cases of lymphatic leukemia in cattle. *Nature*, 203: 990; doi: 10.1038/203990a0.
- Iannuzzi L., Rangel-Figueiredo T., Di Meo G., Ferrara L. (1992). A new Robertsonian translocation in cattle, rob (15;25). *Cytogenet. Cell Genet.*, 59: 280–283 (<https://doi.org/10.1159/000133269>).
- Iannuzzi L., Rangel-Figueiredo T., Di Meo G., Ferrara L. (1993). A new centric fusion translocation in cattle, rob (16;18). *Hereditas*, 119: 239–243 (<https://doi.org/10.1111/j.1601-5223.1993.00239.x>).
- Kovacs A., Meszaros I., Sellyei M., Vass L. (1973). Mosaic centromeric fusion in a Holstein-Friesian bull. *Ada Biol.*, 24: 215–220.
- Kovacs A., Gustavsson I., Csukly S., Karakas P. (1992). Lifetime production of Simmental cows carrying the 1;29 translocation. 10 th European Colloquium on Cytogenetics of Domestic Animals, Utrecht, The Netherlands, pp. 121–125.
- Molteni L., Meggiolaro D., Giovanni M. (2005). Fertility of cryopreserved sperm in three bulls with different Robertsonian translocations. *Anim. Reprod. Sci.*, 86 (1–2): 27–36.
- Moorehead P.S., Nowell P.C., Mellman W.J., Battips D.M., Hungerford D.A. (1960). Chromosome preparations of leucocytes cultured from human peripheral blood. *Exp. Cell Res.*, 20: 613.
- Nicolas N., Hidas A., Renaville R., Kettmann R., Gengler N., Burny A., Boonen F., Toscer J., Goffinet A. (1995). Absence probable de la translocation Robertsonienne 1/29 en race bovine Blanc Bleu Belge. *Genet. Sel. Evol.*, 27: 377–380 (<https://doi.org/10.1186/1297-9686-27-4-377>).
- Pinton A., Ducos A., Berland H.M., Seguela A., Blanc M.F., Darre A., Mimar, Darre R. (1997). A new Robertsonian translocation in Holstein-Friesian cattle. *Genet. Sel. Evol.*, 29: 523–526.
- Pollock D.L., Bowman J.C. (1974). A Robertsonian translocation in British Friesian cattle. *J. Reprod. Fert.*, 40: 432; doi: 10.1530/jrf.0.0400423.

- Popescu C.P. (1977). A new type of Robertsonian translocation in cattle. *J. Heredity*, 68: 139–142 (<https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jhered.a108798>).
- Popescu C.P., Pech A. (1991). Une bibliographie sur la translocation 1/29 de bovins dans le monde (1964–1990). *Ann. Zoot.*, 40 (4): 271–305 (doi: 10.1051/animres:19910405).
- Rangel-Figueiredo T., Iannuzzi L. (1991). A cattle breed close to 58 diploid number due to high frequency of rob (1;29). *Hereditas*, 115: 73–78.
- Rubes J., Musilova P., Borkovec L., Borkovcova Z., Svecova D., Urbanova J. (1996). A new Robertsonian translocation in cattle, rob(16;20). *Hereditas*, 124 (3): 275–279.
- Schmutz S., Moker J., Barth A., Mapletoft R. (1991). Embryonic loss in superovulated cattle caused by the 1;29 Robertsonian translocation. *Theriogenology*, 35 (4): 705–714.
- Seabright M. (1971). A rapid banding technique for human chromosomes. *Lancet*, 11: 971–972.
- Stranzinger G.F., Foster M. (1976). Autosomale chromosome translokationen beim Fleck-und Braunvieh (All.). *Res. Angl. Experientia*, 32: 24–27.
- Tateno H., Miyake Y. (1994). Sperm chromosome study of two bulls heterozygous for different Robertsonian translocations. *Hereditas*, 120 (1): 7–11.
- Yimer N., Rosnina Y. (2014). Chromosomal anomalies and infertility in farm animals: A Review *Pertanika. J. Trop. Agric. Sci.* 37 (1): 1–18.

Słowa kluczowe: kariotyp, aberracje, translokacje robertsonowskie, ukraińskie czerwono-białe bydło mleczne, zdolność reprodukcyjna

Key words: *karyotype, aberrations, Robertsonian translocation, Ukrainian Red-and-White dairy cattle breed, reproductive ability*



Krowy rasy ukraińskiej czerwono-białej – *Ukrainian Red-and-White cows*

Fot. w art.: autorzy