



„Europejski Fundusz Rolny na rzecz Rozwoju Obszarów Wiejskich: Europa inwestująca w obszary wiejskie”

Sprawozdanie merytoryczne z realizacji Operacji ChromoBull „Opracowanie dodatkowego kryterium oceny aparatu genetycznego bydła pod względem wybranych wad chromosomowych w celu zoptymalizowania wyników produkcji”

Głównym efektem działania jest wykonana inwentaryzacja prawidłowości kariotypów badanych buhajów, krów oraz jałówek. Badania wykonano na nasieniu pozyskanym od 100 buhajów oraz komórkach somatycznych pozyskanych od 32 samic (jałówek i krów).

Pierwszym etapem badań było zoptymalizowanie procesu dekondensacji nasienia, której jakość warunkuje czytelność uzyskanych wyników. Przeprowadzono badanie walidacji trzech metodyk technik dekondensacji nasienia (Fig. 1) i po próbach adjustacji wytypowano najefektowniejszą. Po zastosowaniu metodyki nr 1 uzyskano sygnały specyficzne dla chromosomów autosomalnych, jednak ze względu na przygotowanie preparatów po przeprowadzeniu dekondensacji technika limitowała dostępność materiału i wymagała przeprowadzenia wielokrotnych prób, aby uzyskać odpowiedni stopień dekondensacji. W przypadku techniki nr 2 uzyskano wyniki nieczytelnych sygnałów fluorescencyjnych sugerujących zbyt przedekondensowane nasienie, uniemożliwiające analizę oraz ze względu na przygotowywanie preparatów każdorazowo do dekondensacji limitowała powtarzalność i dostępność materiału. Technika nr 3 okazała się najbardziej powtarzalną metodą ze względu na dużą dostępność utrwalonego nasienia w jednej próbce oraz najbardziej efektowną ze względu na uzyskanie odpowiednio zdekondensowanej chromatyny jądrowej plemników i otrzymanie najbardziej czytelnych sygnałów fluorescencyjnych specyficznych do chromosomów autosomalnych, tym samym umożliwiając detekcję prawidłowych i nieprawidłowych sygnałów fluorescencyjnych. Po uzyskaniu odpowiedniego stopnia dekondensacji i hybrydyzacji przystąpiono do techniki fluorescencyjnej hybrydyzacji in situ na stu osobnikach.

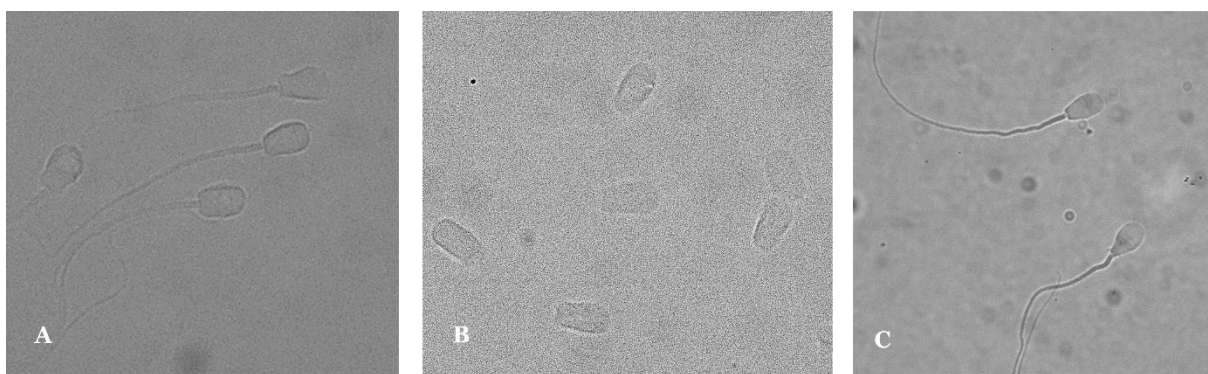


Fig. 1. Porównanie trzech metodyk dekondensacji nasienia; A) Metodyka dekondensacji nr 1; B) Metodyka dekondensacji nr 2; C) Metodyka dekondensacji nr 3

Kolejnym etapem było uzyskanie sond molekularnych, które wykonano w nowo powstałym laboratorium cytogenetyki molekularnej. Zastosowano dwa rodzaje sond: sondy malujące, specyficzne do całych chromosomów lub ich fragmentów, oraz sondy BAC – specyficzne do wybranych sekwencji DNA. Sondy znakowano metodą bezpośrednią (przyłączając do DNA fluorochrom) lub pośrednią (przyłączając do DNA hapten), wykonując dodatkowo amplifikację sygnału fluorescencyjnego poprzez reakcję immunohistemiczną z przeciwciałem połączonym z fluorochromem. Uzyskane sondy hybrydyzowano z chromosomami metafazowymi oraz ze zdekondensowaną chromatyną plemnikową (Fig. 2-5). Wyniki



„Europejski Fundusz Rolny na rzecz Rozwoju Obszarów Wiejskich: Europa inwestująca w obszary wiejskie”

obserwowano w mikroskopie fluorescencyjnym, wyposażonym w specjalistyczne filtry oraz oprogramowanie pozwalające na archiwizację obrazów.

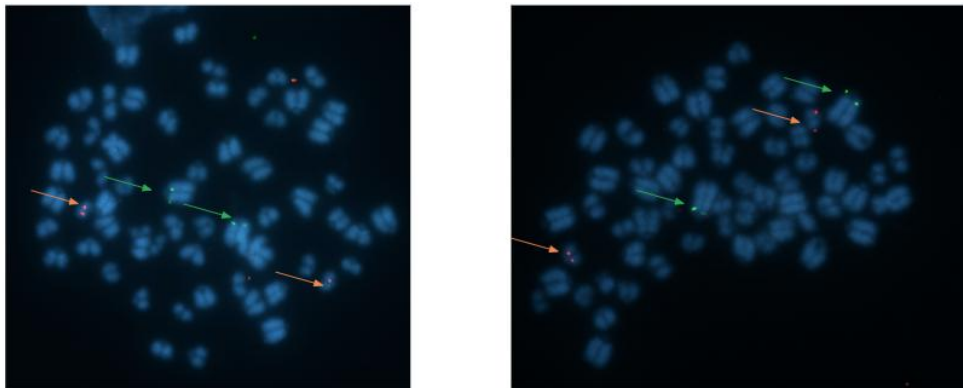


Fig. 2 Chromosomy metafazowe z sygnałami BAC specyficznymi dla chromosomów 1 pary (zielone strzałki) oraz specyficznymi dla chromosomów 29 pary (czerwone strzałki)



Fig. 3 Plemniki z sygnałami BAC specyficznymi dla chromosomów 1 pary (zielony sygnały) oraz specyficznymi dla chromosomów 29 pary (czerwone strzałki)



Fig. 4 Plemniki z sygnałami fluorescencyjnymi, specyficznymi dla chromosomów płci X (zielone strzałki) i Y (czerwone strzałki)

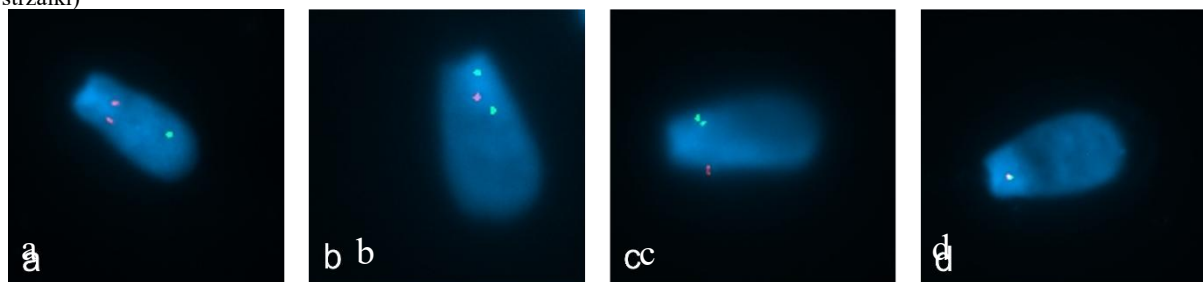


Fig. 5 Plemniki z sygnałami fluorescencyjnymi wskazującymi na aberracje typu aneuploidii badanych chromosomów a) dodatkowy sygnał dla chromosomu 29; dodatkowy sygnał dla chromosomu 1.; d) bliskie położeniu obus sygnałów fluorescencyjnych sugerujące translokacje 1;29;



„Europejski Fundusz Rolny na rzecz Rozwoju Obszarów Wiejskich: Europa inwestująca w obszary wiejskie”

Na podstawie analizy danych procentowych dotyczących udziału plemników z nieprawidłowościami dotyczącymi sygnałów świadczących o nosicielstwie translokacji robertsonowskiej (rob1;29) w badanej próbie, możliwe było wyodrębnienie przedziałów wartości oraz identyfikacja osobników odstających od średnich wartości. Analizie poddano odsetek nieprawidłowych plemników, obliczany jako odwrotność od wartości procentowej oznaczonej jako "% prawidłowych".

W zależności od jakości preparatów, analizowano od 100 do 1000 plemników na osobnika (Tabela 1).

Przedziały wartości nieprawidłowości:

- < 5% (niski poziom nieprawidłowości):

Osobniki: 1–15, 17–20, 21–42, 44–58, 60–84, 85–89, 91–92, 95–98

- 5–7% (umiarkowany poziom):

Osobniki: 16, 59, 100

- 7–10% (podwyższony poziom):

Brak osobników w tym zakresie

- 10% (wysoki poziom nieprawidłowości):

Osobnik 43 – 11,00%

Osobnik 90 – 14,29%

Osobnik 93 – 12,26%

Osobnik 94 – 11,21%

Osobnik 99 – 12,28%

Średnia wartość nieprawidłowości: 2,27%

Osobniki odstające:

Znacznie poniżej średniej (< 3%): 1–11, 13–15, 17–20, 21–42, 44–48, 50–57, 61–63, 64–66, 68–70, 72–74, 76–81, 84–89, 91–92, 95–96, 98

Znacznie powyżej średniej (> 10%):

Osobnik 43 – 11,00%

Osobnik 90 – 14,29%

Osobnik 93 – 12,26%

Osobnik 94 – 11,21%

Osobnik 99 – 12,28%

Osobniki te powinny być objęte szczegółową obserwacją, ponieważ wysoki poziom nieprawidłowości może wskazywać na obecność *de novo* powstających aberracji, szczególnie w przypadku translokacji robertsonowskiej rob(1;29). Ze względu na przeliczenie 100 komórek, konieczne jest zagęszczenie preparatów, powtórzenie techniki FISH i przeliczenie 1000 komórek, dla rzetelnego obrazu rozkładu nieprawidłowości występujących w plemnikach. U osobnika nr 64 (1000 komórek) zidentyfikowano obecność różnych form translokacji Robertsonowskiej (rob1;29), takich jak:

- 1;29
- 1+1;29
- 29+1;29
- 1+29+1;29

Wartości te, mimo że mieszczą się w zakresie niskiej nieprawidłowości (1,99%), są złożone i różnorodne. Może to wskazywać na potencjalne nosicielstwo translokacji typu



„Europejski Fundusz Rolny na rzecz Rozwoju Obszarów Wiejskich: Europa inwestująca w obszary wiejskie”

Robertsonowskiego. Ze względu na ich specyfikę zaleca się pilne powtórzenie badań oraz pogłębioną analizę molekularną i cytogenetyczną.

Osobnik	1+29	% prawidłowych	1+1+29	% 1+1+29	1+29+29	% 1+29+29	1+1+29+29	% 1+1+29+29	1;29	% 1;29	1+1;29	% 1+1;29	29+1;29	% 29+1;29	1+29+1;29	% 1+29+1;29	% nieprawidłowych	Łącznie
1	1003	98,92%	8	0,7890	3	0,2919	0	0,0000	0	0,0000	0	0,0000	0	0,0000	0	0,0000	1,0848	1014
2	995	99,10%	9	0,8964	0	0,0000	0	0,0000	0	0,0000	0	0,0000	0	0,0000	0	0,0000	0,8964	1004
3	1018	99,12%	5	0,4869	3	0,2921	0	0,0000	0	0,0000	0	0,0000	0	0,0000	0	0,0000	0,7790	1027
4	997	99,30%	2	0,1992	1	0,0996	0	0,0000	0	0,0000	0	0,0000	0	0,0000	0	0,0000	0,2988	1004
5	1002	99,50%	4	0,3972	1	0,0993	0	0,0000	0	0,0000	0	0,0000	0	0,0000	0	0,0000	0,4965	1007
6	990	98,61%	7	0,6972	7	0,6972	0	0,0000	0	0,0000	0	0,0000	0	0,0000	0	0,0000	1,3944	1004
7	994	99,40%	3	0,3000	3	0,3000	0	0,0000	0	0,0000	0	0,0000	0	0,0000	0	0,0000	0,6000	1000
8	1012	99,21%	3	0,2919	2	0,1947	0	0,0000	0	0,0000	0	0,0000	0	0,0000	0	0,0000	0,4916	1017
9	994	99,10%	3	0,2991	5	0,4985	1	0,0997	0	0,0000	0	0,0000	0	0,0000	0	0,0000	0,8973	1003
10	1014	99,31%	1	0,0979	6	0,5877	0	0,0000	0	0,0000	0	0,0000	0	0,0000	0	0,0000	0,6856	1021
11	991	98,90%	4	0,3992	7	0,6986	0	0,0000	0	0,0000	0	0,0000	0	0,0000	0	0,0000	1,0978	1002
12	99	96,12%	1	0,9709	8	0,7944	0	0,0000	0	0,0000	0	0,0000	0	0,0000	0	0,0000	3,8833	103
13	999	98,51%	3	0,2967	7	0,6924	2	0,1978	1	0,0990	0	0,0000	0	0,0000	0	0,0000	1,1869	1011
14	1012	100,00%	8	0,7905	10	0,9881	0	0,0000	1	0,0988	0	0,0000	0	0,0000	0	0,0000	1,8775	1012
15	99	99,00%	1	1,0000	0	0,0000	0	0,0000	0	0,0000	0	0,0000	0	0,0000	0	0,0000	1,0000	100
16	100	94,34%	2	1,8588	3	2,3502	1	0,9434	6	0,0000	0	0,0000	0	0,0000	0	0,0000	5,6604	106
17	99	99,00%	0	0,0000	1	1,0000	0	0,0000	0	0,0000	0	0,0000	0	0,0000	0	0,0000	1,0000	100
18	99	99,00%	0	0,0000	1	1,0000	0	0,0000	0	0,0000	0	0,0000	0	0,0000	0	0,0000	1,0000	100
19	101	100,00%	0	0,0000	0	0,0000	0	0,0000	0	0,0000	0	0,0000	0	0,0000	0	0,0000	0,0000	101
20	100	100,00%	0	0,0000	0	0,0000	0	0,0000	0	0,0000	0	0,0000	0	0,0000	0	0,0000	0,0000	100
21	998	98,11%	9	0,8917	8	0,7944	0	0,0000	0	0,0000	0	0,0000	0	0,0000	0	0,0000	1,6882	1007
22	987	97,82%	3	0,2973	9	0,8920	0	0,0000	0	0,0000	0	0,0000	0	0,0000	0	0,0000	1,1893	1009
23	995	98,22%	12	1,1846	6	0,5923	0	0,0000	0	0,0000	0	0,0000	0	0,0000	0	0,0000	1,7769	1013
24	989	98,51%	2	0,1992	11	1,0956	2	0,1992	0	0,0000	0	0,0000	0	0,0000	0	0,0000	1,4940	1004
25	102	100,00%	0	0,0000	0	0,0000	0	0,0000	0	0,0000	0	0,0000	0	0,0000	0	0,0000	0,0000	102
26	996	98,12%	13	1,2388	4	0,3941	2	0,1970	0	0,0000	0	0,0000	0	0,0000	0	0,0000	1,8719	1015
27	1026	98,56%	9	0,8646	6	0,5764	0	0,0000	0	0,0000	0	0,0000	0	0,0000	0	0,0000	1,4409	1041
28	100	99,01%	0	0,0000	1	0,9901	0	0,0000	0	0,0000	0	0,0000	0	0,0000	0	0,0000	0,9901	101
29	98	98,00%	0	0,0000	2	2,0000	0	0,0000	0	0,0000	0	0,0000	0	0,0000	0	0,0000	2,0000	100
30	99	99,00%	0	0,0000	1	1,0000	0	0,0000	0	0,0000	0	0,0000	0	0,0000	0	0,0000	1,0000	100
31	100	100,00%	0	0,0000	0	0,0000	0	0,0000	0	0,0000	0	0,0000	0	0,0000	0	0,0000	0,0000	100
32	102	100,00%	0	0,0000	0	0,0000	0	0,0000	0	0,0000	0	0,0000	0	0,0000	0	0,0000	0,0000	102
33	101	96,19%	2	1,9048	0	0,0000	0	0,0000	2	1,9048	0	0,0000	0	0,0000	0	0,0000	3,8095	105
34	998	99,00%	1	0,1000	3	0,3000	0	0,0000	2	0,2000	0	0,0000	0	0,0000	0	0,0000	0,6000	1000
35	98	98,00%	2	2,0000	0	0,0000	0	0,0000	0	0,0000	0	0,0000	0	0,0000	0	0,0000	2,0000	100
36	101	97,12%	1	0,9615	1	0,9615	0	0,0000	1	0,9615	0	0,0000	0	0,0000	0	0,0000	2,8846	104
37	100	98,04%	2	1,9608	0	0,0000	0	0,0000	0	0,0000	0	0,0000	0	0,0000	0	0,0000	1,9608	102
38	103	98,10%	2	1,9618	0	0,0000	0	0,0000	0	0,0000	0	0,0000	0	0,0000	0	0,0000	1,9618	105
39	100	97,09%	1	0,9709	1	0,9709	0	0,0000	1	0,9709	0	0,0000	0	0,0000	0	0,0000	2,9126	103
40	101	100,00%	0	0,0000	0	0,0000	0	0,0000	0	0,0000	0	0,0000	0	0,0000	0	0,0000	0,0000	101
41	96	96,00%	0	0,0000	4	4,0000	0	0,0000	0	0,0000	0	0,0000	0	0,0000	0	0,0000	4,0000	100
Osobnik	1+29	% prawidłowych	1+1+29	% 1+1+29	1+29+29	% 1+29+29	1+1+29+29	% 1+1+29+29	1;29	% 1;29	1+1;29	% 1+1;29	29+1;29	% 29+1;29	1+29+1;29	% 1+29+1;29	% nieprawidłowych	Łącznie
42	98	98,15%	1	0,2519	1	0,2519	0	0,0000	0	0,0000	0	0,0000	0	0,0000	0	0,0000	1,2519	108
43	996	99,30%	4	0,3988	3	0,2991	0	0,0000	0	0,0000	0	0,0000	0	0,0000	0	0,0000	0,6979	1003
44	99	99,00%	1	1,0000	0	0,0000	0	0,0000	0	0,0000	0	0,0000	0	0,0000	0	0,0000	1,0000	100
45	99	99,00%	1	1,0000	0	0,0000	0	0,0000	0	0,0000	0	0,0000	0	0,0000	0	0,0000	1,0000	100
46	100	100,00%	0	0,0000	0	0,0000	0	0,0000	0	0,0000	0	0,0000	0	0,0000	0	0,0000	0,0000	100
47	98	97,03%	3	2,9703	0	0,0000	0	0,0000	0	0,0000	0	0,0000	0	0,0000	0	0,0000	2,9703	101
48	99	97,06%	1	0,9804	0	0,0000	1	0,9804	1	0,9804	0	0,0000	0	0,0000	0	0,0000	2,9412	102
49	96	95,05%	2	1,9802	1	0,9901	0	0,0000	1	0,9901	0	0,0000	0	0,0000	0	0,0000	3,9604	101
50	99	99,00%	1	1,0000	0	0,0000	0	0,0000	0	0,0000	0	0,0000	0	0,0000	0	0,0000	1,0000	100
51	99	98,02%	1	0,9901	1	0,9901	0	0,0000	0	0,0000	0	0,0000	0	0,0000	0	0,0000	1,9802	101
52	999	99,40%	3	0,2983	3	0,2983	0	0,0000	0	0,0000	0	0,0000	0	0,0000	0	0,0000	0,5970	1005
53	101	100,00%	2	1,9802	0	0,0000	0	0,0000	4	3,9604	0	0,0000	0	0,0000	0	0,0000	5,9406	101
54	1003	99,50%	4	0,3960	1	0,0990	0	0,0000	0	0,0000	0	0,0000	0	0,0000	0	0,0000	0,4950	1010
55	1004	99,01%	6	0,5917	0	0,0000	0	0,0000	9	0,8915	0	0,0000	0	0,0000	0	0,0000	0,8915	1010
56	1001	99,00%	1	0,0998	0	0,0000	0	0,0000	0	0,0000	0	0,0000	0	0,0000	0	0,0000	0,0998	1002
57	994	99,20%	6	0,5988	0	0,0000	0	0,0000	2	1,9966	0	0,0000	0	0,0000	0	0,0000	0,7984	1002
58	96	96,00%	2	2,0000	2	2,0000	0	0,0000	0	0,0000	0	0,0000	0	0,0000	0	0,0000	4,0000	100
59	94	94,00%	2	2,0000	0	0,0000	0	0,0000	4	4,0000	0	0,0000	0	0,0000	0	0,0000	6,0000	100
60	97	97,00%	2	2,0000	0	0,0000	1	1,0000	0	0,0000	0	0,0000	0	0,0000	0	0,0000	3,0000	100
61	99	99,00%	0	0,0000	0	0,0000	1	1,0000	0	0,0000	0	0,0000	0	0,0000	0	0,0000	1,0000	100
62	99	99,00%	0	0,0000	0	0,0000	1	1,0000	0	0,0000	0	0,0000	0	0,0000	0	0,0000	1,0000	100
63	100	100,00%	0	0,0000	0	0,0000	0	0,0000	0	0,0000	0	0,0000	0	0,0000	0	0,0000	0,0000	100
64	994	98,01%	9	0,8904	0	0,0000	0	0,0000	1	0,9904	4	0,3964	0	0,0000	0	0,0000	1,3868	1004
65	1003	99,21%	6	0,5923	2	0,1974	0	0,0000	0	0,0000	0	0,0000	0	0,0000	0	0,0000	0,7897	1013
66	99	99,00%	1	1,0000	0	0,0000	0	0,0000	0	0,0000	0	0,0000	0	0,0000	0	0,0000	1,0000	100
67	96	96,00%	4	4,0000	0	0,0000	0	0,0000	0	0,0000	0	0,0000	0	0,0000	0	0,0000	4,0000	100
68	99	99,00%	0	0,0000	0	0,0000	0	0,0000	0	0,0000	0	0,0000	0	0,0000	0	0,0000	0,0000	100
69	1013	98,64%	5	0,4869	8	0,7790	1	0,0974	0	0,0000	0	0,0000	0	0,0000	0	0,0000	1,3632	1027
70	99	99,00%	1	1,0000	0	0,0000	0	0,0000	0	0,0000	0	0,0000	0	0,0000	0	0,0000	1,0	



„Europejski Fundusz Rolny na rzecz Rozwoju Obszarów Wiejskich: Europa inwestująca w obszary wiejskie”

nieprawidłowych gamet w przypadku translokacji wahało się od 2,58-7,50% (Bonnet-Garnier et al. 2006, Barasc et al. 2018, Galindo et al. 2021), dlatego też przyjęto średnią wartość 5% nieprawidłowych gamet.

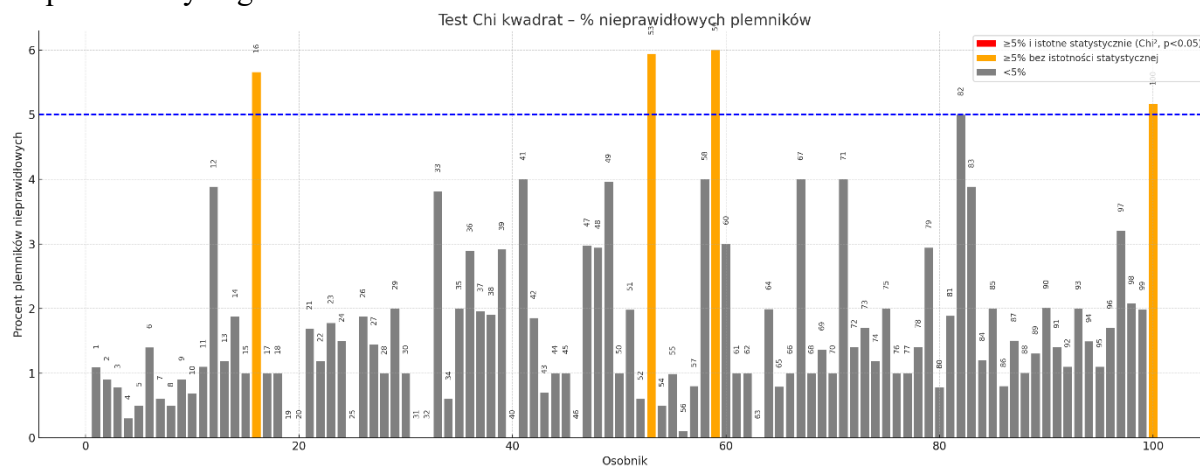


Fig 6. udział plemników z nieprawidłowościami dla każdego osobnika. Kolorem czerwonym zaznaczono przypadki.

Średnia wartość: 1,70%

Mediana: 1,25%

Przedział wartości: od 0,00% do 6,00%

Powyższy wykres przedstawia procentowy udział plemników nieprawidłowych dla każdego osobnika. Osobnik o numerze 64, mimo niewielkiego procentu plemników nieprawidłowych charakteryzował się występowaniem plemników aberrentnych w formie zbalansowanej (1;29) oraz w formie niezrównoważonej (1;29 +1 oraz 1;29 +29), wskazujących na możliwość powstawania translokacji robertsonowskiej *de novo*, jak również możliwość przekazywania jej potomstwu.

Osobniki o numerach 16, 53, 59 i 100, mimo braku istotności statystycznej oraz niewielkiego odchylenia od przyjętego progu 5% nieprawidłowych plemników, powinny zostać ponownie przebadane lub objęte szerszą diagnostyką. Uzasadnieniem jest obecność znacznego odsetka plemników w formie niezrównoważonej (1+1+29; 1+29+29) oraz zrównoważonej (1;29).

Wśród badanych krów i jałówek nie stwierdzono aberracji kariotypu. Wszystkie przebadane samice posiadały kariotyp prawidłowy 60,XX (Fig. 7).

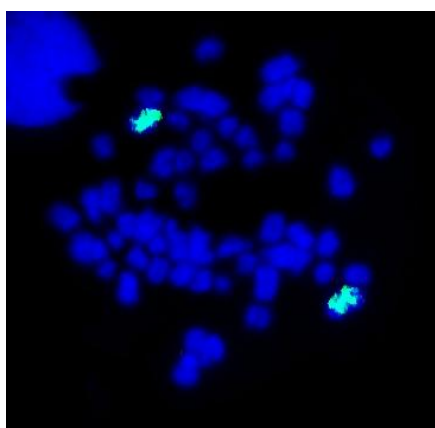


Fig. 7 Chromosomy metafazowe krowy po wykonaniu fluorescencyjnej hybrydyzacji in situ z sondami malującymi, specyficznymi do chromosomu X bydła (BTAX – kolor zielony).



„Europejski Fundusz Rolny na rzecz Rozwoju Obszarów Wiejskich: Europa inwestująca w obszary wiejskie”

Wyniki badań zostały przekazywane właścicielom zwierząt. Informacja o ewentualnym nieprawidłowym kariotypie jest wskazaniem do eliminacji z hodowli potencjalnych nosicieli translokacji, co w konsekwencji ma wpływ na korzystny efekt finansowy poprzez ograniczenie zagrożenia występowania i rozprzestrzeniania się nosicielstwa nieprawidłowości chromosomów.

W ramach realizacji projektu utworzona została baza buhajów o prawidłowym kariotypie, wolnych od translokacji. Baza ta będzie aktualizowana o kolejne przebadane zwierzęta i udostępniona rolnikom, którzy będą chcieli wdrożyć opracowane rezultaty projektu.

Efektem badawczym działania jest uzyskanie wiedzy na temat stopnia rozprzestrzenienia translokacji robertsonowskiej w populacji młodych buhajów oraz krów - uzyskanie szczegółowych informacji o liczbie nosicieli i liczbie ich ewentualnego potomstwa w populacji.

Wyniki badań były podstawą 2 prac inżynierskich oraz są opracowywane w formie dysertacji doktorskiej oraz publikacji naukowych.

Dodatkowo, efektem projektu jest zwiększenie edukacji hodowców poprzez upowszechnienie rezultatów badań oraz stworzenie sieci powiązań z odbiorcami poprzez prezentacje i szkolenia.