

макология, санитария. – 2005. – № 1. – С. 49-54.

6. Polymorphism of gene RYR1 in a Belarus meat-type pig and its association with metabolic processes and productive qualities / I. P. Sheyko [et. al.] // Russian Agricultural Sciences. – 2005. – № 9. – P. 21-24.

7. Шейко, И. П. Использование ДНК-технологий при определении стрессовой чувствительности и продуктивности свиней / И. П. Шейко [и др.] // Вести НАН Беларуси. Сер. аграрных наук. – 2005. – № 3. – С. 76-78.

8. Шейко, И. П. Генетические методы интенсификации селекционного процесса в свиноводстве : моногр. / И. П. Шейко, Т. И. Епишко ; Ин-т животноводства НАН Беларуси. – Жодино, 2006. – 197 с.

9. Шейко, И. П. Методические рекомендации по синтезу высокопродуктивных гибридов свиней / разработ. : И. П. Шейко, Т. И. Епишко, Л. А. Федоренкова ; БелНИИЖ. – Мн. : Белполиграф, 2001. – 16 с.

10. Савченко, В. К. Генетический анализ в сетевых пробных скрещиваниях / В. К. Савченко. – Мн. : Наука и техника, 1984. – 223 с.

11. Методические рекомендации по проведению ДНК-тестирования в животноводстве Беларуси / разработ. : И. П. Шейко [и др.] – Жодино, 2006. – 25 с.

12. Методические рекомендации по определению происхождения по группам крови и полиморфным белкам в свиноводстве. – Л., 1979. – 29 с.

УДК 636.4.082:612.8:577.113.1

Т.И. ЕПИШКО, О.П. КУРАК

АНАЛИЗ РАЗЛИЧНЫХ ПОПУЛЯЦИЙ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА НА НАЛИЧИЕ МУТАЦИИ BLAD В ГЕНЕ CD18

РУП «Научно-практический центр Национальной академии наук Беларуси по животноводству»

Введение. Распространение у крупного рогатого скота такого наследственного заболевания, как синдром врожденного иммунодефицита (BLAD-синдром), связывают с широким использованием быков-производителей голштинской породы – носителей этой мутации [1, 2, 3]. BLAD – это аутосомное рецессивное непатогенное заболевание, приводящее к нарушению иммунного ответа на инфекционные агенты. Молекулярной основой BLAD-синдрома является точковая замена (A→G) в положении 383 кДНК CD18, что приводит к аминокислотной замене (аспаргиновая кислота → глицин).

Клинические симптомы проявления мутации в гомозиготном состоянии разнообразны, однако доминируют нарушения респираторной функции и функции желудочно-кишечного тракта. Суть мутации заключается в том, что организм животного, несущего в своём генотипе мутантный аллель в гомозиготном состоянии (CD18^{BL/BL}), не способен противостоять вирусным и бактериальным инфекциям, что приводит к

снижению иммунитета животных и заканчивается летальным исходом в первые месяцы постнатального развития. Мутация приводит к множественным дефектам функции лейкоцитов [4, 5]. Миграция лейкоцитов к месту проникновения патогенов оказывается заблокированной, что исключает эти клетки из процесса уничтожения инфекции и вызывает усиление восприимчивости к возбудителям заболеваний. Мутация в гене CD18 нарушает нормальную функцию нейтрофилов, которые теряют способность мигрировать через эпителий капилляров и субэпителиальные мембраны. Наблюдаются характерные изменения в сывороточных белках (гипоальбуминемия и гиперглобулинонемия) и острая нейтрофилия. Картина крови у больных животных по лейкоцитарному составу напоминает лейкоз. Гетерозиготные носители мутантного гена (CD18^{TL/BL}) фенотипических отклонений не имеют.

В США 14,1 % племенных быков и 3,8 % исследованной популяции коров были оценены как гетерозиготы. Согласно научным данным, в Германии встречаемость гена BLAD составляет 6,4 %, во Франции – 6 %, в Польше – 5 %, в Чехии – 4 % [6, 7]. В России частота встречаемости составляет 5,6-6,7 %. По данным, полученным Глазко В.И. и др. [8], в некоторых хозяйствах Херсонской области частота встречаемости животных-носителей мутации достигла 14-17 %.

При этом нужно учитывать, что как в России, так и в Украине к настоящему времени протестировано незначительное количество животных, что не позволяет достоверно судить о распространении гена BLAD в этих регионах.

В странах СНГ экономический ущерб, нанесённый мутацией, сравнительно небольшой. Вероятно, это связано с тем, что генофонд отечественных пород пока находится на стадии накопления генетического груза с мутацией BLAD. Однако мировой опыт показывает, что данная мутация быстро распространяется при бесконтрольном использовании племенного материала, так как гетерозиготные животные часто относятся к группе генетических репродукторов, формирующих резерв генов популяции. Если на первом этапе поток мутантных генов в стадо идёт, в основном, через быков-производителей, сперму и трансплантацию эмбрионов, то дальнейшее его распространение связано с использованием гетерозиготных быкопроизводящих коров.

Селекция на элиминацию данной мутации на уровне фенотипа является неэффективной в связи с низкой частотой гомозигот по отношению к гетерозиготам. Единственным способом выявления мутации в гене CD18 к настоящему времени является ПЦР-ПДРФ анализ.

Международными племенными службами (США, Словакия, Голландии и других стран) введены обязательные проверки производителей на данный генетический дефект, включая выбраковку потомков

К.М. Иванхое Белл из систем искусственного осеменения и систем МОЕТ-эмбриопересадок, а также запись в родословные племенных каталогов носителей данной мутации. В большинстве развитых стран Европы и Америки созданы специальные программы по снижению частоты встречаемости аллеля BLAD-синдрома в популяциях скота чёрно-пёстрой породы. Быки-производители, являющиеся носителями мутации гена CD18, не допускаются для племенного использования.

Была поставлена цель: провести анализ распространения мутации BLAD в различных популяциях крупного рогатого скота, разводимого в республике.

Материал и методика исследований. ДНК-тестирование по локусу гена CD18 различных популяций крупного рогатого скота методом ПЦР-ПДРФ (полимеразная цепная реакция – полиморфизм длин рестрикционных фрагментов) проведено в РУП «Научно-практический центр Национальной академии наук Беларуси по животноводству».

Ядерную ДНК выделяли из спермы (гранулы и пайеты) и ткани перхлоратным методом с собственными модификациями. Основные растворы для выделения ДНК, амплификации и рестрикции готовили по Маниатису, Фрич Э., Сэмбруку Дж. [9].

Для амплификации фрагмента гена CD18 использовали олигонуклеотидные праймеры:

BLAD1: 5' -TGA GAC CAG GTC AGG CAT TGC GTT CA- 3'

BLAD2: 5'- CCC CCA GCT TCT TGA CGT TGA CGA GGT C -3'.

ПЦР-программа: «горячий старт» – 5 мин при 93°C; 35 циклов: денатурация – 1 мин при 93°C, отжиг – 1 мин при 60°C, синтез – 1 мин при 72°C; достройка – 5 мин при 72°C.

Предлагаемый температурный режим (температура отжига 60°C) позволил получить амплификат достаточной концентрации и высокой специфичности: одна полоса величиной 132 п. н.

Расщепление продуктов амплификации проводилось с использованием рестриктазы TaqI. Был подобран оптимальный состав реакционной смеси объёмом 20 мкл, включающий 1 х буфер для рестрикции и 15 единиц активности рестриктазы TaqI. Установлено, что для успешного проведения рестрикции достаточно 8 мкл полученного амплификата с концентрацией 0,5-1 мкг/мкл.

Концентрацию ДНК, специфичность амплификата и результаты рестрикции оценивали электрофоретическим методом в агарозном геле, окрашенном бромистым этидием, с помощью трансиллюминатора в проходящем УФ-свете с длиной волны 260 нм. В качестве маркера использовали ДНК плазмиды pBR322, расщеплённую рестриктазой AluI. Для анализа распределения рестрикционных фрагментов ДНК в агарозном геле после электрофореза применяли компьютерную видеоси-

стему и программу VItran.

Частоту генотипов и аллелей рассчитывали стандартными биометрическими методами [10].

Результаты эксперимента и их обсуждение. Для проведения анализа различных популяций крупного рогатого скота по полиморфным вариантам гена CD18 и выявления мутации BLAD было проведено ДНК-тестирование методом ПЦР-ПДРФ быков-производителей, племенных коров и ремонтных бычков белорусской чёрно-пёстрой породы в количестве 928 голов на РСУП «Минскплемпредприятие», РСУП «Брестплемпредприятие», РСУП «Гродноплемпредприятие», РУСХП «Оршанское племпредприятие», РСУП «Заречье» и РУСП «Племенной завод «Красная Звезда» Минской области. Результаты тестирования показали наличие полиморфизма по данному гену, представленному двумя аллелями: CD18^{TL} и CD18^{BL}. Были рассчитаны частоты встречаемости аллелей гена CD18 в различных популяциях крупного рогатого скота (табл. 1).

Таблица 1

Частоты встречаемости аллелей гена CD18 в различных популяциях крупного рогатого скота

Принадлежность	Половозрастная группа	n	Частота встречаемости аллелей	
			TL	BL
РСУП «Минскплемпредприятие»	быки-производители	18	1,0	-
РСУП «Брестплемпредприятие»	быки-производители	112	0,991	0,009
РСУП «Гродноплемпредприятие»	быки-производители	63	0,976	0,024
В среднем по быкам-производителям		193	0,987	0,013
РУСХП «Оршанское племпредприятие»	ремонтные бычки	234	0,996	0,004
В среднем по быкам-производителям и ремонтным бычкам		427	0,992	0,008
РСУП «Заречье» - ГПП	коровы	68	0,941	0,059
РСУП «Заречье» - ферма	коровы	109	0,954	0,046
РУСП «Племенное хозяйство Красная Звезда»	коровы	324	0,996	0,004
В среднем по коровам		501	0,979	0,021

В среднем по всем популяциям 1,3 % быков-производителей являлись носителями аллеля CD18^{BL}, однако в РСУП «Гродноплемпредприятие» этот показатель был несколько выше и составил 2,4 %. В РСУП «Минскплемпредприятие» все исследованные животные оказались свободными от синдрома иммунодефицита, что, возможно, связано с малой численностью выборки (n=18). Среди протестированных ремонтных бычков РУСХП «Оршанское племпредприятие» только двое животных оказались носителями мутации BLAD. В целом частоты встречаемости аллеля CD18^{BL} в исследованных популяциях вари-

ровали в пределах от 0 до 0,024.

В протестированных популяциях племенных коров полученные результаты были иными. Так, если из 324-х протестированных коров РУСП «Племенное хозяйство «Красная Звезда» две головы имели аллель CD18^{BL}, то в РСУП «Заречье» (стада фермы и ГПП) частота встречаемости мутантного аллеля достигала 4,6 и 5,9 %, соответственно. Это свидетельствует о большей распространенности мутации среди данной популяции, что, вероятно, связано с использованием гетерозиготных быков.

В ходе исследований были идентифицированы генотипы CD18^{TL/TL} – здоровые животные и CD18^{BL/TL} – животные-носители синдрома иммунодефицита. Генотип CD18^{BL/BL} отсутствовал, так как тестированию были подвергнуты только взрослые животные. Частоты встречаемости различных генотипов по локусу гена CD18 представлены в табл. 2.

Таблица 2
Частоты встречаемости различных генотипов по локусу гена CD18

Принадлежность	Половозрастная группа	n	Частота встречаемости генотипов, %		
			TL/TL	TL/BL	BL/BL
РСУП «Минскплемпредприятие»	быки-производители	18	100	-	-
РСУП «Брестплемпредприятие»	быки-производители	112	98,2	1,8	-
РСУП «Гродноплемпредприятие»	быки-производители	63	95,2	4,8	-
В среднем по быкам-производителям		193	97,4	2,6	-
РУСХП «Оршанское племпредприятие»	ремонтные бычки	234	99,1	0,9	-
В среднем по быкам-производителям и ремонтным бычкам		427	98,4	1,6	-
РСУП «Заречье» - ГПП	коровы	68	88,2	11,8	-
РСУП «Заречье» - ферма	коровы	109	90,8	9,2	-
РУСП «Племенное хозяйство «Красная Звезда»	коровы	234	99,1	0,9	-
В среднем по коровам		501	93,1	6,9	-

В среднем по популяциям быков-производителей 97,4 % (188 животных) оказались гомозиготным по гену BLAD (свободными от мутации), однако носительство мутации BLAD в РСУП «Брестплемпредприятие» составило 1,8 %, а в РСУП «Гродноплемпредприятие» достигло 4,8 %. В популяции ремонтных бычков, протестированных в РУСХП «Оршанское племпредприятие», только 0,9 % животных являлись носителями мутации и имели генотип CD18^{BL/TL} с частотой аллеля CD18^{BL} = 0,004. В РСУП «Минскплемпредприятие» особи, гетеро-

зиготные по гену CD18, отсутствовали.

Процесс наследования данного гена подчиняется закону Менделя, однако отсутствие в наших исследованиях гомозиготных рецессивных по данному гену животных, вероятно, объясняется тем, что ДНК-тестированию были подвергнуты только взрослые животные. Больные животные, несущие мутацию в гомозиготе, вызывающую нарушения функционирования нейтрофилов, погибают на ранних стадиях онтогенеза.

В отличие от данных, полученных Kaminski S., Czarnik U. [11], частота встречаемости в протестированных нами популяциях коров была значительно выше, чем в популяциях быков-производителей. Так, популяция коров РУСП «Племенное хозяйство «Красная Звезда» была практически свободна от мутации (99,0 % – здоровые животные). Стада же коров РСУП «Заречье» (ферма и ГПП) были не столь благополучны: 9,2 и 11,8 % животных являются носителями заболевания. Вероятно, разницу, выявленную в этих популяциях, можно объяснить с позиции эффекта родоначальника, то есть ведения интенсивной репродукции генотипов гетерозиготных производителей, являющихся не только носителями мутации, но и улучшателями продуктивности.

Таким образом, своевременное выявление носителей данной мутации позволит избежать скрещивания двух гетерозиготных особей или, наоборот, использовать при разведении под контролем в случае их высокой препотентности. Чтобы не допустить дальнейшего бесконтрольного распространения мутации, необходимо наряду с тестированием быков-производителей проводить тестирование популяций быкопроизводящих коров и ремонтного молодняка.

Выявление в популяциях скрытых генетических дефектов (мутаций), снижающих племенные качества животных, позволит решить проблему повышения резистентности племенного поголовья и оздоровления селекционно-племенного поголовья республики.

Одновременно ведутся работы по созданию банка ДНК племенного поголовья крупного рогатого скота республики.

Заключение. Анализ различных популяций крупного рогатого скота выявил наличие мутации BLAD в гене CD18, что указывает на необходимость обязательного проведения ДНК-диагностики крупного рогатого скота для исключения из процесса воспроизводства животных-носителей генетически обусловленного BLAD-синдрома и оздоровления селекционно-племенного поголовья республики.

Литература

1. Molecular definition of the bovine granulocytopeny syndrome: identification of deficiency of the Mac-1 (CD11b/CD18) glycoprotein / V. E. Kehrli [at el.] // Am. J. Vet. Res. – 1990. – Vol. 51, № 11. – P. 1826-1936.

2. ДНК-технологии оценки сельскохозяйственных животных / Л. А. Калашникова [и др.]. – Лесные Поляны, 1999. – 147 с.
3. Скрининг гена BLAD-синдрома у животных черно-пестрого корня / Н. С. Марзанов [и др.] // Ветеринарная медицина. – 2000. – № 3. – С. 59-61.
4. Identification and prevalence of a genetic defect that causes leucocyte adhesion deficiency in Holstein cattle / D. E. Shuster [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1992. – Vol. 892. – P. 9225-9229.
5. Tammen, I. Weiterentwicklung des DNA-Tests auf BLAD für den Einsatz in Rinderzucht und klinischer Diagnostik / I. Tammen. – Hannover, 1994.
6. Kaminski, S. Detection of bovine leukocyte adhesion deficiency (BLAD) carries using a new PCR test / S. Kaminski, U. Czarnik // J. Appl. Genet. – 1997. – P. 51-55.
7. Natonek, M. Identifikacja mutacji blad u budla metoda PCR-RFLP / M. Natonek // Biul. inform. / Ins. zootechn. – Krakow, 2000. – № 4(227). – P. 29-33.
8. Введение в ДНК-технологию / В. И. Глазко [и др.]. – М. : ФГНУ «Росинформгротех», 2001. – 434 с.
9. Маниатис, Т. Молекулярное клонирование / Т. Маниатис, Э. Фрич, Дж. Сэмбрук. – М. : Мир, 1984. – 480 с.
10. Меркурьева, Е. К. Генетика с основами биометрии / Е. К. Меркурьева, Е. К. Безрезовский, Г. Н. Шангин. – М. : Колос, 1983. – 357 с.
11. Kaminski, S. Detection of bovine leukocyte adhesion deficiency (BLAD) carries using a new PCR test / S. Kaminski, U. Czarnik // J. Appl. Genet. – 1997. – P. 51-55.

УДК 636.22/28:636.2.082.233

И.Н. КОРОНЕЦ, Н.И. ПЕСОЦКИЙ, Н.В. КЛИМЕЦ,
Ж.И. ШЕМЕТОВЕЦ, М.В. ПОЛЯНСКАЯ

ОЦЕНКА ЭКСТЕРЬЕРА БЫКОВ-ПРОИЗВОДИТЕЛЕЙ БЕЛОРУССКОЙ ЧЁРНО-ПЁСТРОЙ ПОРОДЫ РАЗНЫХ ВОЗРАСТОВ

РУП «Научно-практический центр Национальной академии наук
Беларуси по животноводству»

Введение. Конечной целью любой программы селекции на уровне популяции является перенос эффекта селекции, полученного в племенной части породы, на остальное поголовье. При этом решается вопрос о путях переноса эффекта селекции только через мужские или женские особи. В генетическом развитии передача генов следующему поколению происходит по четырём путям: отцы быков, отцы коров, матери быков и матери коров. По расчётам Н. Skjervold [1] вклад отцов быков в общее генетическое улучшение популяции составляет 46 %, отцов коров – 24, матерей быков – 24 и матерей коров – всего 6 %. Следовательно, в современных условиях ведения селекции на уровне популяции требования к потенциальным отцам быков будут постоянно повышаться [2, 3, 4]. Отцы быков должны характеризовать-