

О.П. КУРАК, Ж.А. ГРИБАНОВА

НАСЛЕДСТВЕННАЯ МУТАЦИЯ VLAD В ПОПУЛЯЦИИ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА БЕЛОРУССКОЙ ЧЁРНО-ПЁСТРОЙ ПОРОДЫ

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

Введение. Голштинская порода крупного рогатого скота, используемая при совершенствовании белорусской чёрно-пёстрой породы, – одна из лучших специализированных молочных пород мира. В то же время в популяции голштинского скота наблюдается ряд заболеваний, имеющих наследственный характер и обусловленных мутационными изменениями, происходящими на генном или хромосомном уровне. Использование в системе искусственного осеменения быков-производителей – носителей мутаций влечёт за собой дальнейшее их распространение. При этом наблюдается снижение воспроизводительной способности и плодовитости, жизнеспособности молодняка, продолжительности хозяйственного использования животных, что отрицательно сказывается на рентабельности отрасли [1].

Одним из наиболее серьёзных в экономическом отношении заболеваний является VLAD-синдром (дефицит лейкоцитарной адгезии или синдром врождённого иммунодефицита), приводящий к разрушению иммунной системы животных [2, 3, 4].

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. При менделевском типе наследования в случае скрещивания гетерозиготных родителей 50 % потомков будут носителями VLAD-синдрома, 25 % погибнет и лишь 25 % молодняка будет свободно от мутации.

Генофонд отечественной породы пока находится на стадии накопления генетического груза с мутацией VLAD, однако при отсутствии системы контроля это может привести к повышению частоты встречаемости мутантного аллеля в популяции и, как следствие, увеличению случаев гибели племенного молодняка.

Применение ДНК-диагностики иммунодефицита крупного рогатого скота, основанной на использовании метода ПЦР-ПДРФ, позволяет идентифицировать наследственную мутацию VLAD у животных в раннем возрасте, изучить генеалогическую структуру породы по локу-

су данного гена, оценить влияние мутации на хозяйственно-ценные признаки, выявить пути её распространения, обеспечить ввод в племенные стада здоровых животных, решить проблему повышения резистентности племенного поголовья и сохранности молодняка [5, 6, 7].

Была поставлена цель – проанализировать наличие мутации BLAD в популяции белорусской чёрно-пёстрой породы, изучить пути её распространения, установить взаимосвязь мутации с хозяйственно-значимыми признаками и предложить пути решения проблемы элиминации животных-носителей генетически обусловленного BLAD-синдрома и оздоровления селекционно-племенного поголовья республики.

Материал и методика исследований. Объектом исследований явились быки-производители (708 гол.), племенные коровы (1344 гол.) и ремонтные бычки (497 гол.) белорусской чёрно-пёстрой породы. Предметом исследований – биопробы ткани, спермы и крови.

Исследования проводились на базе шести госплемпредприятий республики, РУСХП «Оршанское племпредприятие» Витебской, РУП «Заречье», филиал РУСП «Э/б «Жодио» и РУСП «Племенной завод «Красная Звезда» Минской, ГУСП «Племзавод «Муховец» Брестской областей.

ДНК-тестирование животных на наличие мутации проведено методом ПЦР-ПДРФ, с использованием праймеров BLAD1 и BLAD2 и эндонуклеазы TaqI.

Концентрация, нативность, подвижность ДНК, концентрация и специфичность амплификата, а также результаты расщепления продуктов ПЦР оценивались электрофоретическим методом с последующей визуализацией на трансиллюминаторе в УФ-свете с длиной волны 260 нм. Для анализа распределения рестрикционных фрагментов ДНК использовали компьютерную видеосистему и программу VITran. В качестве маркера использовали ДНК плазмиды pBR322, расщепленной рестриктазой AluI либо рестриктазой BsuRI.

Протестированные животные были распределены согласно идентифицированным генотипам: CD18^{TL/TL} (животные, свободные от мутации) и CD18^{BL/TL} (животные – гетерозиготные носители мутации).

Рассчитаны частоты встречаемости аллелей и генотипов в различных половозрастных группах, в том числе у быков-производителей – на линейном уровне. С использованием критерия χ^2 проведена оценка генного равновесия в изученных хозяйствах.

Оценка воспроизводительной способности и качества спермопродукции быков-производителей различных генотипов по локусу гена CD18 проведена по следующим показателям: количество эякулятов, получено спермы (мл), объем эякулята (мл), концентрация спермы (млрд./мл), активность (баллов), количество осемененных маток (гол.),

процент оплодотворения (%), в том числе после 1-го осеменения (%), отелилось (гол.), получено приплода (гол.). Изучены показатели относительной племенной ценности быков-производителей по удою, жирно- и белковомолочности дочерей в зависимости от генотипа животных по локусу гена CD18.

Анализ молочной продуктивности племенных коров различных генотипических групп проведён (с учётом возраста животных) по следующим показателям: удой (кг), содержание жира (%) и белка (%) в молоке.

Проведены исследования по взаимосвязи мутации BLAD у племенного молодняка с показателями роста, развития и естественной резистентности организма [8, 9]. По результатам ДНК-тестирования в РУСХП «Оршанское племпредприятие» были сформированы контрольная и опытная группы ремонтных бычков генотипов CD18^{TL/TL} (животные, свободные от мутации) и CD18^{BL/TL} (животные – носители синдрома иммунодефицита), соответственно, по принципу параналогов. При этом учитывались: дата рождения, живая масса при рождении, возраст постановки на элевёр и выращивание до элевёра в одном хозяйстве (для минимизации различий в кормлении и содержании до постановки на элевёр). Также при формировании групп по возможности отбирались бычки, имеющие одного отца и полновозрастных матерей с уровнем продуктивности 9000-9700 кг молока. Кормление бычков на элевёре осуществлялось согласно типовым схемам выращивания до 16-месячного возраста. Условия содержания животных соответствовали ветеринарно-зоогигиеническим требованиям.

Показатели роста и развития (живая масса, среднесуточный прирост) определялись на основании результатов ежемесячных контрольных взвешиваний. В возрасте 12 месяцев были оценены основные промеры: косая длина туловища, высота в холке, обхват за лопатками. Кроме того, в возрасте 1 года бычки были оценены по экстерьеру по основным признакам (типу и крепости телосложения, росту, глубине туловища, положению и ширине зада, копыт и конечностей) в баллах.

Определение морфологических, биохимических и гуморальных факторов защиты организма ремонтных бычков проводилось в лаборатории технологии производства свинины и зоогигиены РУП «Научно-практический центр Национальной академии наук Беларуси по животноводству». Были определены следующие показатели: морфологические и биохимические показатели крови: эритроциты ($10^{12}/л$), гематокрит (%), тромбоциты ($10^3/л$), лейкоциты ($10^9/л$), гемоглобин (г/л), общий белок (г/л), альбумины (г/л), глобулины (г/л), аланинаминотрансфераза (ед./л); аспаратаминотрансфераза (ед./л); глюкоза (ммоль/л); холестерин (ммоль/л); гуморальные факторы защиты: бактерицидная активность (%); лизоцимная активность (%); бета-лизинная активность

(%); титр нормальных агглютининов.

Показатели бактерицидной и лизоцимной активности определяли [8, 9, 10] нефелометрическим методом, бета-лизинной – по ускоренному методу О.В. Бухарина. Биохимические показатели крови (аланинаминотрансферазу, аспартатаминотрансферазу, глюкозу, холестерин, общий белок, белковые фракции) определяли на приборе CORMAY LUMEN, морфологические – на приборе Medonic 620. Пробы крови брали из яремной вены до утреннего кормления у животных каждой группы.

Полученные данные обработаны статистическими методами по Рокитскому.

Результаты эксперимента и их обсуждение. Результаты исследований показали наличие мутации во всех протестированных половозрастных группах (таблица 1).

Таблица 1 – Частота встречаемости мутации BLAD в популяции белорусской чёрно-пёстрой породы

| Принадлежность | Кол.-во голов | Частота встречаемости мутации, % |
|--|---------------|----------------------------------|
| Быки-производители | | |
| РСУП «Минскплемпредприятие» | 119 | 0,8 |
| РСУП «Брестплемпредприятие» | 262 | 1,5 |
| РСУП «Гродноплемпредприятие» | 79 | 3,8 |
| РСУП «Витебскплемпредприятие» | 83 | 1,2 |
| РСУП «Гомельплемпредприятие» | 71 | 5,6 |
| РСУП «Могилевплемпредприятие» | 94 | 1,1 |
| В среднем | 708 | 1,6 |
| Ремонтные бычки | | |
| РУСХП «Оршанское племпредприятие» | 497 | 1,3 |
| Племенные коровы | | |
| РУП «Заречье» | 177 | 5,1 |
| Филиал «Э/б «Жодино» РУП «Заречье» | 659 | 0,3 |
| РУСП «Племенной завод «Красная Звезда» | 324 | 0,3 |
| ГУСП «Племзавод «Муховец» | 184 | 0,8 |
| В среднем | 1344 | 2,0 |

В среднем по госплемпредприятиям 1,6 % быков-производителей

являлись носителями аллеля CD18^{BL}. Наиболее благополучными оказались племпредприятия Минской, Могилевской и Витебской областей (0,8 %, 1,1 и 1,2 % носителей мутации, соответственно), однако в РСУП «Гродноплемпредприятие» и РСУП «Гомельплемпредприятие» число быков-производителей с носительством BLAD-синдрома достигло 3,8 и 5,6 %, соответственно.

Выявлено, что 1,3 % протестированных ремонтных бычков имели в своем генотипе мутацию BLAD и принадлежали к трем линиям голштинского корня: Монтвик Чифтейна 95679, Рефлекшн Соверинга 198998 и Вис Айдиала 933122. Установлены отцы бычков-носителей мутации: Кэптен 750048, Ворривор 750033, Фарли 750065 и Милкстар 750039. В одном из случаев установлено, что передача мутантного гена ремонтному бычку была осуществлена через мать – быкопроизводящую корову, являющуюся носителем мутации в гетерозиготной форме. Генотип отца этого бычка был свободен от носительства мутации.

Полученные результаты свидетельствуют о возможности передачи данной наследственной мутации племенному молодняку чёрнопёстрой породы не только через отцов, но и через быкопроизводящих коров, имеющих мутантный аллель в своем генотипе.

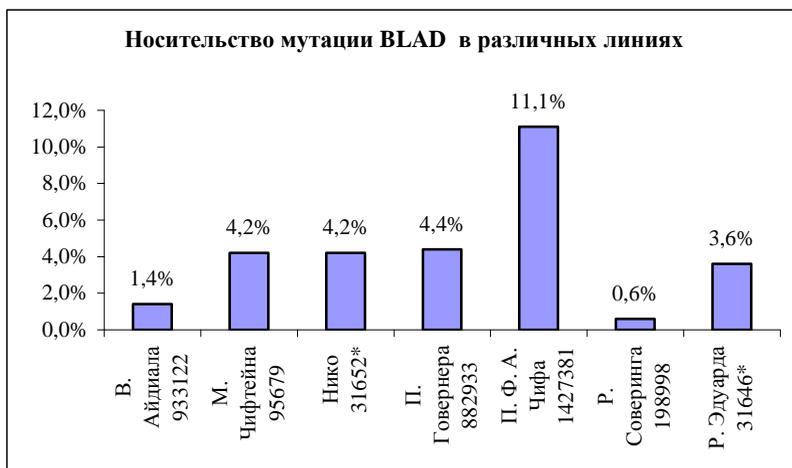
Проведено изучение распространения мутации среди поголовья племенных коров. Установлено, что в хозяйствах с различным уровнем продуктивности: РУП «Заречье» (6 тыс. кг молока); филиал «Э/б «Жодино» РУП «Заречье» (8 тыс. кг молока); РУСП «Племенной завод «Красная Звезда» Минской области и ГУСП «Племзавод «Муховец» Брестской области (9 и более тыс. кг молока) частота носительства BLAD-синдрома составила в среднем 2,0 %. Стадо РУСП «Племенной завод Красная Звезда» оказалось практически свободным от мутации: носителями синдрома иммунодефицита являлись лишь 0,6% протестированных коров. Состояние на двух фермах РУП «Заречье» было не столь благополучно: 9,2 и 11,8 % животных являлись носителями заболевания. Вероятно, разницу, выявленную в этих хозяйствах, можно объяснить с позиции эффекта родоначальника, то есть ведения интенсивной репродукции генотипов гетерозиготных производителей, являющихся не только носителями мутации, но и улучшателями продуктивности.

Проанализировано распространение носительства синдрома иммунодефицита среди коров различных возрастных групп: первотёлки, коровы второй лактации и полновозрастные коровы (3-й и более лактации). Выявлено, что большинство животных-носителей мутации относилось к группе полновозрастных и лишь две являлись первотёлками. При этом носительство мутации у первотёлок установлено только в филиале «Э/б «Жодино» РУП «Заречье». В остальных хозяйствах все

протестированные первотёлки были гомозиготными по данному гену ($CD18^{TL/TL}$). Очевидно, это связано с наличием в настоящее время контроля за закупаемыми и выращиваемыми тёлками, а также используемыми в закреплении быками-производителями на наличие в их генотипе мутации BLAD.

Проведено изучение родословных племенных коров, имеющих в своем генотипе аллель $CD18^{BL}$. Установлено, что носителями мутации являлись животные, отцы которых принадлежат к линиям Рефлекшн Соверинга 198998, Монтвик Чифтейна 95679, П. Говернера 882933 и Вис Айдиала 933122.

Проведен анализ распространенности мутации BLAD среди десяти основных линий быков-производителей голландского и голштинского корней, используемых в республике при совершенствовании белорусской чёрно-пёстрой породы. Свободными от мутации оказались животные двух линий голландского (Аннес Адема 30587 и Хильтес Адема 37910) и одной – голштинского (Силинг Трайджун Рокита 252803) корня. В то же время носительство BLAD-синдрома выявлено в линиях Монтвик Чифтейна 95679, Нико 31652, П. Говернера 882933, Рутьес Эдуарда 31646, Рефлекшн Соверинга 198998, Вис Айдиала 933122 и П.Ф.А. Чифа 1427381. Наиболее высокие частоты встречаемости BLAD-синдрома отмечены в линиях Монтвик Чифтейна 95679 (4,2 %), Нико 31652 (4,2 %), П. Говернера 882933 (4,4 %) и Пони Фарм Арлинда Чифа 1427381 (11,1 %) (гистограмма 1).



Гистограмма 1 – Частота встречаемости мутации в различных линиях

Продолжающееся распространение заболевания связано с тем, что гетерозиготные животные фенотипически не отличаются от здоровых, поэтому селекция по фенотипу не приводит к желаемым результатам: выбраковке носителей мутации. К тому же отсутствие до последнего времени генетического контроля за данной мутацией создало предпосылки для её наследования среди животных племенных стад. Использование таких коров в качестве быкопроизводящих приведёт к дальнейшему распространению мутации.

Проведён анализ воспроизводительной способности и качества спермопродукции животных различных генотипов по гену CD18 на линейном уровне. Рассматривались показатели быков-производителей, принадлежащих к шести линиям, имеющим носителей мутации: Вис Айдиала 933122, Монтвик Чифтейна 95679, П. Говернера 882933, Рефлекшн Соверинга 198998, Рутъес Эдуарда 31646 и Нико 31652. Полученные результаты свидетельствуют, что показатели воспроизводительной способности и качества спермопродукции быков-производителей определяются, в первую очередь, их линейной принадлежностью и не зависят от генотипа животных по локусу гена CD18. Установленная разнонаправленная и, в большинстве случаев, недостоверная связь между данными показателями и генотипом быков по локусу гена CD18 дает возможность вести селекцию на элиминацию животных-носителей мутации без снижения племенной ценности производителей по данным признакам.

Изучены показатели относительной племенной ценности (ОПЦ) быков-производителей различных генотипов по локусу гена CD18. Не выявлено достоверной взаимосвязи между наличием в генотипе животного мутантного аллеля CD18^{BL} и относительной племенной ценностью по жирно- и белковомолочности: так, если гетерозиготные быки Музыкант 31128 и Лотос 128 являлись улучшателями по всем изученным признакам, то Репейник 5237 проявил себя как ухудшатель (все значения ОПЦ менее 100), а такие производители, как Метан 4169 и Признак 4954 имели значения ОПЦ по отдельным признакам как выше, так и ниже 100. Величина комплексного индекса животных-носителей BLAD-синдрома составляла в среднем 103 балла.

Проведены исследования влияния носительства мутации BLAD на молочную продуктивность племенных коров. Показатели содержания жира и белка (%) варьировали в зависимости от хозяйства и генотипа в пределах 3,66-4,32 и 3,00-3,22, соответственно, и были в одних случаях выше у носителей мутации, в других – у животных, свободных от неё. В целом, анализ молочной продуктивности не выявил существенных различий между покаателями животных-носителей BLAD-синдрома и свободных от мутации. Это свидетельствует об отсутствии негативно-го влияния мутации BLAD на данные показатели. Установлено также,

что наличие в генотипе коров мутантного аллеля не приводит к достоверному повышению показателей молочной продуктивности и, следовательно, выбраковка животных-носителей синдрома иммунодефицита не будет оказывать отрицательного влияния на показатели продуктивности в среднем по стаду. В то же время, использование в селекционном процессе таких коров в качестве быкопроизводящих может привести к дальнейшему распространению мутации среди племенного поголовья республики.

Изучение возрастной динамики показателей роста и развития молодняка с различными генотипами по локусу гена BLAD не выявило существенных различий между данными показателями в зависимости от наличия или отсутствия в их генотипе мутации BLAD, однако во все возрастные периоды наблюдалась тенденция некоторого снижения живой массы и среднесуточного прироста у гетерозиготных животных по сравнению с гомозиготными. Величины основных показателей экстерьера в возрасте двенадцати месяцев соответствовали или приближались к оптимальным и не различались в опытной и контрольной группах. Это подтверждает данные об отсутствии фенотипических отличий у животных обеих групп, что не позволяет проводить выбраковку гетерозиготных особей-носителей мутации по внешним признакам.

Проведён анализ результатов морфологических и биохимических показателей крови бычков в группах с различными генотипами по локусу гена BLAD: носителей мутации и животных, свободных от мутации. У животных-носителей мутации выявлено повышенное (на 13,5, 14,8 и 24,6 %, соответственно) содержание лейкоцитов по сравнению с группой гомозиготного генотипа, что свидетельствует о функциональном состоянии кроветворных органов подопытных животных, и, прежде всего, об усилении лейкопоэтического аппарата у бычков опытной группы. Некоторое повышение уровня глюкозы у животных обеих групп, выявленное в возрасте восемнадцати месяцев (до 5,06 ммоль/л), вероятно, связано с сезонным фактором кормления. Разница по содержанию общего белка в сыворотке крови контрольной и опытной групп бычков всех возрастов была несущественной, что указывает на стабильность данного показателя. Содержание альбуминов в сыворотке крови увеличивалось с возрастом и варьировало от 35,58 до 37,64 г/л, что свидетельствует об усилении функциональной деятельности печени. Количество глобулинов также несколько возросло к восемнадцати месяцам (на 9,3 %) по сравнению с шестью, что, вероятно, связано с повышением уровня защитных свойств организма. При этом более высокие значения данного показателя наблюдались в группе животных генотипа CD18^{BL/TL}.

Установлено увеличение лизоцимной активности сыворотки крови с возрастом бычков в среднем по группам с 4,28 до 7,96 %. При этом

более высокие значения данного показателя наблюдались в группе бычков с гетерозиготным генотипом CD18^{BL/TL}. При практически одинаковых значениях АЛТ у здоровых бычков и бычков-носителей мутации, в контрольной группе выявлена повышенная активность АСТ.

Анализ показателей гуморальных факторов защиты не подтвердил наличие статистически существенной разницы в показателях БАСК, ЛАСК и бета-лизинной активности.

Таким образом, большинство показателей естественной резистентности находились в пределах физиологических норм для молодняка крупного рогатого скота. В то же время в группе гетерозиготных бычков наблюдалось возрастание числа лейкоцитов, а также снижение активности аспаратаминотрансферазы в сыворотке крови.

Проведённая производственная проверка подтвердила эффективность применения ДНК-диагностики иммунодефицита для исключения из процесса селекции животных-носителей BLAD-синдрома. Установлено, что ДНК-тестирование бычков на носительство мутации следует проводить непосредственно в племенных хозяйствах, в возрасте 2-4 месяцев.

Заключение. 1. Носительство мутации установлено у 1,6 % протестированных бычков-производителей, 2,0 % высокопродуктивных коров и 1,3 % ремонтных бычков. Выявлены пути дальнейшего распространения мутации в республике – не только через бычков-носителей синдрома, но и через бычкопроизводящих коров.

2. Не установлено достоверного влияния мутации на показатели воспроизводительной способности, качества спермопродукции и относительной племенной ценности бычков-производителей, молочной продуктивности высокопродуктивных коров, показатели роста и развития ремонтных бычков.

3. На основе анализа результатов морфологических и биохимических показателей крови ремонтных бычков-носителей мутации и свободных от неё не подтверждено наличие достоверной связи между носительством мутации и показателями содержания белков сыворотки крови, а также показателями бактерицидной, лизоцимной и бета-лизинной активности сыворотки крови. Во всех возрастных периодах установлено возрастание числа лейкоцитов на 13,5-24,6 % ($P < 0,001$), а также снижение активности аспаратаминотрансферазы в сыворотке крови на 2,6-19,5 % (в шесть месяцев разница достоверна при $P < 0,05$) в группе гетерозиготных бычков по сравнению со здоровыми животными.

4. Проведение ДНК-тестирования бычков-производителей, ремонтных бычков перед продажей на элеватор и бычкопроизводящих коров позволит исключить из процесса воспроизводства животных-носителей генетически обусловленного BLAD-синдрома и решить проблему оз-

дорования селекционно-племенного поголовья республики. Введение принципа тестирования молодых бычков предотвратит последствия проявления мутации в возрасте 6-7 лет, необходимых для оценки и квалификации производителей.

Литература

1. О накоплении груза мутаций в породах крупного рогатого скота при интенсивных технологиях воспроизводства и улучшения по целевым признакам / А. И. Жигачев [и др.] // Сельскохозяйственная биология. – 2008. – № 6. – С. 25-32.
1. Скрининг гена дефицита лейкоцитарной адгезии у черно-пестрого голштинизированного скота / Н. С. Марзанов [и др.] // Сельскохозяйственная биология. – 2003. – № 6. – С. 23-29.
3. Czarnik, U. Hodowlane i genetyczno-populacyjne aspekty występowania BLAD (Bovine Leu kocyte Adhesion Deficiency) u bydła rasy czarno-białej / U. Czarnik ; Uniwersytet Warmińsko-Mazurskiego. – Olsztyn, 2000. – 46 p.
4. Immunohistochemical location of adhesion molecules (CD62 and Cd18) in the mammary gland of dairy cows / M. Simon [et al.] // Czech. Anim. Sci. – 2007. – Vol. 52(4). – P. 88-95
5. Identification and prevalence of a genetic defect that causes leucocyte adhesion deficiency in Holstein cattle / D. E. Shuster [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. – 1992. – Vol. 892. – P. 9225-9229
6. Kuczka, A. Controlling bovine leucocyte adhesion deficiency (BLAD) / A. Kuczka, E. Kuhmann, B. Sshwenger // Tierzucker. – 2000. – Vol. 45. – P. 32-35
7. Natonek, M. Identyfikacja mutacji blad u bydła metoda PCR-RFLP / M. Natonek // Biul. inform. / Ins. zootechn. – Krakow, 2000. – № 4(227). – P. 29-33
8. Плященко, С. И. Естественная резистентность животных / С. И. Плященко, В. Т. Сидоров. – Л. : Колос, 1979. – 184 с.
9. Определение естественной резистентности и обмена веществ у сельскохозяйственных животных / В. Е. Чумаченко [и др.]. – Киев, 1990. – 138 с.

(поступила 18.01 2011 г.)

УДК 636.2.034:612.02

Л.Л. ЛЕТКЕВИЧ, А.И. ГАНДЖА, В.П. СИМОНЕНКО, А.А. ПУТИК

ВИТРИФИКАЦИЯ РАННИХ ЭМБРИОНОВ КОРОВ, ПОЛУЧЕННЫХ ВНЕ ОРГАНИЗМА

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

Введение. В настоящее время в скотоводстве для сохранения генетических ресурсов широко применяются такие технологии, как криоконсервирование спермы и эмбрионов, полученных методом трансплантации. Технология глубокого замораживания последних хорошо отработана, используется в практике и предусматривает следующие