

9. Лобан Н. А., Зиновьева Н. А., Василюк О. Я. Гладырь Е. А. Молекулярная генная диагностика в свиноводстве Беларуси // Дубровицы, ВИЖ, 2005. – 42 с.
10. Рекомендации по использованию гена-маркера IGF-2 в селекции свиней / В. А. Дойлидов [и др.]. – Витебск: УО ВГАВМ, 2010. – 15 с.
11. Эффективность использования генов-маркеров EPOR, MUC4 и IGF-2 при повышении продуктивных качеств свиней пород белорусской селекции / В. А. Дойлидов [и др.] // Ученые записки. – 2009. – Т. 45, вып. 2, ч. 2. – С. 47-51.

УДК 636.2.082

ОПРЕДЕЛЕНИЕ РЕЦЕССИВНЫХ МУТАЦИЙ BLAD, CVM И BS В ПОПУЛЯЦИИ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА МОЛОЧНОГО НАПРАВЛЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

**О. А. Епишко¹, В. К. Пестис¹, Л. А. Танана¹, Т. И. Кузьмина³,
Е. С. Чебуранова¹, М. Ю. Шевченко¹, А. П. Петрова¹,
Н. А. Глинская², Р. В. Трахимчик¹**

¹ – УО «Гродненский государственный аграрный университет»
г. Гродно, Республика Беларусь
(Республика Беларусь, 230008, г. Гродно, ул. Терешковой, 28
e-mail: labgen@mail.ru)

² – УО «Полесский государственный университет»

³ – ФГБНУ Всероссийский научно-исследовательский институт
генетики и разведения сельскохозяйственных животных

Ключевые слова: ген, CVM, BLAD, BS, ПЦР, Real-Time

Аннотация. Интенсивная селекция на увеличение молочной продуктивности, а также использование импортного генетического материала в племенном животноводстве Республики Беларусь привела к распространению генетических мутаций, которые вызывают гибель и нежизнеспособность молодняка. Выявление генетических аномалий у животных обязательно, т.к. без исключения у них летальных мутаций продажа племенных бычков невозможна. Молекулярно-генетические методы позволяют выявлять генетические аномалии на уровне ДНК, такие как CVM, BLAD, BS в раннем возрасте. Выявление нежелательных аллелей позволит исключить из процесса воспроизводства носителей заболеваний и вести селекцию на элиминацию мутаций. В статье представлена методика определения рецессивных мутаций у животных белорусской черно-пестрой породы и популяции голштинизированного черно-пестрого скота Республики Беларусь. Дана характеристика генетической структуры изучаемой популяции.

DEFINITION OF RECESSIVE MUTATIONS OF BLAD, CVM AND BS IN POPULATION OF CATTLE OF THE LACTIC DIRECTION OF REPUBLIC OF BELARUS

O. A. Epishko¹, B. K. Pestis¹, L. A. Tanana¹, T. I. Kuzmina³,
E. C. Cheburanova¹, M. Y. Shevchenko¹, A. P. Petrova¹,
H. A. Glinskaya², R. V. Trahimchik¹

¹ – EI «Grodno State Agrarian University»
(Belarus, Grodno, 230008, 28 Tereshkova st.
e-mail: labgen@mail.ru)

² – EI «Polessky State University» (Belarus, Pinsk, 225710,
23 Dnieper flotilla Str)

³ – All-russian research institute of genetics and breeding farm animals
St. Petersburg, Russian Federation)

Key words: gene, CVM, BLAD, BS, PCR, Real-Time.

Summary. Intensive selection on increase in lactic efficiency, and use of import genetic material in breeding livestock production of Republic of Belarus led to distribution of genetic mutations, which cause death, and frailty of young growth. Detection of genetic anomalies at animals is obligatory, without exception at them lethal mutations sale of breeding bull-calves is impossible. Molecular and genetic methods allow revealing genetic anomalies at the level of DNA such as CVM, BLAD, BS at early age. Identification of undesirable alleles will allow excluding from process of reproduction of carriers of diseases and a message selection on an elimination of mutations. In work, the technique of definition of recessive mutations is presented to populations of cattle of the lactic direction of Republic of Belarus. The characteristic of genetic structure of the studied population is given.

(Поступила в редакцию 01.06.2017 г.)

Введение. Сегодня эффективность экономического обеспечения продукции животноводства Республики Беларусь определяет увеличение продуктивности животных и эффективное использование их генетического потенциала. Интенсивное использование крупного рогатого скота на увеличение молочной продуктивности привело к снижению репродуктивной способности, что обусловлено генетическими факторами, которые влияют на фертильность, увеличение сервис-периода, абортруемость на поздних стадиях стельности, резорбцию эмбрионов.

На основании закона Республики Беларусь № 24-3 «О племенном деле в животноводстве» все племенные животные (материал) подвергаются обязательному мониторингу на элиминацию генетически детерминированных заболеваний. Селекция, которая базируется на молекулярно-генетических методах, позволяет вести целенаправленный отбор животных в раннем возрасте независимо от их пола, поскольку данные методы основаны на анализе генотипа.

К мутациям крупного рогатого скота, которые обуславливают наследственные аномалии и оказывают негативное влияние на репро-

дуктивную способность, можно отнести CVM (комплексный порок позвоночника), BLAD (синдром иммунодефицита) и BS (брахиспинальный синдром).

Комплексный порок позвоночника (CVM) впервые был упомянут датскими учеными в 2000 г. Установлено, что тип наследования данной мутации аутосомно-рецессивный, спаривание носителей CVM друг с другом заканчивается абортруемостью телят или мертворождением. В 50% случаев появляются телята, которые являются скрытыми носителями порока, и лишь 25% заканчиваются рождением потомства, свободного от (CVM) комплексного порока позвоночника. Мертворожденных телят с комплексным пороком позвоночника, особенно тех, кто рождается раньше срока, зачастую относят к обычным случаям недоразвитости и не реагируют как на носителей заболевания [1, 2, 4].

Дефицит лейкоцитарной адгезии (BLAD) – синдром иммунодефицита – заболевание, обусловленное рецессивным типом наследования мутации гена CD18. Фенотипически мутация не проявляется, только у гомозиготных по мутантному гену CD18 телят снижается естественная резистентность к инфекциям, такие телята более подвержены респираторным заболеваниям. Рецессивные гомозиготные по генной мутации особи погибают либо в утробе матери, либо в первые месяцы после рождения. У быков-производителей носителей данной мутации выявлен более низкий процент оплодотворения, количество полученного приплода ниже до 7% [4, 5, 6].

Брахиспинальный синдром (BS) – рецессивный генетический дефект молочного голштинского крупного рогатого скота. Мутация происходит в гене FANCI. Основной экономический урон в результате возникновения мутации BS проявляется в снижении плодовитости. Животные, которые являются носителями данной мутации, характеризуются малой массой тела, пороками позвоночника в виде укороченного столба, длинными и тонкими конечностями. Кроме того, у пораженных животных отмечается нижний брахигнатизм и пороки внутренних органов, в частности сердца, почек и половых желез. Рецессивные гомозиготные носители данной мутации не выживают [2, 3].

Частота встречаемости данных мутаций колеблется от 2% BS – до 18 (CVM) – 20 (BLAD) %, поэтому выявление и мониторинг данных мутаций необходимо проводить для элиминации данных пороков с последующей выбраковкой данных животных из процесса воспроизводства.

Цель работы: разработать систему методов определения генетически рецессивных мутаций BLAD, CVM и BS у животных белорус-

ской черно-пестрой породы и популяции голштинизированного черно-пестрого скота Республики Беларусь.

Материал и методика исследований. Исследования по определению рецессивных мутаций BLAD, CVM и BS у животных белорусской черно-пестрой породы и популяции голштинизированного черно-пестрого скота Республики Беларусь проводили на базе отраслевой научно-исследовательской лаборатории «ДНК-технологий» УО «ГГАУ».

Рецессивные мутации BLAD и CVM определяли методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме Real-Time с использованием специфических пар праймеров и зондов. Один набор зондов совпадает с мутирующим геном и обозначается 5' при помощи 6-карбоксифлуоресцеина (FAM), ROX, другой зонд совпадает с вариантом дикого типа HEX, Cy5.

В качестве биопроб для проведения ДНК-тестирования использовали биологический материал в виде ткани, спермы животных, разводимых в племенных хозяйствах Республики Беларусь. В процессе взятия каждую пробу подписывали индивидуальным номером. С целью длительного хранения и использования для ряда анализов ДНК выделяли перхлоратным методом.

Для диагностики точечной мутации CVM использовали праймеры:

F – 5' – AGC TGG CAC AAT TTG TAG GT – 3' и R – 5' – CTC AAA GTA AAC CCC AGC AAA GC – 3' и меченые F – HEX – 5' TCA TGG CAG TTC TCA – 3' и R – FAM – 5' – TCA TGG CAT TTC TCA – 3'.

Для диагностики точечной мутации BLAD использовали праймеры: F – 5' – CAG TTG CGT TCA ATG TGA CCT T – 3' и R – 5' – GAG TAG GAG AGG TCC ATC AGG TA – 3' и меченые F – Cy5 – 5' CCC CAT CGA CCT GTA C – 3' и R – ROX – 5' – CCC ATC GGC TGT TAC – 3'.

Реакционная смесь объемом 25 мкл включала в себя готовую реакционную смесь (Master Mix) – 12,5 мкл, прямые и обратные праймеры – 0,625 мкл, ДНК (20-40 нг), бидистиллированную воду.

ПЦР программа: 1 шаг – 95⁰С – 10 мин, 2 шаг – 95⁰С – 15 с и 60⁰С – 60 с, количество циклов 35. Результатом анализа является определение комплексной аномалии позвоночника (CVM) и дефицита лейкоцитарной адгезии (BLAD) у крупного рогатого скота.

Интерпретацию результатов анализа исследуемых образцов проводили в соответствии с таблицей.

Таблица – Сравнение исследуемых образцов

Генетическая аномалия	BLAD	
Аллель	Аллель А (нормальный)	Аллель G (мутантный)
Канал	ROX	Cy5
BLAD не обнаружен	+	-
BLAD обнаружен	+	+
Генетическая аномалия	CVM	
Аллель	Аллель G (нормальный)	Аллель T (мутантный)
Канал	FAM	HEX
CVM не обнаружен	+	-
CVM обнаружен	+	+

Если в результате анализа реакция положительная по каналам ROX и Cy5, то животное является носителем синдрома иммунодефицита BLAD (рисунок 1).

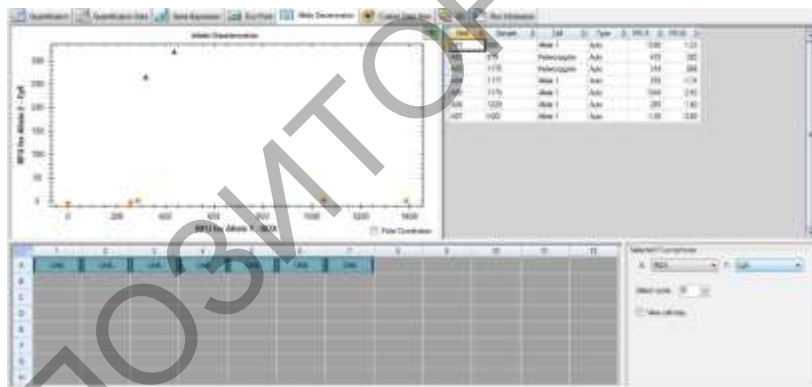


Рисунок 1 – распределение аллелей BLAD

Если в результате анализа реакция положительная по каналам FAM и HEX, то животное является носителем комплексного порока позвоночника CVM (рисунок 2).

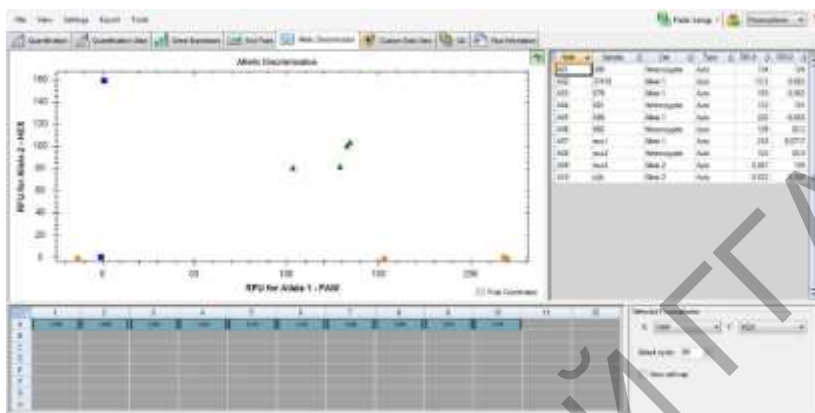


Рисунок 2 – распределение аллелей CVM

Результат анализа для образцов следует считать неопределенным, если результат реакции по каналам FAM, HEX, ROX, Cy5 отрицательный.

В этом случае необходимо повторное исследование образца.

Диагностику носительства заболевания брахиспина (BS) проводили методом ПЦР.

Праймеры:

1: 5'-GCTCAAGTAGTTAGTTGCTCCACTG-3';

2: 5'-ATAAATAAATAAAGCAGGATGCTGAAA-3'.

Общий объем реакционной смеси 25 мкл: 24,5 мкл амплификационной смеси + 0,5 мкл ДНК. 1,25 мкл – MgCl₂ 25мМ; 2мкл – dNTP; 2.5 мкл – буфер; 0,25 мкл каждого праймера; 0,5 мкл. Taq-полимераза, H₂O – 17,8 мкл.

ПЦР-программа: «Горячий старт» – 5 мин при 94⁰С; 35 циклов: денатурация – 30 с при 94⁰С, отжиг – 1 мин при 58⁰С, синтез – 2,5 мин при 72⁰С; достройка – 10 мин при 72⁰С.

Концентрацию и специфичность амплификата оценивали электрофоретическим методом в 1,5% агарозном геле (при напряжении 110 В). Генотипы идентифицируются без проведения рестрикции, непосредственно по результатам амплификации (рисунок 3).

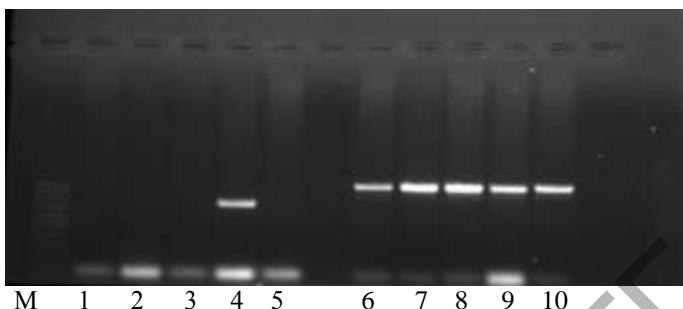


Рисунок 3 – Электрофореграмма ПЦР анализа брахиспинального синдрома (BS) крупного рогатого скота. Дорожки 1, 2, 3, 5 – животные, свободные от (BS), колонка 4 – носитель (BS). Дорожки 6-10 – дикий тип, подтверждающий прохождение реакции ПЦР.

Генотипы идентифицируются без проведения рестрикции непосредственно по результатам амплификации:

-BSF – отсутствие продукта амплификации (свободный от мутации);

-BSC – 409 п.н. (носитель мутации).

Международная отметка в родословной племенных животных: BSF – свободный от мутации, BSC – носитель мутации.

Результаты исследований и их обсуждение. В результате проведенных исследований разработана система методов определения генетически рецессивных мутаций BLAD, CVM и BS у животных белорусской черно-пестрой породы и популяции голштинизированного черно-пестрого скота Республики Беларусь, которая позволяет с более высокой точностью проводить анализ. Метод полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме Real-Time с использованием специфических пар праймеров и зондов позволяет выявлять мутации BLAD и CVM одновременно в одной реакции, метод выявления брахиспинального синдрома является не рутинным и недорогим, что делает его доступным к массовому анализу.

Изучив генетическую структуру в популяции крупного рогатого скота ($n=600$), установлено, что частота встречаемости аллелей распределилась следующим образом: частота мутантного аллеля CVM^{CV} составила 0,008; аллеля CVM^{CC} – 0,992, частота встречаемости скрытых носителей CVM составила 1,7%. Частота встречаемости аллеля BLAD^{BL} в изучаемой популяции составила 0,025, а частота встречаемости скрытых носителей BLAD – 5%. Частота встречаемости мутантного аллеля BS^{BY} составила 0,016 или 3,2% соответственно.

Заключение. В результате проведенных исследований разработанная система методов по определению генетически рецессивных мутаций BLAD, CVM и BS у животных белорусской черно-пестрой породы и популяции голштинизированного черно-пестрого скота Республики Беларусь позволила с высокой точностью выявить скрытых носителей. Сравнивая результаты с данными прошлых лет, по выявлению генетических мутаций наблюдается тенденция их снижения, что связано с ведением селекции на элиминацию мутаций. Аналогичная ситуация наблюдается и в других странах, где в селекционные программы включено обязательное тестирование племенных животных. Однако из результатов исследований видно, что частота встречаемости скрытых носителей еще достаточно велика и колеблется от 1,7% до 5%. Поэтому необходимо продолжать работу по проверке ремонтного молодняка и животных племенного ядра на носительство мутаций, что позволит исключить из программы воспроизводства нежелательные генотипы. Использование современных молекулярно-генетических методов позволит с высокой достоверностью при рождении животного выявлять генетические аномалии, тем самым предотвратить их распространение в племенном животноводстве Республики Беларусь.

ЛИТЕРАТУРА

1. Новикова, Л. Ф. Complex Vertebral Malformation (CVM) – новая наследственная патология у голштинского скота / Л. Ф. Новикова, Д. В. Карликов // Мат. межд. научно-практической конф. по проблеме: «Повышение конкурентоспособности животноводства и задачи кадрового обеспечения». Быково. – 2002. – Вып. 8. – С. 35-38.
2. Agerholm, J. S., Bendixen, C., Andersen, O., Arnbjerg, J., 2001. Complex vertebral malformation in Holstein calves. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 13, 283-289.
3. Deletion in the FANCI gene compromises fertility by causing fetal death and brachyspina / C. Carole [et al.] // *J. PLOS* – 2012/ – Vol. 7, N 8. – P. 1-7.
4. Detection of recessive mutations (CVM, BLAD, and RED FACTOR) in Holstein calf / L. Betka [et al.] // *J. Central European Agriculture* – 2018 / – Vol. 9, N 1. – P. 101-106.
5. Stuber M., Pohlenz J., Leibold W., Simon D., Kuczka A., Schwenger B., Lienau A., Kuhlmann E., Tammen L., Piturru P. Deficienza di adesione dei leucociti nei bovini (BLAD) un difetto ereditario da porre sotto vigilanza // *Praxis Vet.* – 1992. – V.8. – N3. – P. 5-7.
6. Van Garderen. Post-mortem findings in calves suffering from bovine leukocyte adhesion deficiency (BLAD). / E. Van Garderen, K.E. Muller, G.H. Wentink // *Acta Vet Scand* – 1994. – P. 24-26.