

Не допустить распространения мутации

Интенсивное использование мирового породного генофонда и биотехнологий репродукции (искусственное осеменение, трансплантация эмбрионов) позволило значительно повысить генетический потенциал продуктивности животных за счет получения потомства производителей – лидеров породы. Вместе с тем в поголовье все чаще проявляются признаки генетической «эрозии» – накопления груза вредных рецессивных мутаций. При этом снижаются воспроизводительная способность и плодовитость, жизнеспособность новорожденных и молодняка, резистентность к респираторным заболеваниям и продолжительность хозяйственного использования животных. Все это отрицательно сказывается на рентабельности производства. У крупного рогатого скота (КРС) выявлено свыше 400 генетически обусловленных морфологических и функциональных нарушений [1].

Мария Михайлова, замдиректора по научной и инновационной работе Института генетики и цитологии НАН Беларуси, завлабораторией генетики животных, кандидат биологических наук



Наталья Волчок, младший научный сотрудник лаборатории генетики животных Института генетики и цитологии НАН Беларуси



Елена Белая, младший научный сотрудник лаборатории генетики животных Института генетики и цитологии НАН Беларуси



Один из генетических дефектов, наследуемых по аутосомно-рецессивному типу, то есть проявляющийся только у животных, гомозиготных по соответствующему гену и не имеющих клинических проявлений у гетерозигот, – дефицит адгезии лейкоцитов, введенный в генофонд черно-пестрого скота в виде рецессивной мутации в гене CD18. Она впервые была обнаружена у быков голштинской породы, которых широко использовали для улучшения генетического потенциала других популяций КРС.

Первые случаи дисфункции лейкоцитов были зарегистрированы в 1983 г. у коров этой породы. В 1987 г. в Японии сообщили о нескольких случаях проявления у телят подобных клинических симптомов, которые сопровождалась постоянными или рецидивирующими инфекциями, связанными с устойчивой нейтрофилией. В 1990 г. у телят с гранулоцитопатическим синдромом обнаружили недостаточную экспрессию молекулы β 2-интегрина на поверхности лейкоцитов и назвали данное заболевание по аналогии с лейкоцитарной адгезией человека (LAD) – дефицитом адгезии лейкоцитов (BLAD) крупного рогатого скота [2].

Клинически болезнь проявляется в подавлении клеточного иммунитета, при котором блокируется способность лейкоцитов проникать через кровеносные капилляры и двигаться с кровотоком к очагу инфекции. Эти нарушения способствуют развитию иммунодефицита. Животные с мутантным аллелем не имеют фенотипических проявлений заболевания, но становятся скрытыми носителями мутации. У особей, гомозиготных по рецессивному аллелю, резко снижается устойчивость к бактериальным и вирусным инфекциям, замедляется рост. У пораженных животных отмечаются тяжелые язвы на слизистых оболочках ротовой полости, гингивит, потеря зубов, рецидивирующая диарея, хроническая пневмония. Биохимические показатели крови указывают на постоянную нейтрофилию. Большинство телят погибает в возрасте 3–7 месяцев [3].

Молекулярной основой BLAD является точковая мутация в кодирующей части гена CD18, имеющая аутосомно-рецессивный характер наследования. Замена (аденин – гуанин) в положении 383 кДНК приводит к аминокислотной замене в молекуле белка (Asp → Gly), в результате чего нарушается вся цепочка экспрессии β -интегрина, поверхностного белка нейтрофилов; лейкоциты теряют свою активность и способность выполнять защитную фагоцитарную функцию. В итоге – падеж животных от любой инфекции [4].

Мы поставили перед собой задачу – провести анализ генетической структуры популяций КРС некоторых животноводческих комплексов Беларуси по локусу гена CD18, изучить встречаемость мутантного аллеля, выявить скрытых носителей мутации BLAD. Исследова-

ния проводились на коровах и быках черно-пестрой породы, принадлежащих госплемпредприятиям Минской, Гомельской, Гродненской, Брестской, Витебской и Могилевской областей. Для анализа был создан банк ДНК, включающий более 1300 образцов, полученных из спермы и крови методом солевой экстракции по стандартной методике [5]. Выделенную ДНК ресуспензировали и измеряли ее концентрацию с помощью электрофореза в 0,8%-ном агарозном геле, используя маркер молекулярного веса GeneRuler™1kbDNA Ladder.

С целью типирования аллельных вариантов гена CD18 был применен метод ПЦР с последующим анализом ПДРФ. На основе данных о сиквесе участка гена, в котором была обнаружена мутация, было синтезировано два олигонуклеотидных праймера, которые амплифицируют участок размером 132 пар нуклеотидов [5].

После гидролиза наличие двух фрагментов длиной 71 и 61 пн относительно маркера свидетельствовало об отсутствии мутации (анализируемое животное являлось здоровым, гомозиготный доминантный генотип TL/TL). У скрытых носителей иммунодефицита (гетерозиготный генотип TL/BL) было три фрагмента длиной 132, 71 и 61 пн.

С 2006 по 2010 г. было проведено ДНК-тестирование на носительство мутации BLAD быков-производителей и быкопроизводящих коров шести областных племпредприятий. Проанализировано 1344 животных, из них выявлено более 30 носителей мутантного аллеля.

Анализ генетической структуры по гену CD18 показал, что в популяции быков-производителей частота скрытых носителей мутации в гене CD18 в среднем составила 1,3% (табл. 1), а в популяции коров почти в 3 раза выше – 3,6% (табл. 2). Это можно объяснить средним соотношением между самцами и самками при искусственном осеменении для быков исключительно высокого качества, которое достигает 1:100 000. Частота встречаемости аллеля BLAD в исследованной популяции быков составила 0,01, коров – 0,02 (табл. 1, 2).

Таблица 1. Анализ генетической структуры популяций быков-производителей по гену CD18 (BLAD)

Принадлежность	Кол-во особей	Частота генотипов, %		χ^2	Частота аллелей	
		TL/TL	TL/BL		TL	BL
РУП «Витебск-племпредприятие»	198	99,5	0,5	197,25	0,997±0,04	0,003±0,04
Минское племпредприятие	147	99,3	0,7	146,25	0,997±0,05	0,003±0,05
СПК «Снов»	64	95,3	4,7	6,55	0,98±0,02	0,02±0,02
РУСПП «1-я Минская птицефабрика»	51	100	0		1	0
РДУП «Экспериментальная база Жодино»	26	100	0		1	0
СПК «Першаи-2003»	17	100	0		1	0
РУП «Совхоз «Слуцк»	6	100	0		1	0
Племпредприятия Гродненской обл.	99	99	1	99,25	0,995±0,07	0,005±0,07
РУСП «Гомель госплемпредприятие»	86	95,3	4,7	4,72	0,98±0,02	0,02±0,02
ГУСП «Племзавод «Мухавец»	53	100	0		1	0
РУСП «Оршанское племпредприятие»	10	100	0		1	0
РУСП «Шикотвичи»	8	100	0		1	0
Всего	765	98,7	1,3	6,8	0,99±0,04	0,01±0,04

Таблица 2. Анализ генетической структуры популяций быкопроизводящих коров по гену CD18 (BLAD)

Принадлежность	Кол-во особей	χ^2	Частота генотипов, %		Частота аллелей	
			TL/TL	TL/BL	TL	BL
ГУСП «Племзавод «Мухавец»	50	50,25	98	2	0,98±0,02	0,02±0,02
СПК «Красная Звезда»	41	41,25	97,6	2,4	0,99±0,02	0,01±0,02
СПК «Снов»	312	0,63	95,2	4,8	0,98±0,008	0,02±0,008
РУСПП «1-я Минская птицефабрика»	134	7,71	97	3	0,99±0,009	0,01±0,009
РДУП «Экспериментальная база «Жодино»	14		100	0	1	0
СПК «Першаи-2003»	7		100	0	1	0
РУСП «Гомельгосплемпредприятие»	7		100	0	1	0
РУСП «Оршанское племпредприятие»	10		100	0	1	0
РУСП «Шикотвичи»	4		100	0	1	0
Всего	579		96,4	3,6	0,98±0,006	0,02±0,006

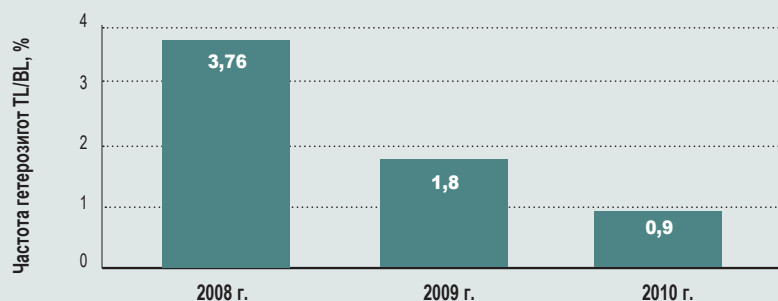


Рис. 1. Динамика распределения частот гетерозиготных генотипов TL/BL по гену CD18 в популяции КРС Беларуси с 2008 по 2010 г.

Также проведен анализ соответствия частот генотипов теоретически ожидаемому распределению Харди – Вайнберга с применением критерия χ^2 . Из проанализи-

зированных групп животных только в популяции коров СПК «Снов» наблюдаемое распределение частот генотипов совпадает с теоретически ожидаемым равнове-

ным распределением Харди – Вайнберга (табл. 2). В остальных популяциях – как быков, так и коров – наблюдалась низкая гетерозиготность (табл. 1, 2).

При анализе частот гетерозиготного генотипа по годам была выявлена явная тенденция к снижению: если в 2008 г. этот показатель составлял 3,76%, то в 2010-м – уже 0,9% (рис. 1).

В результате установлена частота гетерозиготного генотипа по гену CD18 в популяции быков-производителей и коров черно-пестрой породы, выявлены скрытые носители мутации, прослежена динамика распределения частот гетерозиготных генотипов в популяции КРС Беларуси с 2008 по 2010 г.

Проведенный мониторинг подтверждает необходимость контроля по распространению мутации с целью оздоровления поголовья крупного рогатого скота нашей страны. Чтобы не допустить дальнейшего бесконтрольного распространения мутации и избежать связанных с этим существенных экономических потерь, необходимо своевременно выявлять носителей BLAD, тестировать популяции быкопроизводящих коров, ремонтного молодняка и всех элитных быков, сперма которых широко используется на племпредприятиях для искусственного осеменения.

Литература

1. Жигачев А.И., Эрнст Л.К., Богачев А.С. О накоплении груза мутаций в породах крупного рогатого скота при интенсивных технологиях воспроизводства и улучшения по целевым признакам // Сельскохозяйственная биология. №6, 2008.
2. Nagahata H. Bovine leukocyte adhesion deficiency (BLAD) // J. Vet. Med. Sci. №12, 2004.
3. Nagahata H., Nochi H., Tamoto K., Noda H., Kociba G.J. Expression and role of adhesion molecule CD 18 on bovine neutrophils // Can. J. Vet. Res. 1995.
4. Зиновьева Н.А. Введение в молекулярную генную диагностику сельскохозяйственных животных. – Дубровицы, 2002.
5. Miller S.A., Dykes D.D., Polesky H.F. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells // Nucleic Acids Res. №3, 1988.

Беларусь – Венесуэла: сотрудничество генетиков

Институт генетики и цитологии НАН Беларуси плодотворно сотрудничает с научными учреждениями Венесуэлы. Совместно с Национальным институтом сельскохозяйственных исследований (ИНИА) этой страны выполняются два договора, финансируемые венесуэльской стороной на общую сумму 465 тыс. долл. Руководитель проекта от Беларуси – директор ИГЦ, член-корреспондент Александр Кильчевский, от Венесуэлы – президент ИНИА Иван Хиль Пинто.

Александр Кильчевский, директор Института генетики и цитологии НАН Беларуси, член-корреспондент



Мария Михайлова, замдиректора по научной и инновационной работе Института генетики и цитологии НАН Беларуси, завлабораторией генетики животных, кандидат биологических наук



С 2009 г. ведется разработка методов ДНК-типирования хозяйственно-ценных генов для использования в селекции сельскохозяйственных растений и животных. В минувшем году собраны образцы растений и животных для молекулярно-генетических исследований в Беларуси, на основе которых создан банк ДНК. Оценено генетическое разнообразие местных сортов и селекционных образцов картофеля и томата с помощью SSR-анализа, проведена ДНК-диагностика крупного рогатого скота по генам устойчивости к наследственным заболеваниям. Прделана организационная работа по подготовке обучающего курса белорусских специалистов по методам молекулярно-генетических исследований в Венесуэле.