СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫЕ НАУКИ. ВЕТЕРИНАРИЯ И ЗООТЕХНИЯ

DOI: 10.32786/2071-9485-2020-02-26

ESTIMATION OF THE MEETING OF THE HCD GENETIC DEFECT IN THE HOLSTEIN CATTLE BREEDS OF THE NORTH-WEST REGION

M. V. Pozovnikova, O. V. Mitrofanova, N. V. Dementieva

Russian Research Institute of Farm Animal Genetics and Breeding –

Branch of the L. K. Ernst Federal Science Center for Animal Husbandry, St. Petersburg, Russia

Received 10.01.2020

Submitted 18.05.2020

*The work was performed in the framework of the State Assignment, project number
AAAA-A18-118021590138-1*

Summary

The article presents the results of Holstein cattle population screening for the carriage of a genetic defect in cholesterol deficiency of Holstein cattle (HCD).

Abstract

Introduction. Monitoring for genetic defects in cattle is an important part of preventive veterinary medicine. The accumulation of a load of genetic mutations and the progressive increase in homozygosity cause a decrease in herd fertility due to an increase in the number of abortions and stillborn fetuses, as well as the birth of sick calves. HCD fertility haplotype (Haplotype Cholesterol Deficiency) is a recessive genetic defect in Holstein cattle. Homozygous calves develop cachexia, idiopathic diarrhea and dehydration within a short time after birth (from a few days to several weeks). This genetic defect is sublethal. The cause of HCD is a 1233 bp insertion in the fifth exon of the APOB gene (apolipoprotein B). As a result of mutation, there is a violation of the protein synthesis of APO [12]. The aim of our work was to assess the occurrence of the HCD mutation in herds of Holstein cattle in the North-Western region of Russia. An object. The object of the study was DNA samples obtained from the blood leukocytes of cattle. **Materials and methods.** The work was carried out in the period 2017-2019. A total of 2010 heads of cows and heifers belonging to ten different breeding farms using Holstein or black-motley cattle with a high proportion of blood (95% >) in Holstein breed were examined. Animal samples were random. Animal genotyping was carried out by polymerase chain reaction with allele-specific primers (AS-PCR). If there is an insertion in the APO gene, a 436 bp fragment is amplified. The wild type is characterized by amplification of a fragment of 249 bp in size. [9]. Electrophoresis was performed on a 1.5% agarose gel with the addition of ethidium bromide and photographed under UV light. **Results and conclusions.** The percentage of heterozygous HCD carriers in the herds analyzed ranged from 2.89 to 13.33%, and the average percentage throughout the sample was 7.31%. To improve herds in farms, as a rule, bulls with high breeding value are used. Actively used bulls are often carriers of genetic anomalies, which contributes to the accumulation of a load of genetic defects in populations [2]. By early 2019, the HCD genetic defect had the highest prevalence rate in Holstein breed compared to other fertility haplotypes. Its share was 14.3%, and the occurrence of other haplotypes ranged from 0.00 - 5.8% [16]. Since the sperm of imported bulls is high in the artificial insemination system in Russia, domestic breeders must know and take into account the status of the bull by HCD when selecting parental pairs. At the same time, the role of genomic testing of cows and heifers is growing, since this is the only way to separate HCD animal carriers and individuals free from this genetic defect [16]. The proposed integrated approach to the identification of the HCD haplotype in animals of both sexes will eliminate the likelihood of the appearance of homozygous descendants and avoid economic losses in animal husbandry. It is recommended to conduct a regular analysis of the frequency of occurrence of the HCD fertility haplotype not only in bulls, but also in cows, which will avoid the appearance of homozygous descendants and possible economic losses.

Key words: *Holstein breed, fertility haplotype, cholesterol deficiency, HCD.*

Citation. Pozovnikova M. V., Mitrofanova O. V., Dementieva N. V. Estimation of the occurrence of a HCD genetic defect in herds of Holstein cattle in the Northwest region. *Proc. of the Lower Volga Agro-University Comp.* 2020. 2(58). 265-271 (in Russian). DOI: 10.32786/2071-9485-2020-02-26.

Author's contribution. All authors of this research paper have directly participated in the planning, execution, or analysis of this study. All authors of this paper have read and approved the final version submitted.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest

УДК 636.234.1:575.174.015.3

ОЦЕНКА ВСТРЕЧАЕМОСТИ ГЕНЕТИЧЕСКОГО ДЕФЕКТА HCD В СТАДАХ ГОЛШТИНСКОГО СКОТА СЕВЕРО-ЗАПАДНОГО РЕГИОНА

М. В. Позовникова, кандидат биологических наук

О. В. Митрофанова, кандидат биологических наук

Н. В. Дементьева, кандидат биологических наук

*Всероссийский научно-исследовательский институт генетики и разведения
сельскохозяйственных животных — филиал Федерального государственного бюджетного
научного учреждения «Федеральный научный центр животноводства —
ВИЖ имени академика Л. К. Эрнста», г. Санкт-Петербург, Россия*

Дата поступления в редакцию 10.01.2020

Дата принятия к печати 18.05.2020

**Работа выполнена в соответствии с темой Министерства образования
Российской Федерации, номер госрегистрации – АААА-А18-118021590138-1**

Актуальность. Мониторинг на наличие генетических дефектов у крупного рогатого скота является важной частью профилактической ветеринарии. Накопление груза генетических мутаций и поступательный рост гомозиготности являются причиной снижения фертильности стад из-за повышения количества абортос и мертворожденных плодов, а также рождения больных телят. Гаплотип фертильности HCD (Haplotype Cholesterol Deficiency) – рецессивный генетический дефект голштинского скота. У гомозиготных телят в течение короткого времени после рождения (от нескольких дней до нескольких недель) развивается кахексия, идиопатическая диарея и обезвоживание. Данный генетический дефект является сублетальным. Причиной HCD является инсерция размером 1233 bp в пятом экзоне гена *АРОВ* (аполипопротеина В). В результате мутации происходит нарушение синтеза белка АРОВ [7]. **Целью** нашей работы была оценка встречаемости мутации HCD в стадах голштинского скота Северо-Западного региона России. **Объект.** Объектом исследования были образцы ДНК, полученные из лейкоцитов крови крупного рогатого скота. **Материалы и методы.** Работа проводилась в период 2017-2019 гг. Всего было исследовано 2010 голов коров и тёлочек, принадлежащих десяти различным племенным хозяйствам, использующим голштинский или черно-пестрый скот с высокой долей кровности (95 % >) по голштинской породе. Выборки животных являлись случайными. Генотипирование животных проводили методом полимеразной цепной реакции с аллель специфичными праймерами (АС-ПЦР). При наличии инсерции в гене *АРОВ* амплифицируется фрагмент размером 436 п.н. Для дикого типа характерна амплификация фрагмента размером 249 п.н. [10]. Электрофорез проводили в 1,5 % агарозном геле с добавлением бромистого этидия и фотографировали при УФ-свете. **Результаты и выводы.** Процент животных-гетерозиготных носителей HCD в анализируемых стадах варьировал в пределах 2,89-13,33 %, а средний процент по всей выборке составил 7,31 %. Для совершенствования стад в хозяйствах, как правило, используют быков с высокой племенной ценностью. Активно используемые быки зачастую являются носителями генетических аномалий, что способствует накоплению груза генетических дефектов в популяциях [5]. К началу 2019 года генетический дефект HCD имел самый высокий процент встречаемости в голштинской породе в сравнении с другими гаплотипами фертильности. Его доля составила 14,3 %, а встречаемость других гаплотипов колебалась в пределах 0,00 – 5,8 % [16]. Так как в системе искусственного осеменения России высока доля спермы импортных быков, отечественные селекционеры при подборе родительских пар должны знать и учитывать статус быка по HCD. При этом возрастает роль геномного тестирования коров и тёлочек, поскольку это

единственный способ отделить животных-носителей HCD и свободных от данного генетического дефекта особей [16]. Предлагаемый комплексный подход к выявлению гаплотипа HCD у животных обоего пола позволит исключить вероятность появления гомозиготных потомков и избежать экономических потерь в животноводстве. Рекомендуется проводить регулярный анализ частоты встречаемости гаплотипа фертильности HCD не только у быков, но и у коров, что позволит избежать появления гомозиготных потомков и возможных экономических потерь.

Ключевые слова: голштинская порода скота, гаплотип фертильности, дефицит холестерина, гаплотип HCD, генетические дефекты скота.

Цитирование. Позовникова М. В., Митрофанова О. В., Дементьева Н. В. Оценка встречаемости генетического дефекта HCD в стадах голштинского скота Северо-Западного региона. *Известия НВ АУК*. 2020. 2(58). 265-271. DOI: 10.32786/2071-9485-2020-02-26.

Авторский вклад. Все авторы настоящего исследования принимали непосредственное участие в планировании, выполнении или анализе данного исследования. Все авторы настоящей статьи ознакомились и одобрили представленный окончательный вариант.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Введение. В последние годы геномные исследования приобрели важное значение в селекции крупного рогатого скота. Они позволяют выявлять ключевые гены, ассоциированные не только с хозяйственно-ценными признаками [3], но и с генетическими дефектами животных [1, 8].

Доступные в последние годы методы полного секвенирования генома и использования чипов высокой плотности позволили идентифицировать регионы, ассоциированные с фертильностью коров. Наличие мутаций в этих участках ДНК могут быть причиной гибели плода на различных стадиях стельности и в постнатальный период. Данные локусы получили название гаплотипов фертильности и регистрируются во многих породах молочного скота [8].

Гаплотип дефицит холестерина HCD (Haplotype Cholesterol Deficiency) – генетический дефект голштинского скота. В гомозиготном состоянии вызывает развитие у новорождённых телят ряда симптомов, несовместимых с жизнью: идиопатическая диарея, обезвоживание, кахексия и гипохолестеринемия. Впервые этот дефект был зарегистрирован в 2015 году в Германии. Анализ родословных определил основателя гаплотипа HCD - быка Maughlin Storm 1991 года рождения [11]. Методом полногеномного секвенирования определили, что причиной данной мутации является indel-полиморфизм размером 1233 bp в пятом экзоне гена *АРОВ* (аполипопротеина В). В результате мутации происходит нарушение синтеза белка АРОВ [7]. В организме млекопитающих различают несколько разновидностей аполипопротеинов, которые являются взаимозаменяемыми, кроме аполипопротеина В. Белок АРОВ входит в состав липопротеинов низкой плотности (ЛПНП) с момента их образования в печени или кишечнике и до момента поглощения клетками. ЛПНП, в свою очередь, являются основными переносчиками холестерина в крови млекопитающих [12].

Поэтому скрининг генетического дефекта HCD в отечественной популяции голштинского скота является важной частью профилактической ветеринарии.

Целью нашей работы было провести оценку встречаемости гаплотипа фертильности HCD в стадах голштинского скота Северо-Западного региона России.

Материалы и методы. Работа проводилась в период 2017-2019 гг. Всего исследовано 2010 голов коров и телок, принадлежащих десяти различным племенным хозяйствам, использующим голштинский или черно-пестрый скот с высокой долей кровности (95 % >) по голштинской породе. Территориально хозяйства расположены в Северо-Западном регионе РФ. Выборки животных являлись случайными.

Забор образцов венозной крови проводили из хвостовой вены в пробирки

КЗЭДТА. ДНК выделяли фенольным методом с использованием протеиназы К. Выявление гаплотипов НСД проводили с использованием метода полимеразной цепной реакции с аллельспецифическими праймерами (АС-ПЦР). Реакцию АС-ПЦР осуществляли на амплификаторе Thermal Cycler C1000 (Bio-Rad, США) в режиме: денатурация $\times 1$: 94 °С – 4 мин, $\times 35$: 94 °С – 1 мин, 62 °С – 30 сек, 72 °С – 1 мин, $\times 1$: 72 °С – 4 мин. Для определения indel-полиморфизма в гене *АРОВ* использовали следующие праймеры: F15'GGTGACCATCCTCTCTCTGC3'; F2 5'CACSTTCCGCTATTTCGAGAG3' и общий праймер - R5'AGTGGAACCCAGCTCCATTA3' [10]. При наличии инсерции в гене *АРОВ* амплифицируется фрагмент размером 436 п.н. Для дикого типа характерна амплификация фрагмента размером 249 п.н. Электрофорез проводили в 1,5 % агарозном геле с добавлением бромистого этидия и фотографировали при УФ-свете.

Цифровая обработка полученных данных проводилась в программе Microsoft Excel. Частота встречаемости (%) животных, носителей гаплотипа НСД, определялась как соотношение числа носителей к общему числу протестированных в хозяйстве животных, умноженное на 100.

Результаты и обсуждение. По данным гель-электрофореза оценивали генотип животных (рисунок 1). Так как гомозиготные носители гаплотипа НСД не встречаются среди половозрелых животных, оценивалась только встречаемость животных-гетерозиготных носителей мутантного аллеля гена *АРОВ*.

Рисунок 1 – Гель-электрофорез продуктов амплификации гена *АРОВ* на наличие indel-полиморфизма

Дорожки 1, 2, 5 – животные, свободные от НСД; дорожки 3,4 – животные - гетерозиготные носители НСД. М – маркер молекулярных весов (700, 500, 400, 300, 200, 150, 100)

Figure 1 – Gel electrophoresis of amplification products of the *APO* gene for the presence of indel polymorphism.

Lanes 1, 2, 5 — HCD-free animals; lanes 3,4 - animals - heterozygous carriers of HCD. M - molecular weight marker (700, 500, 400, 300, 200, 150, 100).

На рисунке 2 видно, что процент животных-гетерозиготных носителей НСД в анализируемых стадах варьировал в пределах 2,89-13,33 %, а средний процент по всей выборке составил 7,31 %. Для совершенствования стад в хозяйствах, как правило, используют быков с высокой племенной ценностью. Активно используемые быки зачастую являются носителями генетических аномалий, что способствует накоплению груза генетических дефектов в популяциях [5].

На сегодняшний день за рубежом тестирование быков голштинской породы на предмет носительства гаплотипа НСД является обязательным [9]. Данные зарубежных исследователей, изучавших распространение этого дефекта в популяциях голштинского скота, представлены в таблице, из которой видно, что в некоторых странах процент гаплотипа НСД может достигать до 17 %.

Рисунок 2 – Встречаемость гаплотипа фертильности HCD в стадах голштинского скота

Figure 2 – Frequency of HCD fertility haplotype in herds of Holstein cattle

Таблица – Встречаемость носителей HCD у голштинского скота в различных странах мира

Table – Frequency of HCD carriers in Holstein cattle around the world

Страна / The country	Телки/быки / Heifer / bull	n	% встречаемости HCD / % HCD frequency	Источник / Reference
Канада / Canada	Телки 2012 г.р	-	17	[15]
	Heifer 2012 year of birth	-		
	Телки 2016 г.р	-	12	
США / USA	Heifer 2012 year of birth			[17]
	Быки/телки / Heifer / bull	826948	6	
Германия / Germany	Быки / Bull	264	17,4	[12]
	Быки / Bull	46	6,7	[14]
Китай / China	Быки / Bull	138	5,07	[11]

К началу 2019 года генетический дефект HCD имел самый высокий процент встречаемости в голштинской породе в сравнении с другими гаплотипами фертильности. Его доля составила 14,3 %, а встречаемость других гаплотипов колебалась в пределах 0,00 – 5,8 % [16].

По данным российских исследователей, в 2016 году 10,3 % быков голштинской породы, используемых для разведения в России, были потомками быков-носителей HCD. Тестирование 41-го быка, отцы которых были носителями HCD, показало, что 16 животных (39 %) также несли в своем генотипе мутантный аллель [2]. Исследования 2018 года показали, что среди коров в одном из племенных хозяйств Ленинградской области встречаемость HCD, – составила 7,03 % [6], а среди молодых телок, в родословной которых имелись отцы или отцы матерей носители HCD – 26,7 % [4].

Так как в системе искусственного осеменения России высока доля спермы импортных быков, отечественные селекционеры при подборе родительских пар должны знать и учитывать статус быка по HCD. При этом возрастает роль геномного тестирования коров и телок, поскольку это единственный способ отделить животных-носителей HCD и свободных от данного генетического дефекта особей [16]. Предлагаемый комплексный подход к выявлению гаплотипа HCD у животных обоего пола позволит исключить вероятность появления гомозиготных потомков и избежать экономических потерь в животноводстве.

В связи с широким распространением гаплотипа дефицита холестерина у голштинского скота в разных регионах мира, необходимо уделять серьезное внимание мониторингу встречаемости этого дефекта в хозяйствах России. Высокий общий уровень гомозиготности отечественных популяций крупного рогатого скота голштинской породы может способствовать появлению потомков-носителей нежелательного дефекта HCD. Такой мониторинг поможет обеспечить генетическую безопасность племенного материала у крупного рогатого скота.

Выводы. Таким образом, наблюдаемая в ходе проведенного мониторинга встречаемость гаплотипа фертильности HCD в 10 хозяйствах Северо-Западного региона у коров и телок голштинской породы колебалась в пределах 2,89-13,33 %. Средний процент по всей выборке (n=2010) составил 7,31 %. Рекомендуется проводить регулярный анализ частоты встречаемости гаплотипа фертильности HCD не только у быков, но и у коров, что позволит избежать появления гомозиготных потомков и возможных экономических потерь.

Библиографический список

1. Встречаемость и значение мутации CVM у племенных животных Ленинградской области / Н. В. Дементьева, О. В. Митрофанова, В. И. Тыщенко, Е. В. Никиткина, В. П. Терлецкий, А. Ф. Яковлев // Молочное и мясное скотоводство. 2014. № 6. С. 7-9.
2. Дефицит холестерина – новый рецессивный дефект голштинского скота / Н. А. Зиновьева, О. В. Костюнина, В. В. Волкова, А. Н. Ермилов, И. Н. Янчуков // Молочное и мясное скотоводство. 2016. № 2. С. 5-8.
3. Ларкин Д. М., Юдин Н. С. Значимость геномных исследований для понимания истории формирования домашних животных // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. 2016. № 4. С. 123-128.
4. Лихачева Т. Е., Позовникова М. В. Влияние гаплотипа "дефицит холестерина"(HCD) на интенсивность прироста живой массы тёлоч голштинской породы // Известия ОГАУ. 2019. №1 (75). С. 166-168.
5. Моногенные наследственные дефекты и их роль в воспроизводстве / Н. А. Зиновьева, Н. И. Стрекозов, Г. В. Ескин, И. С. Турбина, И. Н. Янчуков, А. Н. Ермилов // Животноводство России. 2015. № 6. С. 30.
6. Мутация HCD у российских голштинизированных черно-пестрых коров не влияет на молочную продуктивность и содержание холестерина и триглицеридов в крови / М. В. Позовникова, Т. Е. Лихачева, А. А. Кудинов, В. Б. Лейбова, Н. В. Дементьева // Сельскохозяйственная биология. 2018. Т. 53. № 6. С. 1142-1151.
7. A transposable element insertion in APOB causes cholesterol deficiency in Holstein cattle / F. Menzi, N. Besuchet-Schmutz [et al.] // Animal genetics. 2016. Vol. 47. No 2. P. 253-257.
8. Cole J. B., Null D. J., Van Raden P. M. Phenotypic and genetic effects of recessive haplotypes on yield, longevity, and fertility // Journal of dairy science. 2016. Vol. 99. №. 9. P. 7274-7288.
9. <https://www.cdn.ca/home.php>
10. Kamiński S., Ruś A. Cholesterol Deficiency–new genetic defect transmitted to Polish Holstein-Friesian cattle // Polish journal of veterinary sciences. 2016. Vol. 19. No. 4. P. 885-887.
11. New Holstein Haplotype Affecting Calf Survival / S. Kipp, D. Segelke [et al.] // Interbull Bulletin. 2015. No 49. P. 49-53.
12. Olofsson S. O., Borén J. Apolipoprotein B secretory regulation by degradation // Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology. 2012. Vol. 32. No 6. P. 1334-1338.
13. The cholesterol-deficiency associated mutation in APOB segregates at low frequency in Chinese Holstein cattle / Y. Li, L. Fang, L. Liu, S. Zhang, Z. Ma, D. Sun // Canadian Journal of Animal Science. 2018. Vol. 99. No 2. P. 332-335.
14. The Holstein Friesian lethal haplotype 5 (HH5) results from a complete deletion of TBF1M and cholesterol deficiency (CDH) from an ERV-(LTR) insertion into the coding region of APOB / E. Schütz, C. Wehrhahn, M. Wanjek [et al.] // PloS one. 2016. Vol. 11. No 4. P. 1-15.

15. Van Doormaal B., Beavers L. HCD: Haplotype associated with Cholesterol Deficiency // Canadian Dairy Network (CDN). 2015. URL: <https://www.cdn.ca/images/uploaded/file/HCD%20Update%20Article%20-%20December%202015.pdf> (дата обращения 28.01.2020).

16. Van Doormaal B., Beavers L. Current Status on Haplotypes and Genetic Recessives. 2019. Режим доступа: <https://www.cdn.ca/images/uploaded/file/Haplotypes%20%26%20Recessives%20Update%20Article%20-%20March%202019.pdf>. Дата обращения: 26.01.2019.

17. Van Raden P., Null D. Holstein Haplotype for Cholesterol Deficiency, HCD // USD-AAGIL. 2015. URL: [https://www.cdcb.us/reference/changes/HCD inh eritan se.p df](https://www.cdcb.us/reference/changes/HCD%20inh%20eritan%20se.p%20df) (дата обращения 28.01.2020.).

Conclusion Thus, the occurrence of the HCD fertility haplotype observed in the course of the monitoring in 10 farms of the Northwest region in cows and heifers of Holstein breed ranged from 2.89 to 13.33%. The average percentage for the entire sample (n = 2010) was 7.31%. It is recommended to conduct a regular analysis of the frequency of occurrence of the HCD fertility haplotype not only in bulls, but also in cows, which will avoid the appearance of homozygous progeny and possible economic losses.

Authors Information

Pozovnikova Marina Vladimirovna - Ph.D. in Biology, senior researcher at the molecular genetics laboratory. E-mail: pozovnikova@gmail.com. Tel.: 8-960-231-03-21. 196601, Russia, St. Petersburg, Tyarlyovo settlement, Moscow highway, 55a; Corresponding author.

Olga Viktorovna Mitrofanova - Ph.D. in Biology. E-mail: mo1969@mail.ru Phone: 8-953-348-33-21. 196601, Russia, St. Petersburg, Tyarlyovo settlement, Moscow highway, 55a;

Natalya Viktorovna Dementieva - Ph.D. in Biology, leading researcher at the Laboratory of Molecular Genetics. E-mail: dementevan@mail.ru. Tel.: 8-921-743-0743. 196601, Russia, St. Petersburg, Tyarlyovo settlement, Moscow highway, 55a;

Информация об авторах

Позовникова Марина Владимировна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории молекулярной генетики. E-mail: pozovnikova@gmail.com. Тел.: 8-960-231-03-21. 196601, Россия, г. Санкт-Петербург, п. Тярлево, Московское ш., 55а; Автор, ответственный за переписку.

Митрофанова Ольга Викторовна - кандидат биологических наук. E-mail: mo1969@mail.ru Тел.: 8-953-348-33-21. 196601, Россия, г. Санкт-Петербург, п. Тярлево, Московское ш., 55а;

Дементьева Наталья Викторовна - кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярной генетики. E-mail: dementevan@mail.ru. Тел.: 8-921-743-0743. 196601, Россия, г. Санкт-Петербург, п. Тярлево, Московское ш., 55а.