

**Генетика и селекция**

УДК 636.22/.28:575.174.015.3

doi: 10.15389/agrobiology.2018.6.1142rus

**МУТАЦИЯ HCD У РОССИЙСКИХ ГОЛШТИНИЗИРОВАННЫХ ЧЕРНО-ПЕСТРЫХ КОРОВ НЕ ВЛИЯЕТ НА МОЛОЧНУЮ ПРОДУКТИВНОСТЬ И СОДЕРЖАНИЕ ХОЛЕСТЕРИНА И ТРИГЛИЦЕРИДОВ В КРОВИ\*****М.В. ПОЗОВНИКОВА<sup>1</sup>, Т.Е. ЛИХАЧЕВА<sup>2</sup>, А.А. КУДИНОВ<sup>1</sup>, В.Б. ЛЕЙБОВА<sup>1</sup>,  
Н.В. ДЕМЕНТЬЕВА<sup>1</sup>**

Распространение летальных и полuletальных генетических мутаций в популяциях крупного рогатого скота становится причиной эмбриональной и постэмбриональной смертности телят. Использование ограниченного числа быков-производителей создает опасность широкого распространения генетических аномалий. Рецессивный дефект голштинского скота — дефицит холестерина HCD (haplotype cholesterol deficiency) характеризуется гибелью телят в первые дни или месяцы жизни. Степень распространения этого дефекта в настоящее время очень высока (в разных странах от 6 до 17 %). Следует отметить, что в целом сведений о связи рецессивных мутаций с продуктивностью молочного скота немного, а данные о влиянии мутации HCD, впервые описанный в 2015 году, на селекционно значимые признаки крайне ограничены. Мы впервые провели генетическую оценку района гена *APOB* на хромосоме ВТА11 в российской популяции коров и определили показатели молочной продуктивности в зависимости от статуса по HCD. Полученные результаты свидетельствуют, что в изученной нами популяции мутация HCD не снижает племенную ценность животных по молочной продуктивности и качеству молока (по жиру и белку). Исследование проводили в одном из племенных хозяйств Ленинградской области в 2017 году. Для этого случайным образом сформировали выборку коров голштинизированной чернопестрой породы ( $n = 451$ , год рождения с 2009 по 2015). Выборка телят ( $n = 7$ ) включала особей с клиническими признаками диареи, имеющих в родословной (отцы, отцы отцов) подтвержденных носителей HCD. Животных генотипировали методом ПЦР с аллель-специфичными праймерами. Сравнивали продуктивность по 1-й и 2-й лактации (удой, выход молочного жира и белка) в зависимости от генотипов по HCD. Дисперсионный анализ ANOVA и подсчет средних выполняли в программе RStudio на основании модели с одним фиксированным эффектом. Показатель РПЦ (расчетная племенная ценность) по признакам удой, жир и белок определяли методом BLUP Animal Model. Концентрацию триглицеридов и холестерина в сыворотке крови, взятой от животных — носителей HCD ( $n = 3$ ) и интактных коров ( $n = 14$ ), определяли на автоматическом биохимическом анализаторе RX Daytona («Randox Laboratories», Великобритания). По результатам исследования, 7,76 % (35 гол.) протестированных коров были носителями мутантного аллеля HCD гена *APOB*. Среди теллят один был определен как носитель и одна телочка имела все признаки заболевания при гомозиготном состоянии по HCD гена *APOB*. Коровы — носители HCD не уступали своим сверстницам по молочной продуктивности. Скрытые носители мутантного аллеля гена *APOB* 2013 года рождения достоверно превосходили здоровых животных: в 1-ю лактацию по удою на 1219 кг ( $p < 0,01$ ), по выходу молочного жира — на 13,8 кг, по выходу молочного белка — на 19,9 кг ( $p < 0,05$ ); во 2-ю лактацию — соответственно на 1392 кг ( $p < 0,001$ ), 44 кг ( $p < 0,05$ ) и 39,8 кг ( $p < 0,01$ ). Средняя РПЦ носителей HCD была выше на 6,8 % по удою, на 8,1 % — по жиру и на 4,8 % — по белку, чем у животных без этого генетического дефекта. Мониторинг потомков быков — носителей HCD с использованием чипа BovineSNP50 BeadChip v. 3 («Illumina, Inc.», США) не выявил в районе гена *APOB* значимых гаплоглобов в изученной популяции, следовательно, селекция на повышение продуктивности не приведет к значительному росту частоты носительства HCD. Сравнение биохимических показателей в первой половине сухостойного периода не выявило достоверных различий между группами коров — скрытых носителей HCD и остальных животных по содержанию в крови холестерина (соответственно  $3,04 \pm 0,31$  и  $3,33 \pm 0,12$  ммоль/л) и триглицеридов ( $0,197 \pm 0,01$  и  $0,170 \pm 0,01$  ммоль/л). Таким образом, присутствие носителей мутации HCD не снижает продуктивность в стаде. Однако мониторинг популяций на носительство этого генетического дефекта необходим, поскольку неправильный подбор животных может приводить к рождению больного и нежизнеспособного потомства и, как следствие, — к экономическим потерям.

**Ключевые слова:** крупный рогатый скот, генотипирование, HCD, haplotype cholesterol deficiency, гаплотип дефицита холестерина, летальная рецессивная мутация, аполипопротеин В, ген *APOB*, молочная продуктивность, триглицериды, холестерин.

\* Работа выполнена при финансовой поддержке ФАНО России (тема ГЗ № 0600-2018-0014).

Искусственное осеменение и использование ограниченного числа производителей создает опасность распространения летальных рецессивных мутаций среди крупного рогатого скота (1). Далеко не все аномалии поддаются визуальному наблюдению. ДНК-скрининг с использованием SNP-чипов высокой плотности позволяет выявлять мутации без наличия сведений о фенотипических проявлениях заболеваний (2). Этим методом определяют гаплотипы фертильности, встречающиеся у крупного рогатого скота и становящиеся причиной смертности на разных этапах развития животного. Скрининг отечественного голштинского и черно-пестрого голштинизированного скота показал, что частота встречаемости известных мутаций CVM, BLAD, DUMPS, BY, HCD, HH1, HH3, HH4, HH5 достигает 10 % у коров и 4 % у быков-производителей (3). Регулярный мониторинг распространения вредных рецессивных мутаций среди поголовья необходим и позволяет вовремя исключить из разведения их носителей, значительно сокращая экономические потери хозяйств. Так, в Ленинградской области регулярная проверка голштинских быков и своевременная выбраковка носителей BLAD и CVM позволила снизить частоту встречаемости этих мутаций в отдельных хозяйствах до 1-2 % (4-6).

Гаплотип дефицита холестерина (HCD, haplotype cholesterol deficiency) — новый рецессивный генетический дефект голштинского скота. Об идентификации этого гаплотипа, ассоциированного с гибелью телят в ранний постнатальный период вследствие возникновения идиопатической диареи, не поддающейся терапии, впервые сообщили S. Kirp с соавторами в 2015 году на конференции Interbull в Орlando (США). Гомозиготные животные имели выраженное нарушение жирового обмена и гипохолестеринемию. У гетерозиготных телят при отсутствии клинических признаков отмечали низкие показатели холестерина в крови. В результате поиска геномных ассоциаций с помощью сканирования 44747SNP (чип Illumina BovineSNP50 BeadChip, версия 2; 54Kv2; «Illumina, Inc.», США) у пораженных телят обнаружили гомозиготный район размером 1,01 Mb на BTA11 (с позиции 77274120 до 78290130 bp), что указывает на аутосомное моногенное наследование этого расстройства, действующего по рецессивному или кодоминантному типу. Значимый SNP расположен в позиции 72248536 bp на расстоянии около 5 Mb от дефектного гаплотипа (7). Поиск геномных мутаций с помощью изучения полногеномных ассоциаций GWAS (genome-wide association studies) позволил выявить в общей сложности 22 SNPs (с 64367438 до 83585365 bp), которые достигли порога достоверности около дефектного гаплотипа. Изучение генома на основе генотипов 54K SNP Chip определило казуальный участок на хромосоме BTA11. Анализ родословных больных животных выявил выдающегося канадского голштинского быка Maughlin Storm как носителя такого расстройства (8, 9). Дальнейшие исследования показали, что причиной этой мутации служит вставка длиной 1299 bp в 5-м экзоне гена *АРОВ* (аполипопротеин В) на BTA11, приводящая к сдвигу рамки считывания в области кодона для 135-го аминокислотного остатка в белке АРОВ. В результате происходит усечение 97 % соответствующего белка (10).

Другие авторы обнаружили на BTA11 вставку усеченного эндогенного ретровируса типа ERV2-1 в LTR (Long Terminal Repeats) в 5-м экзоне гена *АРОВ*, что привело к образованию стоп-кодона недалеко от инсерции. Генерация преждевременного стоп-кодона в открытой рамке считывания гена *АРОВ* вызывает усечение длины белка до 140 аминокислот. Установлено, что такие ранние укорочения вызывают неспособность выведения хиломикрон из клеток кишечника, что приводит к мальабсорб-

ции холестерина (11). Белок аполипопротеин В (АПОВ) необходим для синтеза хиломикронов и липопротеинов очень низкой плотности в кишечнике и печени. Аполипопротеины представляют собой белковые, обычно амфифильные, компоненты липопротеинов, специфически связывающиеся с соответствующими липидами при формировании липопротеиновой частицы (12, 13).

Анализ данных о частоте встречаемости НСД в стадах голштинского скота в разных странах выявляет высокий процент носительства: в Китае (быки,  $n = 138$ ) — 5,07 % (14), в Германии (быки,  $n = 264$ ) — 17,4 % (10), в Канаде (телки 2012 и 2016 года рождения) — соответственно 17 и 12 % (15). По результатам анализа родословных 584 быков-производителей, используемых для разведения в России, у 10,3 % (60 быков) отцы оказались скрытыми носителями мутантного аллеля гена *АПОВ* (16). При этом происхождение отцов различалось (Канада, Америка, Австрия). По результатам генотипирования 41 быка, отцы которых были носителями НСД, 17 животных (39 %) оказались скрытыми носителями этой мутации. Своевременный скрининг популяций на наличие генетических дефектов крупного рогатого скота и правильный подбор животных снизят экономические затраты хозяйств. По данным J.V. Cole с соавт. (17), в США экономические потери от эмбриональной и постэмбриональной смертности вследствие летальных мутаций составляют порядка 11 млн долларов в год.

Мы впервые провели генетическую оценку района гена *АПОВ* и сравнили молочную продуктивность коров в одной из российских популяций в зависимости от статуса по НСД. Полученные результаты показали, что мутация НСД не снижает племенную ценность животных по удою и качеству молока по жиру и белку.

Наша цель заключалась в оценке распространенности мутации НСД в выборке российских голштинизированных черно-пестрых коров и их сравнении по признакам молочной продуктивности и показателям липидного обмена.

*Методика.* Анализируемая выборка ( $n = 451$ ) голштинизированных черно-пестрых коров (*Bos taurus taurus*) одного из племенных хозяйств Ленинградской области (2017 год) была случайной, в нее вошли животные с 2009 по 2015 год рождения. Выборка телят ( $n = 7$ ) включала особей с клиническими признаками диареи, имеющих в родословной (отцы, отцы отцов) подтвержденных носителей НСД.

ДНК выделяли фенольным методом (18) из крови, полученной из хвостовой вены.

Для генотипирования методом ПЦР использовали праймеры: прямой общий — 5'-GGTGACCATCCTCTCTGTC-3'; обратный для определения дикого аллеля — 5'-AGTGGAACCCAGCTCCATTA-3' (обеспечивает амплификацию фрагмента размером 249 bp); прямой для определения мутантного аллеля гена *АПОВ* (indel-полиморфизм) — 5'-CACCTTCCGCTATTCGAGAG-3' (обеспечивает амплификацию фрагмента размером 436 bp) (19). ПЦР проводили по следующей схеме: 1 мин при 95 °С (первоначальная денатурация); 30 с при 94 °С, 30 с при 60 °С, 30 с при 72 °С (35 циклов); 10 мин при 72 °С (амплификатор Thermal Cycler T1000, «Bio-Rad Laboratories, Inc.», США). В состав реакционной смеси входили 67 мМ Трис-НСl (рН 8,6), 1,5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 16,6 мМ NH<sub>4</sub>OH, 0,125 мМ каждого из дезоксирибонуклеозидтрифосфатов (dATP, dGTP, dCTP, dTTP), 0,5 мкМ каждого праймера, 50-100 нг геномной ДНК и 2,5 ед. Taq ДНК-полимеразы (ООО «Сибэнзим», Россия). Полученные фрагменты ДНК разделяли методом горизонтального электрофореза при 10 В/см в 1× TBE бу-

фере с бромистым этидием (0,1 мкг/мл) в 2,0 % агарозном геле Agarosa LE 2 («Helicon», Россия). Размеры ампликонов определяли относительно маркера молекулярных масс ThermoScientific Gene Ruler Ultra Low Range DNA Ladder («Fermentas», Литва). Документирование и обработку результатов осуществляли с помощью видеосистемы Gel Imager 2 («Helicon», Россия).

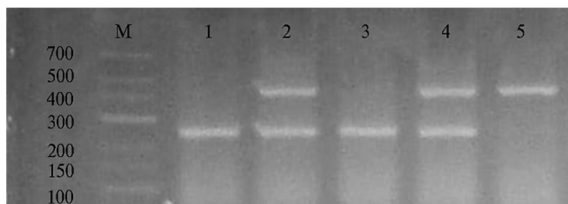
Неравновесие по сцеплению (LD) анализировали на выборке дочерей быков-носителей HCD (Ленинградская обл.). Генотипирование с помощью чипа BovineSNP50 BeadChip v. 3 («Illumina, Inc.», США) проводили согласно рекомендациям производителя. Исследования генотипов ограничили районом гена *APOB* на хромосоме ВТА11, включающим 33 SNPs, длиной около 2000 kbp. Расчеты LD ( $R^2$ ) проводили в программе PLINK 1.9 (20).

Содержание холестерина и триглицеридов в крови определяли у животных-носителей ( $HCD^+$ ,  $n = 3$ ) и условно здоровых животных 2-4-й лактации ( $HCD^-$ ,  $n = 14$ ), находящихся в первой половине сухостойного периода. Кровь для биохимических исследований отбирали из хвостовой вены с помощью вакуумной системы Vacuette («Greiner Bio-One», Австрия) через 2 ч после раздачи корма (с 10.00 до 11.00). Через 30-40 мин пробирки с кровью центрифугировали 20 мин при 3000 об/мин. Концентрацию триглицеридов и холестерина измеряли на автоматическом биохимическом анализаторе RX Daytona («Randox Laboratories», Великобритания) с использованием реагентов фирмы «Cormay» (Польша).

Данные по молочной продуктивности коров 2012-2014 годов рождения были взяты из племенных карточек (форма 2МОЛ). Учитывали удой по 1-й и 2-й лактации, выход молочного жира и выход молочного белка.

Связь между генотипами коров и анализируемыми признаками выявляли на основе оценки достоверности различий между средними значениями. Найденную величину  $t_d$  сравнивали с таблицей Стьюдента (21). Дисперсионный анализ ANOVA и подсчет средних проводили в программе RStudio (22) на основании модели с одним фиксированным эффектом, имеющей вид:  $y_{ij} = \mu + HCD_j + e_{ij}$ , где  $y_{ij}$  — расчетная племенная ценность (РПЦ) коровы  $i$  по признакам продуктивности,  $\mu$  — среднее,  $HCD_j$  — фиксированный эффект гаплотипа,  $e_{ij}$  — остаточное неизвестное. Статистическую обработку данных выполняли в программах Microsoft Excel и AtteStat ([http://www.studmed.ru/programma-attestat-1205\\_1778bebd8f9.html](http://www.studmed.ru/programma-attestat-1205_1778bebd8f9.html)). Представлены средние значения ( $M$ ) и стандартные ошибки средних ( $\pm SEM$ ).

Расчетную племенную ценность (РПЦ) по признакам удой, жир и белок вычисляли методом BLUP Animal Model по данным фенотипического учета 2016 года (23). Эффект гаплотипа представляли в виде кодировки 0 ( $HCD^-$ ) и 1 (носитель  $HCD^+$ ).



**Рис. 1.** Электрофореграмма продуктов ПЦР-амплификации на наличие indel полиморфизма в гене *APOB* у голштигнизированных черно-пестрых коров: М — маркер молекулярных масс; 1, 3 — здоровые животные (присутствует фрагмент длиной 249 bp), 2, 4 — гетерозиготные носители (фрагменты 249 и 436 bp), 5 — гомозигота (фрагмент 436 bp) (Ленинградская обл., 2017 год).

**Результаты.** На рисунке 1 представлена типичная электрофореграмма продуктов ПЦР-амплификации на наличие indel полиморфизма в гене *APOB*.

Всего мы протестировали 55,7 % маточного поголовья коров с подозрением на носительство мутантного аллеля HCD гена *APOB*. По результатам исследования 35 коров (7,76 %) и одна телочка ока-



Рис. 2. Телка голштинизированной черно-пестрой породы, гомозиготная по мутантному аллелю гена *APOB*, с типичными клиническими проявлениями синдрома дефицита холестерина (отставание в росте и развитии, истощение, диарея) (Ленинградская обл., 2017 год).

предков матери был бык Maughlin Storm 5457798 среди предков отца — Breadale Goldwyn 10705608. Эти быки и их потомки используются в системе искусственного осеменения в России уже несколько лет и отмечены как скрытые носители HCD.

**1. Показатели молочной продуктивности у коров голштинизированной черно-пестрой породы по вариантам генотипов с *indel* полиморфизмом в гене *APOB* (мутация дефицита холестерина HCD) ( $M \pm SEM$ , Ленинградская обл., 2017 год)**

Год рождения	Статус по HCD	Число животных, гол.	Удой, кг	Жир, кг	Белок, кг
1-я лактация					
2012	HCD <sup>+</sup>	3	8750±440	342,6±28,6	281,7±20,4
	HCD <sup>-</sup>	22	8894±256	333,7±10,1	280,8±7,8
2013	HCD <sup>+</sup>	8	9471±261 <sup>a</sup>	353,8±7,8	292,0±8,5 <sup>c</sup>
	HCD <sup>-</sup>	73	8252±142 <sup>b</sup>	340,0±5,9	272,1±4,5 <sup>d</sup>
2014	HCD <sup>+</sup>	10	8780±378	346,5±10,0	268,9±9,1
	HCD <sup>-</sup>	101	8646±126	347,0±5,4	271,0±4,1
2-я лактация					
2012	HCD <sup>+</sup>	3	10339±787	390,6±76,9	330,8±43,8
	HCD <sup>-</sup>	22	9596±385	371,9±16,4	300,1±11,3
2013	HCD <sup>+</sup>	6	10872±346 <sup>e</sup>	428,7±20,1 <sup>g</sup>	339,7±12,2 <sup>i</sup>
	HCD <sup>-</sup>	49	9480±233 <sup>f</sup>	384,7±9,0 <sup>h</sup>	299,9±6,9 <sup>j</sup>

Примечание. Буквами отмечены статистически значимые различия между группами HCD<sup>+</sup> и HCD<sup>-</sup>: a, b — при  $p < 0,01$ ; c, d — при  $p < 0,05$ ; e, f — при  $p < 0,001$ ; g, h — при  $p < 0,05$ ; i, j — при  $p < 0,01$ .

**2. Дисперсионный анализ расчетной племенной ценности голштинизированных черно-пестрых коров, гетерозиготных по мутации дефицита холестерина HCD (Ленинградская обл., 2017 год)**

Признак продуктивности	Эффект HCD	p-value
Удой	4,076	0,0442
Жир	6,617	0,0105
Белок	1,905	0,1680

Коровы HCD<sup>+</sup> не уступали сверстницам, а иногда даже превосходили их по показателям молочной продуктивности (табл. 1). Так, скрытые носители мутантного аллеля гена *APOB* 2013 года рождения достоверно превосходили здоровых животных: в 1-ю лактацию по удою на 1219 кг ( $p < 0,01$ ), по выходу молочного жира — на 13,8 кг, по выходу молочного белка — на 19,9 кг ( $p < 0,05$ ); во 2-ю лактацию — соответственно на 1392 кг ( $p < 0,001$ ), 44 кг ( $p < 0,05$ ) и 39,8 кг ( $p < 0,01$ ). Между группами коров 2012 и 2014 года рождения не было выявлено достоверных различий.

Средняя РПЦ по признакам удой, жир и белок для носителей

HCD составила соответственно 1100,8; 42,5 и 28,3 кг, а для животных HCD<sup>-</sup> — 1030,5; 39,3 и 27,1 кг. То есть у первых она была выше по удою на 6,8 %, по жиру — на 8,1 %, по белку — на 4,8 %. Дисперсионный анализ (табл. 2) показал стойкий положительный эффект влияния носительства по HCD на продуктивность.



Рис. 3. Частота носительства мутации дефицита холестерина HCD среди голштинизированных черно-пестрых коров разных лет рождения (Ленинградская обл., 2017 год).

Коров HCD<sup>-</sup> по содержанию в сыворотке крови холестерина (соответственно  $3,04 \pm 0,31$  и  $3,33 \pm 0,12$  ммоль/л) и триглицеридов (соответственно  $0,197 \pm 0,01$  и  $0,170 \pm 0,01$  ммоль/л). Для обеих групп концентрация этих метаболитов была в пределах референсных значений, которые составляют 1,5–4,5 ммоль/л для холестерина и 0,05–0,3 ммоль/л для триглицеридов (24). Молочная продуктивность за 305 сут последней завершённой лактации по группам не различалась и составляла  $10302 \pm 791$  и  $10191 \pm 453$  кг.

Для более полной оценки влияния отбора по молочной продуктивности на распространение носителей гаплотипа холестеринного дефицита HCD мы проанализировали неравновесие по сцеплению (LD) между SNP в районе гена *APOB* на расстоянии около 1000 bp от гена в обе стороны. Среднее расстояние между SNPs на чипе в изучаемой области составило около 55 kbp. Расчеты показали отсутствие гапблоков на этом участке нуклеотидной последовательности в геноме у потомков быков — носителей HCD в популяции голштинского скота в Ленинградской области. Средний показатель LD был низким ( $R^2 = 0,077 \pm 0,008$ ).

Отметим, что, согласно родословным, в хозяйстве, где проводились исследования, для разведения использовались голштинские быки разного происхождения (Нидерланды, США, Канада, Россия). Некоторые из них имели подтвержденный статус скрытых носителей HCD. В литературе содержится недостаточно информации о связи рецессивных мутаций с продуктивностью молочного скота. Однако, как показывает практика, быки — носители рецессивных мутаций зачастую служат улучшателями, а широкому распространению генетических дефектов способствует то, что они, как правило, сцеплены с генами хозяйственно полезных признаков (25). Так, анализ родословных сыновей и внуков Skokie Sensation Ned, родоначальника расстройств DUMPS, показал, что гетерозиготы имеют значительно более высокий генетический потенциал молочной продуктивности (26). S. Saleem с соавт. (27) отмечают, что качественные показатели спермы голштинских быков не изменяются в зависимости от статуса по HCD. В предыдущих исследованиях мы выяснили, что статус по HCD не оказывает существенного влияния на такие репродуктивные показатели коров, как возраст первого осеменения, первого отела, число осеменений до плодотворного, длительность сервис-периода и межотельного периода (28).

Среди протестированных животных разных лет рождения частота HCD составляла около 10 % (рис. 3) при тенденции к повышению в потомстве, рожденном в 2015 году, что указывает на необходимость постоянно контролировать поголовье в племенных хозяйствах для сокращения числа носителей мутации HCD.

Мы не выявили достоверных различий между группами носителей HCD<sup>+</sup> и ко-

В ряде работ (29, 30) установлено, что быки и телята — скрытые носители мутации HCD имеют более низкое содержание триглицеридов и холестерина в крови по сравнению с животными, у которых отсутствует мутантный аллель гена *APOB*. Однако на содержание холестерина в крови (как и на концентрацию триглицеридов) влияют такие факторы, как питание, физиологическое состояние животного и заболевания различной этиологии. Поэтому диагноз на наличие дефекта HCD можно поставить только с помощью молекулярно-генетического тестирования. В своем исследовании мы не выявили достоверных отклонений от нормы в биохимических показателях сыворотки крови у носителей этого генетического дефекта, что может быть связано как с малой выборкой, так и с наличием у некоторых животных генетически детерминированных компенсаторных механизмов (11, 31).

Отслеживание селекционно-генетических характеристик в породе и определение генеалогической принадлежности быка необходимы для контроля генетических дефектов (32, 33).

Интересно отметить, что носители мутации HCD не снижают продуктивность в стаде. Более того, в изученной популяции средняя расчетная племенная ценность по признакам удой, жир и белок у носителей HCD оказалась выше, чем у интактных животных. Дисперсионный анализ выявил стойкий положительный эффект влияния носительства HCD на продуктивность. Такое превосходство не имеет четкого объяснения, но может быть обусловлено нахождением гена *APOB* в участке генома, отвечающем за высокую молочную продуктивность. В то же время анализ неравновесия по сцеплению между SNP в этом районе показал отсутствие гапблоков в популяции голштинского скота из Ленинградской области. Следовательно, селекция на повышение продуктивности не приведет к значительному росту частоты носителей мутации HCD.

Таким образом, мы не выявили различий по концентрации холестерина и триглицеридов в сыворотке крови в первую фазу сухостойного периода в изученной популяции коров голштинизированной черно-пестрой породы в зависимости от статуса по рецессивной мутации HCD (гаплотип дефицита холестерина). Использование коров — носителей мутации HCD не снижает продуктивность в стаде. Тем не менее мониторинг популяций на носительство указанного генетического дефекта необходим, поскольку использование гетерозиготных быков может приводить к рождению больного и нежизнеспособного потомства и, как следствие, — к экономическим потерям в хозяйствах.

## ЛИТЕРАТУРА

1. *Атлас генетических болезней и признаков продуктивности крупного рогатого скота* /Под ред. А.А. Кудинова, К.В. Племяшова, П.И. Уколова, Г.В. Ширяева. СПб, 2017.
2. Charlier C., Coppeters W., Rollin F., Desmecht D., Agerholm J., Carta E., Dardano S., Dive M., Fasquelle C., Frennet J.-C., Hanset R., Hubin X., Jorgensen C., Karim L., Kent M., Harvey K., Pearce B.R., Simon P., Tama N., Nie H., Vandeputte S., Lien S., Longeri M., Fredholm M., Harvey R.J., Georges M. Highly effective SNP-based association mapping and management of recessive defects in livestock. *Nat. Genet.*, 2008, 40(4): 449 (doi: 10.1038/ng.96).
3. Зиновьева Н.А. Гаплотипы фертильности голштинского скота. *Сельскохозяйственная биология*, 2016, 51(4): 423-435 (doi: 10.15389/agrobiology.2016.4.423rus).
4. Дементьева Н.В., Митрофанова О.В., Кудинов А.А. Анализ частоты встречаемости трех рецессивных летальных мутаций у коров. *Известия Санкт-Петербургского государственного аграрного университета*, 2015, 39: 136-143.
5. Дементьева Н.В., Митрофанова О.В., Тыщенко В.И., Никиткина Е.В., Терлецкий В.П., Яковлев А.Ф. Встречаемость и значение мутации SVM у племенных животных Ленинградской области. *Молочное и мясное скотоводство*, 2014, 6: 7-9.

6. Яковлев А.Ф., Терлецкий В.П., Митрофанова О.В., Дементьева Н.В. Определение носителей генетических дефектов среди быков-производителей. *Молочное и мясное скотоводство*, 2004, 6: 31-32.
7. Kipp S., Segelke D., Schierenbeck S., Reinhardt F., Reents R., Wumser C., Pausch H., Fries R., Thaller G., Tetens J., Pott J., Haas D., Raddatz B.B., Hewicker-Trautwein M., Proios I., Schmicke M., Grünberg W. Identification of a haplotype associated with cholesterol deficiency and increased juvenile mortality in Holstein cattle. *J. Dairy Sci.*, 2016, 99(11): 8915-8931 (doi: 10.3168/jds.2016-11118)
8. Jung S., Pausch H., Langenmayer M.C., Schwarzenbacher H., Majzoub-Altweck M., Golnick N.S., Fries R. A nonsense mutation in PLD4 is associated with a zinc deficiency-like syndrome in Fleckvieh cattle. *BMC Genomics*, 2014, 15: 623 (doi: 10.1186/1471-2164-15-623).
9. Kipp S., Segelke D., Schierenbeck S., Reinhardt F., Reents R., Wumser C., Pausch H., Fries R., Thaller G., Tetens J., Pott J., Piechotta M., Grünberg W. A new Holstein haplotype affecting calf survival. *Interbull Bulletin*, 2015, 49: 49-53.
10. Menzi F., Besuchet-Schmutz N., Fragnière M., Hofstetter S., Jagannathan V., Mock T., Raemy A., Studer E., Mehinagic K., Regenscheid N., Meylan M., Schmitz-Hsu F., Drögemüller C. A transposable element insertion in *APOB* causes cholesterol deficiency in Holstein cattle. *Anim. Genet.*, 2016, 47(2): 253-257 (doi: 10.1111/age.12410).
11. Schütz E., Wehrhahn C., Wanjek M., Bortfeld R., Wemheuer W.E., Beck J., Brenig B. 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*. *PLoS ONE*, 2016, 11(4): e0154602 (doi: 10.1371/journal.pone.0157618).
12. Hebbachi A.M., Gibbons G.F. Microsomal membrane-associated apoB is the direct precursor of secreted VLDL in primary cultures of rat hepatocytes. *J. Lipid Res.*, 2001, 42(10): 1609-1617.
13. Марри Р., Греннер Д., Мейес П., Родуэлл В. *Биохимия человека*. М., 1993.
14. Li Y., Fang L., Liu L., Zhang S., Ma Z., Sun D. The cholesterol deficiency-associated mutation in *APOB* segregates at low frequency in Chinese Holstein cattle. *Canadian Journal of Animal Science* (в печати, published on the web 16 October 2018) (doi: 10.1139/CJAS-2017-0108).
15. Van Doormaal B., Beavers L. HCD: haplotype associated with cholesterol deficiency. *Canadian Dairy Network (CDN)*, 2015. Режим доступа: <https://www.cdn.ca/images/uploaded/file/HCD%20Update%20Article%20-%20December%202015.pdf>. Дата обращения: 31.01.2018.
16. Зиновьева Н.А., Костюнина О.В., Волкова В.В., Ермилов А.Н., Янчуков И.Н. Дефицит холестерина — новый рецессивный дефект голштинского скота. *Молочное и мясное скотоводство*, 2016, 2: 5-8.
17. Cole J.B., Null D.J., VanRaden P.M. Phenotypic and genetic effects of recessive haplotypes on yield, longevity and fertility. *J. Dairy Sci.*, 2016, 99: 7274-7288 (doi: 10.3168/jds.2015-10777).
18. Терлецкий В.П., Племяшов К.В., Тыщенко В.И., Дементьева Н.В. *Использование современных молекулярно-генетических методов в генотипировании сельскохозяйственных животных*. СПб—Пушкин, 2014.
19. Kamiński S., Ruś A. Cholesterol deficiency — new genetic defect transmitted to Polish Holstein-Friesian cattle. *Pol. J. Vet. Sci.*, 2016, 19(4): 885-887 (doi: 10.1515/pjvs-2016-0110).
20. Chang C.C., Chow C.C., Thellier L.C., Vattikuti S.S., Purcell S.M., Lee J.J. Second-generation PLINK: rising to the challenge of larger and richer datasets. *GigaScience*, 2015, 4: 7 (doi: 10.1186/s13742-015-0047-8).
21. Меркурьева Е.К. *Биометрия в животноводстве*. М., 1977.
22. RStudio Team. RStudio: integrated development for R. RStudio, Inc., Boston MA, 2015. Режим доступа: <http://www.rstudio.com>. Без даты.
23. Kudinov A.A., Juga J., Uimari P., Mantysaari E.A., Strandén I., Plemyashov K.V., Saksa E.I., Smaragdov M.G. Upgrading dairy cattle evaluation system in Russian Federation. *Interbull Bulletin*, 2017, 51: 67-74.
24. Кондрахин И.П., Архипов А.В., Левченко В.И., Таланов Г.А., Фролова Л.А., Новиков В.Э. *Методы ветеринарной клинической лабораторной диагностики*. М., 2004.
25. Зиновьева Н.А., Стрекозов Н.И., Ескин Г.В., Турбина И.С., Янчуков И.Н., Ермилов А.Н. Моногенные наследственные дефекты и их роль в воспроизводстве. *Животноводство России*, 2015, 6: 30.
26. Shanks R.D., Greiner M.M. Relationship between genetic merit of Holstein bulls and deficiency of uridine-5'-monophosphate synthase. *J. Dairy Sci.*, 1992, 75(7): 2023-2029 (doi: 10.3168/jds.S0022-0302(92)77962-4).
27. Saleem S., Heuer C., Sun C., Kendall D., Moreno J., Vishwanath R. The role of circulating low-density lipoprotein levels as a phenotypic marker for Holstein cholesterol deficiency in dairy cattle. *J. Dairy Sci.*, 2016, 99(7): 5545-5550 (doi: 10.3168/jds.2015-10805).
28. Позовникова М.В., Лихачева Т.Е., Ширяев Г.В. Влияние мутации дефицит холестерина на репродуктивные качества коров голштинизированной черно-пестрой породы. *Генетика и разведение животных*, 2018, 2: 61-66.
29. Gross J.J., Schwinn A.C., Schmitz-Hsu F., Menzi F., Drögemüller C., Albrecht C., Bruckmaier R.M. Rapid Communication: Cholesterol deficiency-associated *APOB* mutation impacts



- lipid metabolism in Holstein calves and breeding bulls. *J. Anim. Sci.*, 2016, 94(4): 1761-1766 (doi: 10.2527/jas.2016-0439).
30. Mock T., Mehinagic K., Menzi F., Studer E., Oevermann A., Stoffel M. H., Drögemüller C., Meylan M., Regenscheit N. Clinicopathological phenotype of autosomal recessive cholesterol deficiency in Holstein cattle. *J. Vet. Intern. Med.*, 2016, 30(4): 1369-1375 (doi: 10.1111/jvim.13976).
  31. Inokuma H., Horiuchi N., Watanabe K.I., Kobayashi Y. Retrospective study of clinical and laboratory findings of autosomal recessive cholesterol deficiency in Holstein calves in Japan. *Jpn. J. Vet. Res.*, 2017, 65(2): 107-112 (doi: 10.14943/jivr.65.2.107).
  32. Племяшов К.В., Сакса Е.И., Барсукова О.Е. Селекция голштинского скота при чистопородном разведении. *Генетика и разведение животных*, 2016, 1: 8-16.
  33. Сакса Е.И., Барсукова О.Е. *Результаты использования и генеалогические схемы быков-производителей голштинской породы*. СПб, 2012.

<sup>1</sup>*Всероссийский НИИ генетики и разведения сельскохозяйственных животных, филиал ФГБНУ Федеральный научный центр животноводства — ВИЖ им. академика Л.К. Эрнста*, 196601 Россия, г. Санкт-Петербург—Пушкин, Московское ш., 55А, e-mail: marina.qpr@gmail.com ✉, kudinov\_aa@list.ru, leib1406@yandex.ru, dementevan@mail.ru;  
<sup>2</sup>*ФГБОУ ВО Санкт-Петербургский государственный аграрный университет*, 196601 Россия, г. Санкт-Петербург—Пушкин, Петербургское ш., 2, e-mail: likhacheva.spb@gmail.com

*Поступила в редакцию 6 марта 2018 года*

*Sel'skokhozyaistvennaya biologiya [Agricultural Biology]*, 2018, V. 53, № 6, pp. 1142-1151

## CHOLESTEROL DEFICIENCY MUTATION HCD DOES NOT IMPACT MILK PRODUCTIVITY AND BLOOD LEVELS OF CHOLESTEROL AND TRIGLYCERIDES IN RUSSIAN HOLSTEIN BLACK AND WHITE CATTLE

*M.V. Pozovnikova<sup>1</sup>, T.E. Lihacheva<sup>2</sup>, A.A. Kudinov<sup>1</sup>, V.B. Lejbova<sup>1</sup>, N.V. Dementeva<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>*All-Russian Research Institute for Farm Animal Genetics and Breeding — branch of Ernst Federal Science Center for Animal Husbandry*, 55A, Moskovskoe sh., St. Petersburg—Pushkin, 196625 Russia, e-mail marina.qpr@gmail.com (✉ corresponding author), kudinov\_aa@list.ru, leib1406@yandex.ru, dementevan@mail.ru;

<sup>2</sup>*Saint-Petersburg State Agrarian University*, 2, Peterburgskoe sh., St. Petersburg—Pushkin, 196601 Russia, e-mail likhacheva.spb@gmail.com

ORCID:

Pozovnikova M.V. orcid.org/000-0002-8658-2026

Lihacheva T.E. orcid.org/0000-0001-8456-5911

Kudinov A.A. orcid.org/0000-0002-7811-576X

The authors declare no conflict of interests

Acknowledgements:

Supported financially by FASO Russia (theme GZ No. 0600-2018-0014)

Received March 6, 2018

Lejbova V.B. orcid.org/0000-0002-7017-9988

Dementeva N.V. orcid.org/0000-0003-0210-9344

doi: 10.15389/agrobiol.2018.6.1142eng

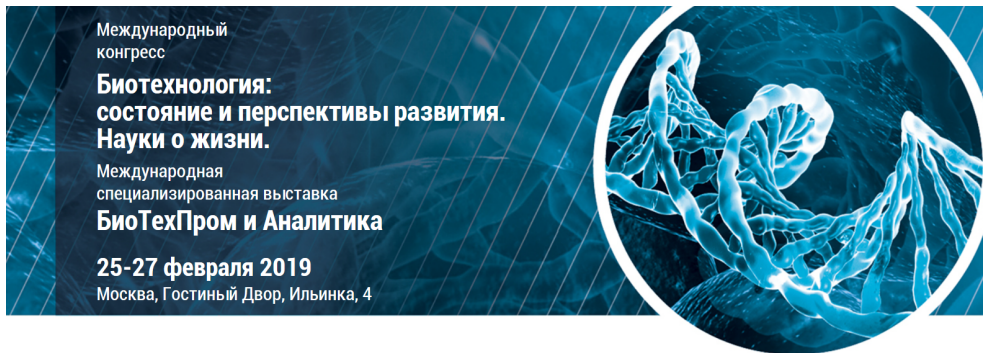
### Abstract

The spread of lethal and semi-lethal mutations in cattle populations results in embryonic and postembryonic mortality of calves. The use of a limited number of sires creates the danger of wide spread of genetic abnormalities. Genetic markers identify carriers of a mutation in the absence of information about phenotypic manifestations of the disease. Cholesterol deficiency mutation (HCD, haplotype cholesterol deficiency), a recessive defect of Holstein cattle, is characterized by the death of calves in the first days or months of life. The extent of this genetic defect worldwide is currently very high, 6 to 17 %. In general, there is little information about the relationship of recessive mutations with dairy cattle productivity, and data on the effect of the HCD mutation, first described in 2015, on breeding traits are extremely limited. This paper is the first to report data on a genetic study of the APOB gene region on the BTA11 chromosome and milk production indices depending on the HCD status in a Russian dairy cow population. The obtained results indicate that in the studied population the HCD mutation does not reduce the pedigree value of animals in terms of milk production and milk quality (for fat and protein). The study was performed in a breeding farm of the Leningrad region in 2017. Random sample of Holstein black and white cattle include cows ( $n = 451$ ) born in 2009-2015 and the calves ( $n = 7$ ) with clinical signs of diarrhea and proven HCD carriers in pedigree (sires, sires of sires). Genotyping of animals was carried out by PCR using allele specific primers. The productivity of lactation 1 and 2 (milk, yield of milk fat and protein) was studied depending on the genotypes according to HCD. The ANOVA variance analysis and calculation of means were carried out with RStudio program on the basis of

a single-effect model. Estimated breeding value of milk, fat and protein yields in kg was calculated using BLUP Animal Model. The concentration of triglycerides and cholesterol was determined with an automatic biochemical analyzer RX Daytona (Randox Laboratories, UK). According to the results of the study, 35 cows (7.76 %) of those tested are the HCD carriers. Among the calves, one calf was defined as a carrier and one heifer with homozygous HCD genotype for *APOB* gene had all symptoms of the disease. It is established that the HCD<sup>+</sup> cows are not inferior to their peers on milk productivity. The cows with the mutant allele of the *APOB* gene born in 2013 significantly exceeded healthy animals: during lactation 1 by 1219 kg ( $p \leq 0.01$ ) for milking, by 13.8 kg for milk fat yield, and by 19.9 kg for milk protein yield ( $p \leq 0.05$ ); during lactation 2 by 1392 kg ( $p \leq 0.001$ ) for milking, by 44 kg ( $p \leq 0.05$ ) for milk fat yield, and by 39.8 kg for milk protein yield ( $p \leq 0.01$ ). The average estimated breeding value (EBV) of HCD carriers is 6.8 % higher in milk yield, 8.1 % in fat and 4.8 % in protein compared to HCD<sup>-</sup> animals. Monitoring of progeny of HCD carriers using Illumina Bovine IBDv3 (50k) did not reveal significant haploblocks in the *APOB* gene region, therefore, selection for increased milk productivity would not lead to a significant increase in the incidence of HCD carriers. Comparative analysis of biochemical indices in the first half of the dry period did not reveal significant differences in the blood cholesterol ( $3.04 \pm 0.31$  mmol/l and  $3.33 \pm 0.12$  mmol/l, respectively) and triglycerides ( $0.197 \pm 0.01$  mmol/l, and  $0.170 \pm 0.01$  mmol/l) between groups of latent HCD carriers and cows free from this mutation. Our study has shown that the use of HCD carriers does not reduce productivity in the dairy herd. However, monitoring for this genetic defect is necessary, as incorrect selection of animals can lead to the birth of a sick and non-viable offspring, which in turn will cause economic losses in the farms.

Keywords: cattle, genotyping, HCD, haplotype cholesterol deficiency, lethal recessive mutation, apolipoprotein B, gene *APOB*, milk yielding, triglycerides, cholesterol.

## Научные собрания



### Тематические разделы:

#### BIOTech2C

- продукция и услуги биотехнологических компаний для конечного пользователя
- биологически активные добавки, геропротекторы
- биологические и генетические тесты
- мобильные технологии и индивидуальное диагностическое оборудование

#### BIOLab

- лабораторно-аналитическое оборудование и биоаналитические комплексы
- smart лаборатории
- процессы и аппараты для биотехнологических производств и лабораторных исследований (биореакторы и измерительное оборудование)
- реактивы и наборы, питательные среды
- расходные материалы

#### BIOSoft

- программные продукты для биотехнологии
- большие массивы данных Big Data.
- облачные технологии и сервисы.
- банки данных в биотехнологии. IT-решения для биологических задач

#### BioMed

- персонализированная диагностика и лечение.
- биофармацевтика и фармацевтические компании.
- биочипы и биосенсоры.
- генетическая инженерия и биосовместимые материалы.
- биомедицинские и роботические технологии

Информация: <http://www.biomos.ru/>