На правах рукописи

КУДИНОВ АНДРЕЙ АНДРЕЕВИЧ

МОДЕЛЬ ГЕНОМНОЙ ОЦЕНКИ ПЛЕМЕННОЙ ЦЕННОСТИ МОЛОЧНОГО СКОТА ЛЕНИНГРАДСКОЙ ОБЛАСТИ

06.02.07 – разведение, селекция и генетика сельскохозяйственных животных

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:

доктор ветеринарных наук,
профессор, член-корреспондент РАН
Племяшов Кирилл Владимирович

Санкт-Петербург – 2019 г.

Работа выполнена во Всероссийском научно-исследовательском институте генетики и разведения сельскохозяйственных животных - филиал Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный научный центр животноводства – ВИЖ имени академика Л. К. Эрнста».

Научный руководитель: **Племяшов Кирилл Владимирович**, доктор ветеринарных наук, профессор, член-корреспондент РАН

Официальные оппоненты: **Ахметов Тахир Мунавирович**, доктор биологических наук, профессор, ФГБОУ ВО «Казанская государственная. академия ветеринарной медицины им. Н.Э.Баумана» Министерства сельского хозяйства РФ, проректор по научной работе.

Гончаренко Галина Моисеевна, доктор биологических наук, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Сибирский федеральный научный центр агробиотехнологий Российской академии наук» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации.

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный аграрный университет».

Защита состоится « 27 » сентября 2019 г. в 11.00 часов на заседании диссертационного совета Д 220.017.01, созданного на базе ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт племенного дела» по адресу 141212, Московская область, Пушкинский район, п. Лесные Поляны. Тел. (495) 515-95-57, e-mail: vniiplem@mail.ru

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт племенного дела» и на сайте www.vniiplem.ru.

Автореферат разослан «___» _____ 2019г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
доктор сельскохозяйственных наук Тяпугин Сергей Евгеньевич

1.ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Ведение селекционной работы на современном уровне невозможно без использования прогрессивных методов оценки, повышающих точность прогноза племенной ценности животного (Дунин, 2012; Алмазова, 2014; Мымрин 2014; Племяшов, 2014, 2015). С 1980-х годов странами, ведущими интенсивное молочное животноводство, были внедрены в практическое использование модели оценки и прогноза племенной ценности крупного рогатого скота на основе методологии Лучшего Линейного Несмещенного Прогноза (BLUP - Best Linear Unbiased Prediction). Не смотря на единую идею работы методологии BLUP, каждая страна разработала собственные модели оценки, наиболее точно учитывающие условия содержания скота (Кузнецов, 2003; Interbull bulletin, 2000).

Революционный скачек в области прогноза племенной ценности произошел в 2009 году, когда для отбора молодых животных стали применять полногеномные молекулярно-генетические данные (Кузнецов, 2012; Смарагдов, 2009, 2013; Meuwissen, 2016). В основу нового метода было заложено генотипирование животных - кандидатов по нескольким тысячам однонуклеотидных полиморфизмов (SNP – Single nucleotide polymorphism), с дальнейшим расчетом их влияния на племенные качества животных (Leggara, 2009; Meuwissen, 2016). Молодые животные получили возможность точного (более 70%) прогноза племенной ценности задолго до начала правления продуктивных признаков (Зиновьева, 2018; Калашникова, 2010; Яковлев, 2018). Ключевым компонентом геномной оценки является эталонная (референтная) популяция, состоящая из оцененных традиционным методом животных. Лучшими кандидатами для данной популяции являются быки, имеющие высокий уровень достоверности оценки по качеству потомства (Pryce, 2012).

Необходимость внедрения метода геномной оценки в малочисленных популяциях, имеющих незначительное число быков, привело к необходимости исследований и разработки оптимальных моделей создания референтной популяции. Работ в данном направлении в Российской Федерации ранее не производилось.

Степень разработанности темы исследований. Во многих странах, ведущих интенсивное молочное животноводство, традиционная оценка племенной ценности быков и коров методом BLUP ведется с 1980-90х годов. С развитием методов геномной оценки, в дополнение к традиционным методам, в качестве официального в 2009-2011 гг. был признан метод геномного прогноза. В Российской Федерации, законодательно закрепленным является метод Дочери – Сверстницы (ДС), закрепленный инструкцией 1979 года (Инструкция, 1979). Преимущества метода BLUP перед ДС в нашей стране были показаны еще в 1990х годах, однако метод до сих пор не внедрен в практику. Внедрение геномной оценки и селекции в стране невозможно без создания собственной референтной популяции и модели геномного прогноза. Недостаток отечественных оцененных быков и большой объем импорта зарубежного племенного материала осложняют создание референтной популяции по аналогии с опытом зарубежных стран. По этой причине остается актуальным проводить разработки альтернативных методов создания референтных групп для прогноза племенной ценности.

Цель и задачи исследований. Цель исследований состояла в проведении геномного прогноза племенных качеств молочного скота Ленинградской области.

Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие задачи:

- провести прогноз племенной ценности с использованием метода BLUP поголовья голштинского и черно-пестрого скота Ленинградской области;
- исследовать популяционную структуру голштинского и черно – пестрого скота Ленинградской области на молекулярно-генетическом уровне с использованием методов полногеномного SNP генотипирования;
- создать первичную референтную порпуляцию генотипированных и оцененных методом BLUP АМ животных, состоящую преимущественно из коров;
- провести геномный прогноз племенных качеств молочного скота Ленинградской области с использованием созданной референтной популяции.

Научная новизна. Создана смешанная модель прогноза племенной ценности, на основании методологии BLUP АМ, охватывающая все племенное поголовье черно-пестрого и голштинского скота Ленинградской области. Изучено генетическое разнообразие голштинской и черно-пестрой пород ЛО с использованием полногеномных SNP данных. Представлен геномный Fst анализ межстадного различия и его использование для отбора животных в референтную популяцию. Показан потенциал геномной информации в идентификации и коррекции ошибок допущенных при ведении родословной. Проведен контроль генетических дефектов КРС с использованием полногеномных SNP чипов. Проведен геномный прогноз племенных качеств молочного скота с использованием генотипированных животных. Создана первичная референтная популяция региона состоящая преимущественно из коров. Сформированы принципы отбора животных в референтную популяцию.

Теоретическая и практическая значимость работы. Племенная ценность, рассчитанная с помощью разработанной смешанной модели BLUP, может быть использована в качестве справочной информации специалистами селекционерами племенных заводов и репродукторов. Для практической селекционной работы исключительно после апробации модели.

Результаты проведенных геномных исследований могут использоваться при создании Всероссийской референтной популяции молочного скота. Использование коров в референтной популяции ускорит внедрение метода геномного прогноза в практическое животноводство Ленинградской области и Российской Федерации.

Методология и методы исследований. Для проведения исследования были использован опыт прогноза племенной ценности, в том числе и геномной, с использованием моделей BLUP накопленный отечественными и зарубежными учеными. Работа по изучению генетической дифференциации популяции была проведена в соответствии общепринятыми методами и описанными в литературе методами. Полногеномное генотипирование проводилось в соответствии с протоколом работы разработанным компанией Illumina.

Основные положения диссертации, выносимые на защиту:

- Прогноз племенной ценности на основании методологии BLUP для 49 племенных заводов и репродукторов Ленинградской области.

- Полногеномное SNP – генотипирование 1100 коров Ленинградской области.
- Степень однородности голштинского и черно-пестрого скота Ленинградской области оценена с помощью полногеномных данных и метода главных компонент.
- Определение межстадных различий с использованием попарной $\mathbf{F_{st}}$ статистики и полногеномных данных, для последующего отбора коров в референтую популяцию.
- Показана возможность создания первичной референтной популяции преимущественно из коров.
- Геномный прогноз племенных качеств молочного скота Ленинградской области.

Степень достоверности и апробации результатов. Достоверность генетической и геномной оценки оценивалась методом аппроксимации по Misztal и Wiggans в программном пакете Mix99. Статистическая значимость F_{st} анализа рассчитана с помощью критерия Стьюдента в программной среде R. Биологический материал собран в соответствии с ветеринарными правилами каудальной венопункции. Достоверность генотипирования маркеров была оценена в программе Illumina GenomeStudio, методом кластеризации. Результаты работы представлены на следующих мероприятиях: 5-й Международный ветеринарный конгресс (Москва, 2015); 8-й Московский международный конгресс «Биотехнология: состояние и перспективы развития» (Москва, 2015); Семинар для работников АПК «Оценка быков североамериканской селекции по племенной ценности» (Санкт-Петербург, 2015); Практический семинар «Создание единой государственной информационной системы в сфере молочного скотоводства» (Санкт-Петербург, 2015); 65-й конференции EAAP (Белфаст, 2016); Всероссийская научная конференция молодых ученых с международным участием «Современное состояние, проблемы и перспективы развития Агропромышленного комплекса» (Симферопль, 2016); Ежегодном собрании Interbull (Таллин, 2017); Молочном форуме «Вологда – молочная столица России» (Вологда, 2017) и Международной научно-практической конференции «Практическое использование геномных и новых селекционных технологий в животноводстве» (Санкт-Петербург, 2018).

Публикация результатов исследования. По результатам исследований было опубликовано 9 печатных работ, в том числе 4 – в изданиях, входящих в перечень журналов Сеть науки (Web of Science), 2 в изданиях, рекомендованных ВАК Минобрнауки.

Личный вклад автора. Личный вклад соискателя состоит в непосредственном участии во всех без исключения этапах диссертационного исследования.

Структура и объем диссертации. Диссертационная работа включает главы: введение, обзор литературы, материалы и методы, собственные исследования, заключение. Работа содержит 128 страниц машинописного текста, 18 таблиц, 22 рисунка. Библиография включает 125 наименований, в том числе на иностранном языке – 72.

2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЙ

Исследования по схеме представленной на рисунке 1 проводились на базе Всероссийского научно исследовательского института генетики и разведения сельскохозяйственных животных - филиала ФГБНУ ФНЦ им Л.К. Эрнста. Консультационную поддержку и обучение осуществляли специалисты Университета Хельсинки (University of Helsinki) и Национального Института Природных Ресурсов Финляндии (LUKE) в рам-

ках научно-исследовательского соглашения Генетическая оценка российского молочного скота (RUGE - Russian Dairy Cattle Genetic Evaluation).

Исследования проводились на биологическом и фенотипическом материале племенных заводов и репродукторов Ленинградской области.

Данные о происхождении и показатели фенотипического учета голштинского и черно-пестрого скота были экстрагированы из базы данных СЕЛЭКС Регион ООО «РЦ Плинор». Выгруженные данные включали показатели молочной продуктивности по признакам удой, молочный жир и белок за 305 дней лактации; даты отела, запуска и осеменения коров. Родословная насчитывала 452622 особи крупного рогатого скота, фенотипическая информация от 206114 коров.

Подготовка фенотипической и родословной информации, осуществлялась поиск и удаление не достоверных данных осуществлялось с помощью программ RelaX2, IBM SPPS19 и RStudio (RStudio Team, 2015).

Разработка смешанной модели прогноза племенной ценности была осуществлена в соответствии с методикой BLUP Repeatability Animal Model (Лучший Линейный Несмещенный Прогноз Модель Животного Повторных записей продуктивности):

$$\mathbf{y = Xb + Z_1a + Z_2pe + e,}$$ где

y - вектор наблюдений (удой, кг);

b - вектор фиксированных эффектов;

a~N(0,Aσ2a) - вектор аддитивного эффекта;

pe~N(0,Iσ2pe) - вектор перманентного влияния среды;

e~N(0,Iσ2e) - вектор остаточных эффектов;

X, Z_1, Z_2 - единичные диагональные матрицы, связывающие вектор наблюдений с векторами фиксированных и случайных эффектов.

Рисунок 1. Схема проведенных исследований.

Расчет компоненты вариансы для продуктивной популяции производили с использованием алгоритма AI-REML (Jensen, 1997) в модуле DMU-AI из пакета DMU (Per Madsen, Just Jensen 2013). Расчет племенной ценности в программе MiX99 (MiX99

Development Team 2015). Достоверность оценки рассчитана в программе AppaX99 из пакета MiX99 методом аппроксимации по Misztal и Wiggans (1988).

Биологический материал представленный в исследовании - венозная кровь собранная в пробирки ЭДТА-К3. Выделение ДНК проходило с использованием модифицированного протокола фенол-хлороформной экстракции с последующим контролем качества на спектрофотометре NanoDROP 2000c (Thermo scientific, Inc).

Генотипирование 1100 коров осуществлялось по протоколу illumina с применением чипа Bovine50Kv2 SNP BeadChip и IDBv3 SNP BeadChip включавшими более 50000 SNP. Подготовка генотипов произведена с помощью исключения маркеров не прошедших следующие тесты: минорная частота аллеля менее 5%; уравнение Харди-Вайнберга с порогом достоверности 0.001; пропуска генотипов не менее чем у 90% образцов.

Популяционное разнообразие исследовано методами: анализа главных компонент (Reich, 2008), попарной статистики F_{st} по формуле Bhatia (2013), геномного инбридинга.

Прогноз геномной племенной ценности производился с применением метода одношаговой модели ssSNP-BLUP (Christensen, 2010). Комбинированная матрица генотипов и родословной $\mathbf{H^{-1}}$ создавалась по формуле:

$$\mathbf{H}^{-1} = \mathbf{A}^{-1} + \begin{bmatrix} 0 & 0 \\ 0 & \mathbf{G}^{-1} - \mathbf{A}_{22}^{-1} \end{bmatrix}$$

где,

$\mathbf{A}^{-1}$ – инвертированная матрица родства всех животных родословной;

$\mathbf{G}^{-1}$ – инвертированная геномная матрица родства;

$\mathbf{A}_{22}^{-1}$ – инвертированная матрица родства генотипированных животных

Для построения инвертированной матрицы **H** была использована программа HGinv (Stranden, 2015).

3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

3.1 Прогноз племенной ценности животных моделью BLUP на примере голштинизированного черно-пестрого скота Ленинградской области.

На первом этапе проведен анализ родословной в результате, которого были обнаружены три циклические ошибки. Наиболее плотная часть родословной представлена животными 1990-2015 годов рождения.

Подготовка показателей признаков удой молока, молочный жир и белок кг за 305 дней для использования в модели прогноза проведена в три этапа: (1) удаление информации о лактациях свыше пятой; (2) удаление записей от животных с количеством дней по удою менее 305 дней, удаление записей по молочному жиру и белку с пропущенными значениями по удою; (3) удаление записей продуктивности лежащих за пределами трех стандартных отклонений.

В структуру модели были включены два разработанных фиксированных эффекта. Эффект **Стадо** – **Год** – **Сезон (HYS)** коровы и **Возраст отела** - **Сервис период** с учетом лактации **(ACDO).** Эффекты **HYS** и **ACDO** включали 2341 и 170 уровней, соответ-

ственно. Случайные эффекты в соответствии с используемой моделью: **a** – аддитивный эффект животного, **pe** – эффект перманентного влияния среды.
В упрощённом виде, модель повторных записей (BLUP Repeatability Animal Model) имела вид:

$$y = HYS + ACDO + a + pe + e$$

где, y – признак продуктивности; HYS и $ACDO$ – фиксированные эффекты;
a и pe- случайные эффекты; e – остаточный эффект.

Результаты расчета компоненты вариансы с использованием первой и повторных лактации представлены в таблице 1. Наследуемость была близка к показанному Ben Zaabza (2016) и слегка ниже показанного для популяции США (Carabano, 1989). Различные условия в системах содержания скота и отношение к точности ведения зоотехнического учета в племенных заводах и репродукторах приводит к повышению остаточной вариансы. Стоит отметить, что высокая остаточная компонента вариансы (σ^2_e), более чем в 2 раза превышающая аддитивную (σ^2_a) и перманентную (σ^2_{pe}) является основной причиной низкого показателя наследуемости в данном исследовании.

Таблица 1. Результаты расчета компонент вариансы аддитивной (σ^2_a), перманентного влияния среды (σ^2_{pe}) и остаточной (σ^2_e), коэффициента наследуемости (h^2) и повторяемости (**R**) для признаков молочной продуктивности.

Модель	Признак	σ^2_a	σ^2_{pe}	σ^2_e	h^2	R
Модель первой лактации	Удой	301 465	NA	936 884	0.24	NA
	Молочный жир	328	NA	1353	0.20	NA
	Молочный белок	223	NA	915	0.20	NA
Модель повторных лактаций	Удой	313 916	281 706	1 138 386	0.18	0.34
	Молочный жир	412	324	1630	0.17	0.31
	Молочный белок	295	210	1074	0.19	0.31

Прогноз племенной ценности (ПЦ) был осуществлен для всех животных родословной. Тренд расчетной племенной ценности коров по признакам молочной продуктивности представлен на рисунках 2-4. ПЦ стандартизирована с использованием средней племенной ценности животных рожденных в 2010 - 2012 году.
Генетические тренды по удою, молочному жиру и белку положительны и свидетельствуют о прогрессе в популяции. Однако ежегодный прогресс ниже, чем в голштинских популяциях, используемых для импорта семени. Ежегодный расчетный генетический тренд у животных, рожденных в 2004 - 2014 году составил 61.4 для признака

удой, 1.9 и 1.76 кг для молочного жира и белка. Для Канады тренд в 2004 – 2014 годах составил соответственно 85.4, 4.2 и 3.3 кг\ год. Средняя достоверность прогноза моделью BLUP AM согласно методу Misztal и Wiggans (1988) составила для коров 17 % и быков 48%. Валидация тренда по **методу I** Интербулл успешно пройдена для ПЦ по удою, молочному жиру и белку, что подтверждается более низким показателем разницы между трендами, чем критерий Интербулл.

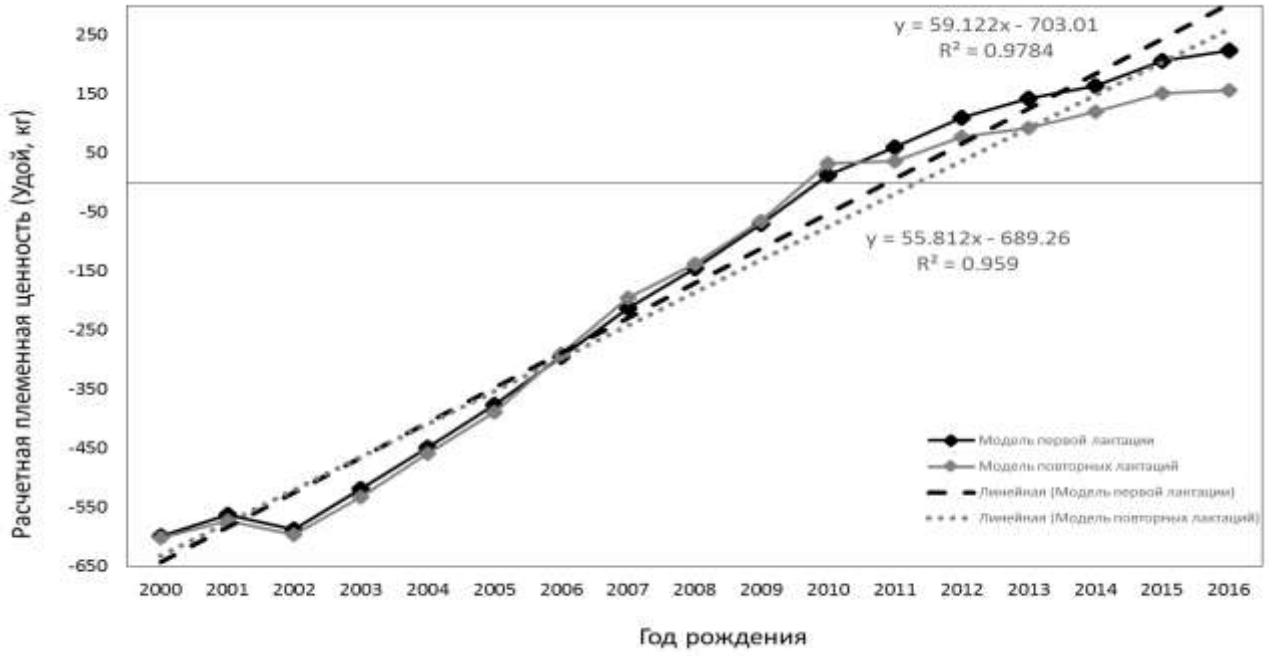

Рисунок 2. Рассчитанный генетический тренд коров 2000 – 2016 годов рождения и соответствующие линии регрессионного уравнения для модели первой и повторных лактаций по признаку удой за 305 дней.

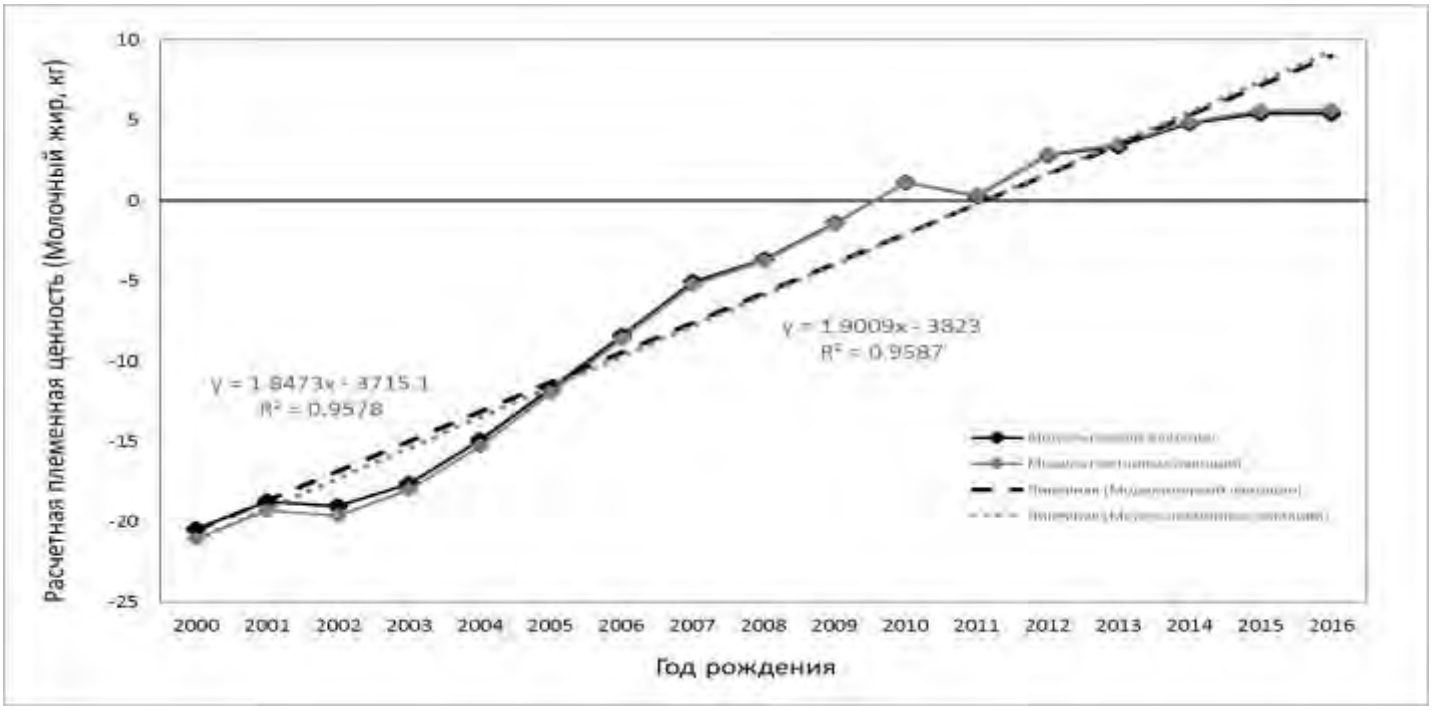

Рисунок 3. Рассчитанный генетический тренд и соответствующие линии регрессионного уравнения для модели первой и повторных лактаций по признаку молочный жир за 305 дней.

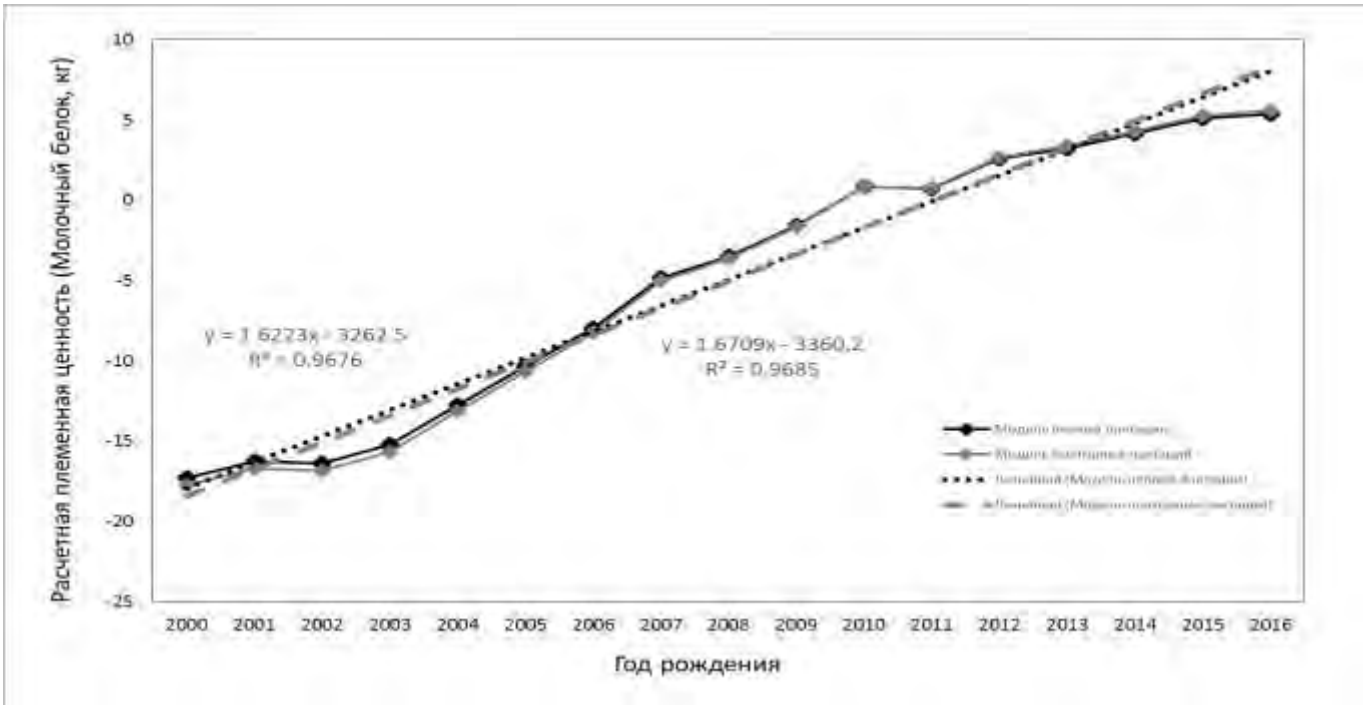

Рисунок 4. Рассчитанный генетический тренд и соответствующие линии регрессионного уравнения для модели первой и повторных лактаций по признаку молочный белок за 305 дней.

3.2 Молекулярно-генетический анализ популяционной структуры голштинского и черно-пестрого скота Ленинградской области.

Исследование генетического разнообразия выполнено для формирования исходной референтной популяции молочного скота Ленинградской области. Генетическое разнообразие исследовано на репрезентативной выборке 1100 коров и 300 быков. Отбор коров из хозяйств осуществлён по следующим разработанным первичным условиям:

1. Отобранные животные должны иметь достоверный учет родословной и фенотипической информации.
2. Животные кандидаты на момент отбора биологического материала должны представлять молодую часть популяции, при этом иметь данные о собственной продуктивности.
3. Отбор животных должен происходить с поддержанием филогенетического разнообразия.
4. Отбор животных должен происходить с учетом фенотипической вариабельности.

В результате проделанной работы было отобрано 13 Племенных заводов, ведущих многолетнюю племенную работу в соответствии с наставлениями Селекционного центра, Ассоциации по голштинской и черно-пестрой породе скота ВНИИГРЖ. Число генотипированных животных в каждом хозяйстве представлено в таблице 2.

Таблица 2. Распределение генотипированных коров по племенным заводам.

Код хозяйства	Число первотелок	Код хозяйства	Число первотелок
1	87	8	77
2	84	9	110
3	106	10	72
4	104	11	46
5	85	12	63
6	91	13	96
7	109		

Полногеномное SNP генотипирование коров репрезентативной выборки позволило получить информацию по 54609 SNP или 52445 SNP маркерам в геноме скота. Фрагмент генотипа представлен на рисунке 5.

```
Content         BovineSNP50_v2_C.bpm
Num SNPs        54609
Total SNPs      54609
Num Samples     192
Total Samples   192
File    1 of 192
[Data]
SNP Name        Sample ID       Allele1 - AB    Allele2 - AB    X       Y       GC Score
ARS-BFGL-BAC-10172      1       B       B       0.012   0.985   0.9506
ARS-BFGL-BAC-1020       1       A       B       0.255   0.305   0.9673
ARS-BFGL-BAC-10245      1       B       B       0.149   1.393   0.8212
ARS-BFGL-BAC-10345      1       A       B       0.704   0.710   0.9276
ARS-BFGL-BAC-10365      1       B       B       0.005   0.853   0.5335
ARS-BFGL-BAC-10375      1       B       B       0.011   0.734   0.9567
ARS-BFGL-BAC-10591      1       A       B       0.234   0.386   0.9003
ARS-BFGL-BAC-10867      1       A       A       0.632   0.000   0.9434
ARS-BFGL-BAC-10919      1       A       A       1.141   0.024   0.8526
ARS-BFGL-BAC-10951      1       A       A       0.364   0.029   0.5140
ARS-BFGL-BAC-10952      1       A       A       1.081   0.035   0.9512
ARS-BFGL-BAC-10960      1       B       B       0.016   0.685   0.9528
ARS-BFGL-BAC-10972      1       B       B       0.035   1.218   0.8759
ARS-BFGL-BAC-10975      1       A       A       1.446   0.079   0.8142
ARS-BFGL-BAC-10986      1       B       B       0.049   0.776   0.9309
ARS-BFGL-BAC-10993      1       A       A       1.430   0.019   0.9014
ARS-BFGL-BAC-11000      1       A       A       0.469   0.007   0.9686
ARS-BFGL-BAC-11003      1       A       A       1.307   0.041   0.9215
ARS-BFGL-BAC-11007      1       A       A       1.152   0.015   0.9454
ARS-BFGL-BAC-11025      1       A       B       0.368   0.524   0.9082
ARS-BFGL-BAC-11028      1       A       A       0.367   0.012   0.9678
ARS-BFGL-BAC-11034      1       B       B       0.035   0.746   0.9509
ARS-BFGL-BAC-11039      1       B       B       0.004   0.772   0.9658
ARS-BFGL-BAC-11042      1       A       B       1.007   0.879   0.8506
ARS-BFGL-BAC-11044      1       A       B       0.686   0.711   0.9654
ARS-BFGL-BAC-11047      1       A       A       0.755   0.009   0.9465
```

Рисунок 5. Фрагмент результата полногеномного сканирования.

В результате выполненной обработки результатов генотипирования для исследования популяционного разнообразия и геномной оценки использовано 42877 SNP. В качестве референсного при алгоритме заполнения (imputation) использован чип IDBv3. Общее время процедуры составило 4 минуты 46 секунд, процент заполнения неизвестных генотипов – 8,07%.

Анализ гетерогенности популяции голштинского и черно-пестрого скота проведен с помощью метода главных компонент (Рисунок 6). Молекулярно генетическая SNPs гетерогенность показана в двухмерном пространстве в виде диаграммы рассеяния, состоящей из точек, каждая из которых соответствует одному животному.

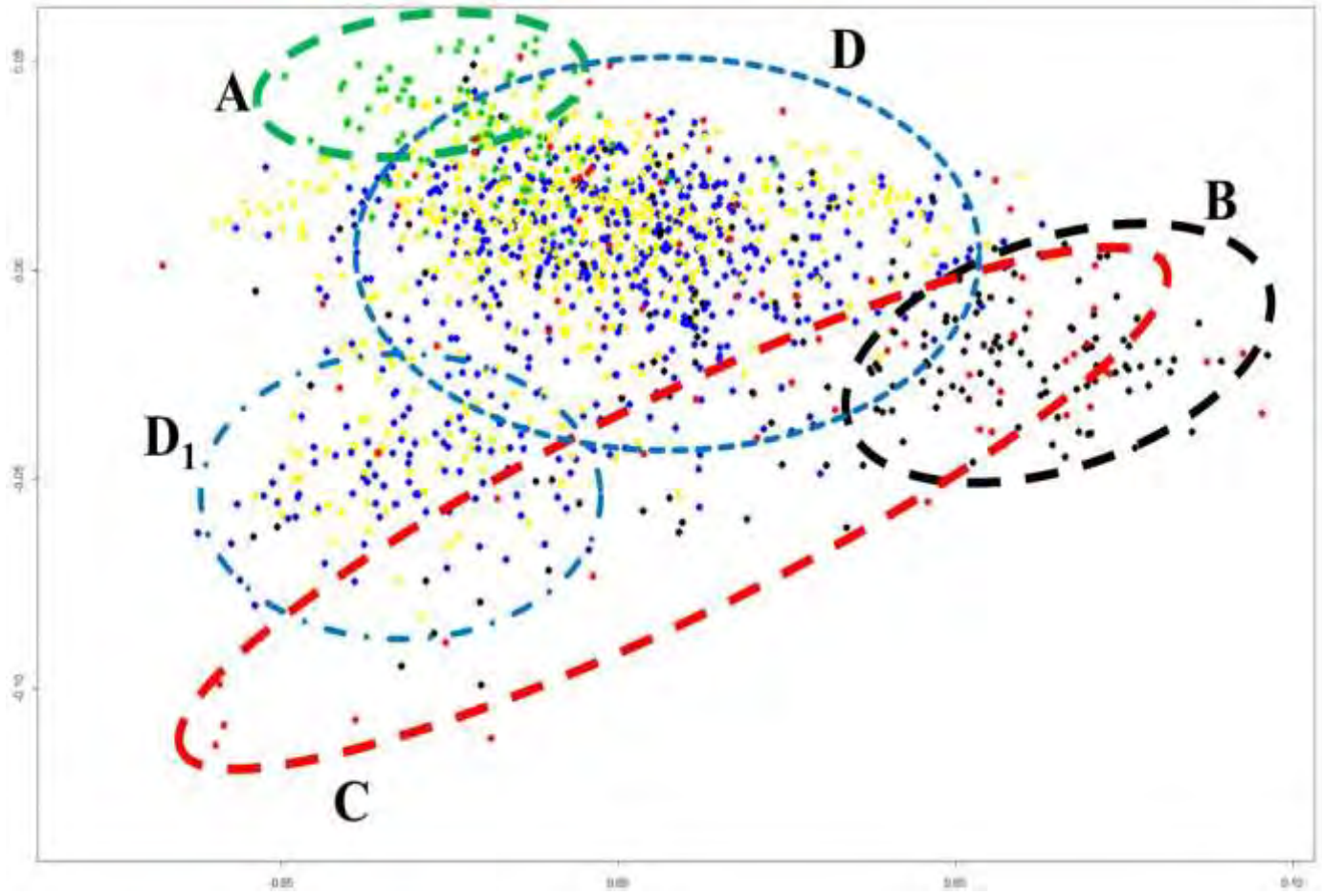

Рисунок 6. Дифференциация изучаемых образцов с окрашиванием по стране происхождения. Синий и желтый – коровы голштинской и черно-пёстрой породы; зеленый, черный, красный – быки Российского, Североамериканского и Европейского происхождения.

Быки, имеющие отцов Российского и Североамериканского происхождения (черный и красный цвет) представлены в виде кластера **A** и **B.** Их расположение диаметрально противоположно по оси абсцисса (первой главной компоненте). Быки кластера **A** преимущественно черно-пестрые быки генотипированные из архивов ВНИИГРЖ. Кластер **C** - сформирован быками Европейского происхождения и имеет растянутую форму. Большая часть быков кластера имеет общую генетическую структуру с быками Североамериканского происхождения (пересечение **X**). Однако, группа быков отделена и преимущественно образована быками импортированными из Германии в Московскую область. Данные позволяют судить о близком расположении и высокой адмиксии синих и желтых точек, что говорит о высокой генетической связи между коровами голштинского и черно-пестрого скота популяции. Генетическое сходство животных - результат многолетнего скрещивания черно-пестрой и голштинской пород. Часть коров может быть выделена в кластер D_1, так как отличается родственной связью с быками **C**.

Результаты расчета попарного индекса фиксации отображены в таблице 3. Межстадное различие результатов расчета находилось в пределах от 0.002 до 0.015 ($P<0.05$). Результаты расчета были ниже показанных между породами или популяциями одной

породы (Howard, 2015), что свидетельствует о низком межстадном генетическом различии. Наибольшие различия наблюдались между стадом 4 и стадами 2,3,5,7,8,9,10,11,12 (значение индекса $\mathbf{F_{st}}$ >0. 008). Для поддержания разнообразия и включения исторического генофонда в референтную популяцию, рационально генотипировать животных из наиболее отстоящих стад.

Проведенный расчет позволил на молекулярном уровне оценить уровень инбридинга в изучаемых стадах (Таблица 4). Для большинства стад средний уровень геномного инбридинга находился на близком уровне. Согласно рассчитанным данным наивысший инбридинг имеют выборки из хозяйства: 1, 8, 11; наименьший 9, 10, 13. Оценка молекулярного инбридинга проводилась исходя из принципа расчета соотношения ожидаемого и наблюдаемого уровня гетерозиготности. Животные из хозяйств с низким инбридингом имеют большую степень гетерогенности, и являются ценными для включения в референтную популяцию. Для анализа соотношения традиционного и геномного родства в представленной выборке был построен график зависимости (Рисунок 7) диагонали матрицы отношений по родословной (A) и геномной матрицы родства (G). Резкое изменение диагональных элементов для отдельных животных и низкий уровень корреляции (0.26) свидетельствует о вероятных ошибках в родословной генотипированных животных.

Таблица 4. Среднее значение коэффициента инбридинга у первотелок из племенных заводов Ленинградской области.

Племенное хозяйство	**Среднее значение коэффициента инбридинга**	**Стандартное отклонение коэффициента инбридинга**
1	0,009 ± 0,012	0,018
2	0,006 ± 0,002	0,013
3	0,001 ± 0,002	0,014
4	0,005 ± 0,002	0,015
5	0,004 ± 0,002	0,012
6	0,002 ± 0,002	0,014
7	0,006 ± 0,005	0,030
8	0,011 ± 0,003	0,023
9	0,002 ± 0,002	0,098
10	0,002 ± 0,003	0,015
11	0,011 ± 0,002	0,014
12	0,008 ± 0,011	0,013
13	0,002 ± 0,008	0,012

Использование кастомизированного SNP чипа позволило получить информацию о носительстве генетических дефектов и аномалий у 600 коров исследуемой выборки. Среди исследованных животных репрезентативной выборки, было выявлено 42 (7%) носителей гаплотипов фертильности голштинов (HH). Наиболее распространенным среди них являлись тип 1 (22 носителей) и 3 (17 носителей), наименьшее число (3 но-

сителя) - тип 4. Гаплотипы фертильности были обнаружены в данном исследовании, как у коров зарегистрированных как голштинский, так и черно-пестрый скот. Процент носительства был близким к сообщаемому МСХ США (6,24%) для голштинского скота (https://aipl.arsusda.gov/reference/recessive_haplotypes_ARR-G3.html).

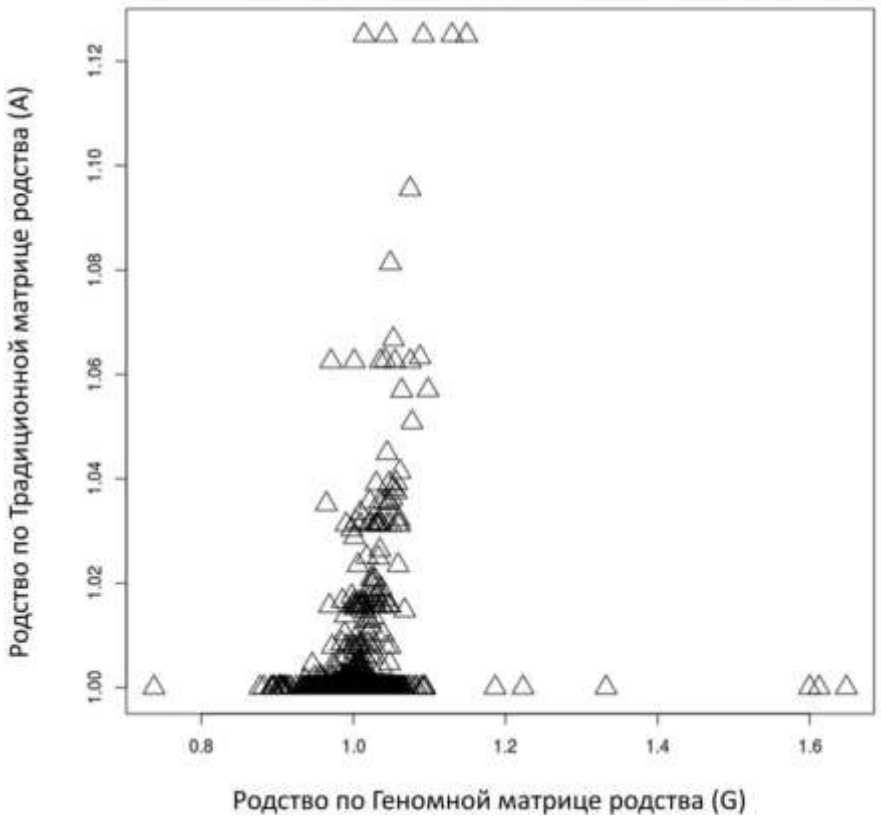

Рисунок 7. Соотношение значений диагонали родословной (A) и геномной (G) матрицы родства для генотипированных животных.

Таблица 3. Результаты расчета попарного индекса фиксации Райта (F_{st}).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
1	0	0,005	0,005	0,005	0,006	0,003	0,006	0,004	0,003	0,005	0,005	0,004	0,004
2		0	0,003	0,011	0,006	0,006	0,006	0,003	0,002	0,004	0,003	0,002	0,008
3			0	0,009	0,003	0,004	0,005	0,002	0,002	0,003	0,003	0,002	0,005
4				0	0,009	0,004	0,010	0,008	0,009	0,010	0,011	0,012	0,006
5					0	0,005	0,006	0,004	0,004	0,004	0,006	0,004	0,006
6						0	0,007	0,004	0,005	0,006	0,005	0,005	0,004
7							0	0,004	0,006	0,006	0,007	0,005	0,007
8								0	0,003	0,004	0,003	0,004	0,004
9									0	0,004	0,003	0,004	0,006
10										0	0,005	0,004	0,007
11											0	0,005	0,006
12												0	0,008
13													0

3.3 Прогноз племенной ценности животных геномной моделью BLUP с использованием созданной референтной популяции.

Для прогноза геномной племенной ценности использована одношаговая геномная модель ssBLUP. Для запуска модели была создана: 1) матрица родства между генотипированными животными $\mathbf{A_{22}}$; 2) комбинированная матрица родства и генотипов **H**. В структуре модели матрица родства $\mathbf{A^{-1}}$ заменена на $\mathbf{H^{-1}}$ для единовременного расчета геномной и BLUP племенной ценности. Фрагмент нижнего треугольника инвертированной матрицы $\mathbf{H^{-1}}$ представлен на рисунке 8.

```
204770 204770 -1.333191
204770 109239 -.1963681E-05
109239 109239 -1.410914
204770 36572 -.4603735E-05
109239 36572 -.1785351E-05
36572 36572 -1.063656
204770 174687 -.1530245E-05
174687 109239 .1979936E-01
174687 36572 .2537124E-05
174687 174687 -1.494067
204770 88462 .5059625E-06
109239 88462 .7862566E-01
88462 36572 -.2988290E-05
174687 88462 .1978615E-01
88462 88462 -1.409645
```

Рисунок 8. Фрагмент нижнего треугольника инвертированной матрицы **H**.

Прогноз геномной племенной ценности методом ssSNP-BLUP произведен для генотипированных животных с использованием маркерной информации. Средняя достоверность прогноза генотипированных коров выросла с 40% по BLUP AM до 47% по ssSNP-BLUP, т.е. на 7%. В ряде случаев наблюдалось повышение достоверности прогноза более чем на 10% (корова Туника 4659, повышение достоверности с 33% до 47% (на 14%); Басня 2847, с 39% до 53% (на 14%); Акация 3567, с 36% до 47% (на 11%).

Генетический тренд популяции с использованием AM BLUP и ssSNP-BLUP моделей показан на рисунке 9. Для большинства быков наблюдается высокая корреляция (0,991) между результатами AM BLUP и ssSNP-BLUP, что обусловлено наличием большого (>50) числа дочерей у генотипированных быков. Довольно высокая корреляция так же наблюдается и для коров – 0.889, что объясняется наличием записей собственной продуктивности и низкой численностью референтной популяции. Для молодых бычков модель AM BLUP прогнозирует негативную оценку (среднее по родителям), в то время как модель ssSNP-BLUP положительную. Результат данного прогноза должен быть подтвержден на основании проверки по качеству потомства. Малочисленность референтной популяции привела к незначительному изменению достоверности и уровня геномного прогноза в сравнении с BLUP моделью.

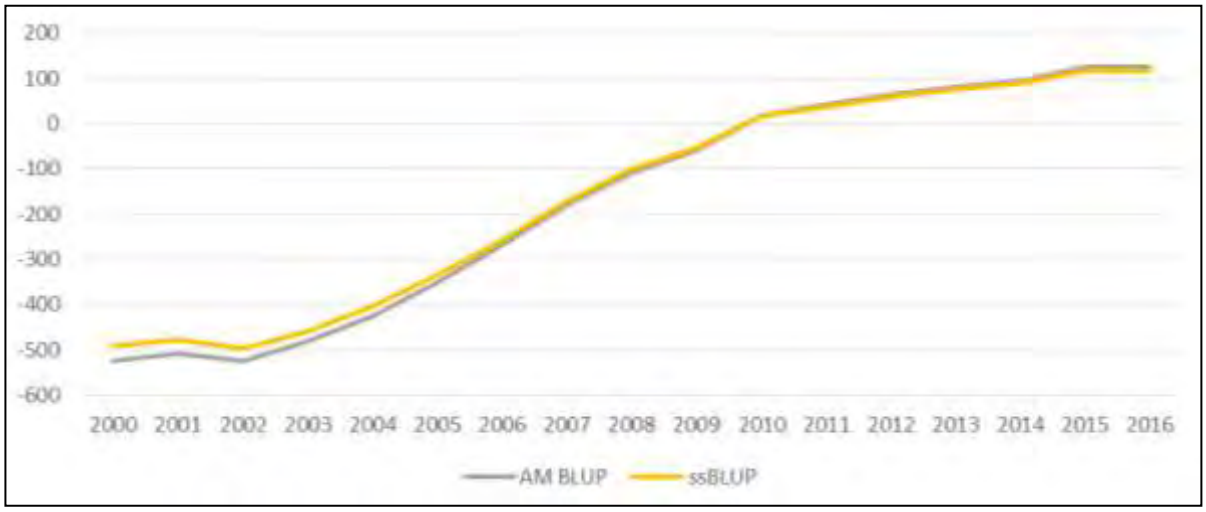

Рисунок 9. Генетический тренд расчетной ПЦ согласно AM BLUP и ssSNP-BLUP популяции голштинского и черно-пестрого скота Ленинградской области.

3.4 Требования к референтным популяциям.

На основании анализа литературы и проделанной научной работы были сформированы следующие требования к референтным популяциям:

1. Идентификация животного включаемого в референтную популяцию должна быть уникальна, не меняться с течением жизни животного и содержать информацию о породе, поле и стране происхождения.
2. Иностранные животные включаемые в референтную популяцию должны иметь международный инвентарный номер.
3. Животные включаемые в референтную популяцию должны иметь не менее трех рядов предков в электронной базе данных.
4. Быки должны иметь не менее 30 дочерей в 10 стадах для включения в референтную популяцию.
5. Отбираемые коровы должны иметь все без исключения данные установленные отдельными требованиями (даты рождения, отела, фенотипические и экстерьерные показатели).
6. Коровы должны отбираться из хозяйств ведущих достоверный учет фенотипических признаков. Проверка качества дынных Племенного завода и репродуктора должна предшествовать отбору животных.
7. Не допускается включение менее 10 коров из одного стада.
8. Включение животных в референтную популяцию должно происходить с учетом поддержания филогенетического разнообразия.
9. При создании референтных популяций для смешанных (кроссбредных) пород требуется генотипирование чистокровных (не менее 90% кровности) животных составляющих данную породу.
10. Животные, наполняющие референтную популяцию должны быть генотипированы чипом с плотностью не ниже средней (не менее 40000SNP).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведен расчет племенной ценности современной популяции голштинского и черно-пестрого скота Ленинградской области с использованием BLUP AM и ssSNP-BLUP моделей. Изучено молекулярное разнообразие пород для создания первичной референтной популяции. Проведенные исследования позволили сформулировать следующие выводы:

1. Разработанная смешанная модель позволила провести не имевшийся ранее прогноз племенной ценности по признакам молочной продуктивности 219670 коров голштинского и черно-пестрого скота Ленинградской области с использованием метода BLUP AM.

2. Средняя достоверность прогноза моделью BLUP AM согласно методу Misztal и Wiggans (1988) составила для коров 17 % и быков 48%.

3. Проведенный с использованием полногеномных данных PCA анализ графически доказал высокую родственную связь между животными голштинской и черно-пестрой пород Ленинградской области.

Было выявлено, что коровы региона, на молекулярно-генетическом уровне, являются результирующей между быками Российского и Североамериканского происхождения.

4. Значения попарного индекса Fst находились в пределах от 0.002 до 0.012 ($P<0.005$), что показало генетическое различие между стадами ниже межпопуляционного. С помощью Fst анализа были выявлены генетически выделяющиеся стада, необходимые при создании референтной популяции, - с индексом более 0.009 ($P<0.005$).

5. Включение геномной информации позволило выявить уровень геномного инбридинга и скорректировать индекс родства у 16 коров выборки более чем на 10%, у 109 коров более чем на 5%.

Корреляция между диагоналями родословной и геномной матриц родства составила 21 %, что свидетельствует о неточностях родословной генотипированных животных.

6. Анализ генетических дефектов позволил выявить 7% носителей гаплотипов фертильности голштинов (HH1, 3 и 4) среди коров черно -пестрого и голштинского скота. Что подтвердило актуальность контроля генетических дефектов параллельно с проведением генотипирования.

7. Впервые с помощью одношагового метода BLUP (ssSNP-BLUP) была рассчитана геномная племенная ценность 1100 коров и 300 быков популяции Ленинградской области.

8. Отобранная группа животных была признана первичной референтной популяцией, так как позволила провести геномный прогноз и повысить достоверность прогноза генотипированных животных на 7% по сравнению с моделью BLUP.

9. Проведенные исследования позволили сформулировать требования для референтных популяций.

ПРЕДЛОЖЕНИЯ ПРОИЗВОДСТВУ

1. Отобранную и генотипированную группу животных рекомендуется использовать в качестве первичной референтной популяции.
2. Разработанную модель геномного прогноза на основании BLUP рекомендуется апробировать на поголовье племенных заводов и репродукторов Ленинградской области, в том числе для обучения и привлечения внимания специалистов зоотехнической службы.
3. Результаты научной работы по изучению молекулярно-генетического разнообразия предлагается использовать при создании общероссийской референтной популяции молочного скота.

ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

Проведенные исследования показывают возможность и целесообразность расширения референтной популяции с помощью коров в условиях Российской Федерации. Для увеличения достоверности геномного прогноза племенной ценности молочного скота важно постепенное накопление генотипов быков имеющих достоверную оценку по качеству потомства.

В дальнейшем необходимо провести исследования по включению признаков воспроизводства и здоровья в геномную оценку крупного рогатого скота. Для признаков молочной продуктивности, целесообразно заменить продуктивность за 305 дней лактации, данными о контрольных дойках (Тест Дей Модель). В рамках племенного молочного скотоводства Российской Федерации разработать национальную систему подготовки фенотипической информации, сбора биологического материала, генотипирования и геномной оценки крупного рогатого скота.

Список опубликованных работ по теме диссертации

Публикации в рецензируемых изданиях входящих в международную базу данных Сеть Науки (Web of Science):

1. **Kudinov, A.A.** Developing a genetic evaluation system for milk traits in Russian black and white dairy cattle / **A.A. Kudinov**, J. Juga, E.A. Mäntysaari, I. Strandén, E.I. Saksa, M.G. Smaragdov, P. Uimari // Agricultural and Food Science. –2018. –Vol. 27. –P. 85–95.
2. **Kudinov, A.A.** The Assessing the genetic differentiation of Holstein cattle herds in the Leningrad region using Fst statistics / M.G. Smaragdov, **A.A. Kudinov**, P. Uimari // Agricultural and Food Science. –2018. –Vol. 27 –P. 96–101.
3. **Kudinov, A.A.** Population structure and Holstein ancestry analysis of modern Russian Black and White cattle for accurate genetic evaluation in Leningrad region. / **A.A. Kudinov**, A.I. Mishina and M.G. Smaragdov // Journal of Animal Science. –2018. – Vol. 96. № S3.

Публикации в рецензируемых изданиях, рекомендованных ВАК Минобрнауки России:

1. **Кудинов, А.А.** Полногеномный анализ межстадной Fst-гетерогенности голштинизированного скота. / М.Г.Смарагдов, Е.И. Сакса, **А.А. Кудинов**, Н.В. Дементьева, О.В. Митрофанова, К.В. Племяшов // Генетика. – 2016. – №52(2). – С.1-8.
2. **Кудинов, А.А.** Использование метода BLUP Animal Model в определении племенной ценности голштинизированного скота ленинградской области. / К.В. Племяшов, В.В. Лабинов, Е.И. Сакса, М.Г. Смарагдов, **А.А. Кудинов**, А.В. Петрова // Молочное и мясное скотоводство. – 2016. – №1. – С.2-5.
3. **Кудинов, А.А.** Генетический прогресс ключевой аспект совершенствования молочного животноводства развитых стран. / **А.А. Кудинов**, Е.С. Масленникова, К.В. Племяшов // Зоотехния. – 2019. – №1. – С. 2-6.

Статьи в других изданиях:

1. **Кудинов, А.А.** Геномная селекция – стратегия будущего. / **А.А. Кудинов**, К.В. Племяшов // Материалы XII Всеукраинской научной конференции молодых ученых и аспирантов посвященной памяти академика УААН Валерия Петровича Бурката. Институт разведения и генетики животных УААН; под ред. М.В. Гладий.- Чубинское. – 2014. –С. 39–40.
2. **Кудинов, А.А.** Прикладные геномные технологии в SNP-генотипировании животных. / **А.А. Кудинов**, М.В. Белов // Теоретические и прикладные аспекты современной науки: сборник научных трудов по материалам VII Международной научно-практической конференции 31 января 2015г.: в 10 ч. /Под. общ. ред. М.Г. Петровой. – Белгород : ИП Петрова М.Г. –2015. – Часть I. – С. 88-90.
3. **Кудинов, А.А.** Комплексный анализ молекулярно - генетической гетерогенности популяции голштинизированного черно - пестрого скота Ленинградской об-

ласти с помощью полногеномного генотипирования. / **А.А. Кудинов**, С.И. Лоскутов, М.Г. Смарагдов, К.В. Племяшов, Н.В. Дементьева, О.В. Митрофанова, М.В. Белов // Биотехнология и качество жизни: материалы Международной научно-практической конференции 2015 г.; М.: ЗАО «Экспо-биохим-технологии», РХТУ им. Д.И. Менделеева. –2015 – С. 15-16.

4. **Kudinov, A.A.** Implementation of BLUP for breeding value estimation in Russian Federation / **A.A. Kudinov**, J. Juga, P.Uimari, E.A.Mantysaari, I.Stranden, K.V.Plemyashov, E.I.Saksa and M.G. Smaragdov, // Book of Abstracts of the 67th Annual Meeting of the European Federation of Animal Science, Belfast, UK, №22, P.610

5. **Kudinov, A.A.** Upgrading Dairy Cattle Evaluation System in Russian Federation / **A.A. Kudinov** , J. Juga, P.Uimari, E.A. Mantysaari, I.Stranden, K.V. Plemyashov, E.I. Saksa and M.G. Smaragdov // Interbull Bulletin №51. – 2017. P. 67-74