

УДК 575.174.015.3: 636.082.13

СОЗДАНИЕ ПАНЕЛИ ДНК ПОРОД КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА РОССИИ ДЛЯ ГЕНОМНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

© 2014 г. Н.С. Юдин^{1,2,3}, Л.А. Васильева¹, В.А. Белявская⁴,
Р.Б. Айтназаров¹, П.Н. Смирнов⁵, М. Хитон⁶, У. Легрейд⁷,
Г.В. Орлова¹, А.Г. Ромащенко¹, М.И. Воевода^{1,2,3}

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия, e-mail: yudin@bionet.nsc.ru;

² Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научно-исследовательский институт терапии» Сибирского отделения Российской академии медицинских наук, Новосибирск, Россия;

³ Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Новосибирск, Россия;

⁴ Федеральное бюджетное учреждение науки «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Новосибирск, Россия;

⁵ Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Новосибирский государственный аграрный университет», Новосибирск, Россия;

⁶ Meat Animal Research Center, United States Department of Agriculture, Clay Center, USA;

⁷ Wyoming State Veterinary Laboratory, Department of Veterinary Sciences, University of Wyoming, Laramie, USA

Поступила в редакцию 1 июля 2014 г. Принята к публикации 11 августа 2014 г.

Создана панель из 96 образцов ДНК, характеризующая генетическое разнообразие пород крупного рогатого скота России. Панель включает по 4–8 животных от 11 молочных и 6 молочно-мясных и мясных пород. Основным критерием при включении животных в панель было наличие у них, по данным родословных, наибольшего числа неродственных гаплоидных геномов. В результате по количеству неродственных гаплоидных геномов (186,1) и минимальной популяционной частоте аллеля, необходимой для его выявления в панели с вероятностью $p > 0,95$ (0,016), собранная панель не уступает созданной в США панели MARC Beef Cattle Diversity Panel version 2.1. Анализ трех SNP у коров галловейской, герфордской, серой украинской и черно-пестрой пород показал отсутствие достоверных различий между частотами аллелей у животных в панели и в популяциях. Таким образом, собранная панель ДНК может быть использована для выбора SNPs при генетическом анализе хозяйственно важных признаков, для выявления чистопородных и гибридных животных, а также, вероятно, для предварительной оценки частот аллелей в популяциях.

Ключевые слова: крупный рогатый скот, порода, *Bos taurus*, панель ДНК, генетическое разнообразие, природоохранная генетика, SNPs, ген *TNFalpha*, ген *SDF1*.

ВВЕДЕНИЕ

Секвенирование ряда полных геномов крупного рогатого скота выявило наличие у них значительного числа ДНК-маркеров, в

том числе однонуклеотидных полиморфизмов (SNPs) (Bovine HarMap Consortium, 2009). В базе данных dbSNP Национального центра биотехнологической информации США в настоящий момент их число составляет 73439641

(dbSNP, 2014). В 2007 г. компания «Illumina» начала продажу чипа **BovineSNP50 Genotyping BeadChip** для генотипирования 54 609 равномерно распределенных по геному SNPs, что возвестило начало новой эры геномной селекции в племенном животноводстве (Matukumalli *et al.*, 2009). Однако полногеномные ассоциативные исследования на людях показали, что количественные признаки в значительной степени контролируются множеством редких аллелей с очень малыми индивидуальными эффектами (Gibson, 2012). Это предполагает необходимость расширения поиска новых SNPs в геноме крупного рогатого скота для повышения эффективности геномной селекции и выявления мутаций, непосредственно влияющих на количественные признаки (Hayes *et al.*, 2009).

Для этой цели в США была создана панель ДНК, характеризующая генетическое разнообразие мясных пород скота (MARC Beef Cattle Diversity Panel version 2.1, MBCDP2.1) (Heaton *et al.*, 2001). В панель были включены чистопородные животные с минимальным родством между предками, что позволило усилить статистическую мощность анализа полиморфизма ДНК. Она состоит из образцов ДНК от 92 быков 16 распространенных мясных пород и 4 быков молочной голштинской породы. Панель MBCDP2.1 была использована для выявления новых SNPs в гене *PRNP* (Heaton *et al.*, 2003), анализа структуры гаплотипов в гене *IL8* (Heaton *et al.*, 2001), при разработке набора SNPs для анализа отцовства (Heaton *et al.*, 2002) и идентификации отдельных животных при забое (Heaton *et al.*, 2005).

Интенсивное внедрение технологий искусственного осеменения животных привело к заметному сокращению генетического разнообразия в генофондах популяций крупного рогатого скота России и ухудшению перспектив создания новых пород (Алтухов и др., 2004). Введение в практику животноводства высокопроизводительных методов анализа структуры ДНК позволило бы на молекулярном уровне оценить генетическое своеобразие уникальных отечественных пород крупного рогатого скота и использовать эту информацию для повышения эффективности геномной селекции (Hayes *et al.*, 2009).

В работе представлены результаты создания панели образцов ДНК, характеризующей генетическое разнообразие большого числа пород

крупного рогатого скота России. Для создания панели использовали методологию, разработанную при создании панели MBCDP2.1 (Heaton *et al.*, 2001).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Образцы крови (коровы) и спермы (быки) были получены из племенных хозяйств Новосибирской и Московской областей, Алтайского края и Республики Алтай (табл. 1). Животных с минимальным количеством родственных связей идентифицировали преимущественно с использованием родословных на глубину 2–4 поколения. Число неродственных гаплоидных геномов вычисляли по общим предкам в родословной. Если два животных имели общего отца (мать), то предполагалось, что они имеют 3 (из 4 возможных) неродственных гаплоидных генома. Если два животных имели общего деда (бабку), то предполагалось, что они имеют 7 (из 8 возможных) неродственных гаплоидных геномов и т. д. в ряду поколений. Если родословная отсутствовала (галловейская и серая украинская породы), то предполагалось, что все гаплоидные геномы являются неродственными. При расчетах число неродственных гаплоидных геномов суммировали по всем породам, поскольку считали, что существует пренебрежимо малое число родственных гаплоидных геномов между чистопородными животными, принадлежащими к разным породам. Минимальную популяционную частоту аллеля, необходимую для его выявления в панели с вероятностью $p > 0,95$, вычисляли по методу М. Heaton с соавт. (2001). Вероятность наблюдать аллель хотя бы один раз в группе животных составляет $1 - (1 - p)^n$, где p – частота аллеля, n – число неродственных гаплоидных геномов. Преобразование уравнения $0,95 = 1 - (1 - p)^n$ дает $p = 1 - (0,05)^{1/n}$.

ДНК выделяли стандартным методом обработки протеиназой и экстракцией фенолом. Фрагмент промотора гена *TNFalpha* амплифицировали с использованием праймеров 5'-CCGAGAAATGGGACAACCT-3' и 5'-GCCATGTATCCCCAAAGAAT-3'. Ампликон обрабатывали рестриктазой EcoICR I и анализировали электрофорезом на наличие однонуклеотидного полиморфизма –824A/G (Konnai *et al.*, 2006). Два SNP, 99C/G и 128T/C, во втором

Таблица 1

Состав панели ДНК пород крупного рогатого скота России

Порода	Численность, тыс. голов	Число животных в панели	Число неродственных гаплоидных геномов	Минимальная частота аллеля, необходимая для его выявления в панели с вероятностью $p > 0,95$	Хозяйство	Пол
Чернопестрая	938,40 ^а	8	15,5*	0,18	ОПХ	♀
Голштинская	61,60 ^а	8	15,3	0,18	ФГУП	♂
Айширская	51,70 ^а	6	11,4	0,23	ГППЗ	♀
Костромская	8,90 ^а	6	11,6	0,23	ФГУП	♂
Холмогорская	156,50 ^а	6	11,1	0,24	ФГУП	♂
Джерсейская	0,81 ^В	5	9,9	0,26	ФГУП	♂
Швицкая	30,40 ^а	5	9,9	0,26	ФГУП	♂
Красная степная	80,40 ^а	5	9,9*	0,26	СПК	♀
Английская	0,19 ^В	5	9,4	0,27	ОАО	♂
Красная горбатовская	2,95 ^В	4	7,9	0,32	ФГУП	♂
Красная датская	0,04 ^В	4	7,9	0,32	ОАО	♂
Симментальская	163,30 ^а	8	15,5*	0,18	АО	♀
Казахская белоголовая	22,28 ^б	6	11,4	0,23	ПИ	♀
Лимузинская	1,62 ^б	6	11,4	0,23	ОАО	♂
Галловейская	1,36 ^б	5	10**	0,26	ЭХ	♀
Серая украинская	0,09 ^В	5	10**	0,26	ЭХ	♀
Герфордская	39,79 ^б	4	8*	0,31	ЗАО	♀
Всего	1560,33	96	186,1	0,016		

Примечание. Численность пород в Российской Федерации приведена по состоянию на ^а 2009 г. (Сивкин и др., 2011); ^б 2006 г. (Агросервер, 2014) и ^В 2001 г. (Алтухов и др., 2004). Обозначения: ОПХ – ОПХ «Кремлевское», Новосибирская область; ФГУП – ФГУП «Центральная станция осеменения сельскохозяйственных», п. Быково, Московская область; АО – АО «Дзержинский», Новосибирская область; ГППЗ – ГППЗ «Овцевод», Алтайский край; СПК – СПК «ПЗ колхоз им. Кирова», Алтайский край; ОАО – ОАО «Барнаульское племпредприятие», г. Барнаул, Алтайский край; ПИ – СПК «Память Ильича», Алтайский край; ЭХ – Экспериментальное хозяйство СО РАН, Республика Алтай; ЗАО – ЗАО «Племенное хозяйство «Герфорд»», Новосибирская область. * Животные, родословные которых включают только одно поколение; ** животные без родословных.

интроне гена *SDFI* анализировали методом секвенирования по Сэнгеру (Юдин и др., 2011).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Собранная панель ДНК в количестве 96 образцов была адаптирована для работы со стандартными 96-луночными планшетами. Образцы ДНК выделяли фенольным методом, что обеспечивает их многолетнюю сохранность. Панель содержит ДНК от 62 животных 11 молочных пород и от 34 животных 6 мясных и молочно-мясных пород (табл. 1). Материал собирали в течение 2000–2006 гг. В панель вошли 17 из 46 пород крупного рогатого скота, зарегистриро-

ванных в 1990 г. на территории России, которые на тот момент составляли более 90 % поголовья (Алтухов и др., 2004). К 2001 г. только 11 пород в панели имели эффективную численность, достаточную для нормального воспроизводства, остальные находились либо в критическом состоянии, либо исчезли. В настоящее время ситуация еще более усугубилась. К тому же многочисленные программы, направленные на «улучшение» продуктивности российских пород, привели к тому, что от 10 до 95 % общей численности поголовья составляют помесные животные (Алтухов и др., 2004). Собранная панель может быть использована для выявления чистопородных и гибридных животных, а также

для усовершенствования генофонда породы на основе породоспецифических ДНК-маркеров (Столповский и др., 2009).

Поскольку многие чистопородные животные являются родственниками, размер выборки крупного рогатого скота часто не отражает реального генетического разнообразия породы из-за включения большого числа родственных гаплоидных геномов. Поэтому при создании панели основные усилия были направлены на включение как можно большего числа неродственных гаплоидных геномов. В результате по количеству неродственных гаплоидных геномов (186,1) и минимальной популяционной частоте аллеля, необходимой для его выявления в панели с вероятностью $p > 0,95$ (0,016), созданная нами панель не уступает панели MBCDP2.1 (количество неродственных геномов – 187,1, минимальная частота выявляемого аллеля – 0,016) (Heaton *et al.*, 2001).

Число животных каждой породы в панели (от 4 до 8) зависело от вклада породы в общую численность скота в России, а также от ее природоохранного статуса в России. Хотя панель ДНК предназначена главным образом для изучения спектра аллельного разнообразия в популяциях, можно предположить, что эта панель также может обеспечить предварительную оценку частот аллелей и генотипов для стад чистопородного скота в отдельных хозяйствах, как это было показано для панели MBCDP2.1 (Heaton *et al.*, 2001). Эта гипотеза была проверена при анализе частот аллелей трех SNP в генах *TNFalpha* и *SDF1* в популяциях животных четырех пород и сравнении этих частот у животных в панели ДНК (табл. 2–4).

Анализ показал отсутствие статистически значимых различий между частотами аллелей в панели и в расширенных популяционных

Таблица 2

Частота генотипов и аллелей SNP -824A/G в промоторе гена *TNFalpha* в панели ДНК и популяционных выборках крупного рогатого скота

Порода	Число животных	Хозяйство	Частота					Сравнение частот аллелей в панели и в популяции
			Генотип			Аллель		
			A/A	A/G	G/G	A	G	
Герефордская (панель)	4	ЗАО	0,25	0,50	0,25	0,50	0,50	$\chi^2 = 0,12$
Герефордская (популяция)	98	ЗАО	0,16	0,56	0,28	0,44	0,56	$p = 0,73$
Серая украинская (панель)	5	ЭХ	0,40	0,20	0,40	0,50	0,50	$\chi^2 = 0,02$
Серая украинская (популяция)	43	ЭХ	0,30	0,44	0,26	0,52	0,48	$p = 0,89$
Черно-пестрая (панель)	8	ОПХ	0,37	0,38	0,25	0,56	0,44	$\chi^2 = 1,22$
Черно-пестрая (популяция)	107	ГУСП	0,21	0,43	0,36	0,42	0,58	$p = 0,27$

Примечание. Обозначения хозяйств: ГУСП – ГУСП ОПХ «Элитное» СибНИИРС СО РАСХН, Новосибирская область; остальные обозначения см. в табл. 1.

Таблица 3

Частота генотипов и аллелей SNP 99C/G во втором интроне гена *SDF1* в панели ДНК и популяционных выборках крупного рогатого скота

Порода	Число животных	Хозяйство	Частота					Сравнение частот аллелей в панели и в популяции
			Генотип			Аллель		
			C/C	C/G	G/G	C	G	
Галловейская (панель)	5	ЭХ	0,00	0,40	0,60	0,20	0,80	$\chi^2 = 1,74$
Галловейская (популяция)	31	ЭХ	0,32	0,19	0,49	0,42	0,58	$p = 0,19$
Черно-пестрая (панель)	8	ОПХ	0,25	0,50	0,25	0,50	0,50	$\chi^2 = 0,02$
Черно-пестрая (популяция)	81	ОПХ	0,36	0,33	0,31	0,52	0,48	$p = 0,89$

Примечание. Обозначения хозяйств см. в табл. 1.

Таблица 4

Частота генотипов и аллелей SNP 128T/C во втором интроне гена *SDF1* в панели ДНК и популяционных выборках крупного рогатого скота

Порода	Число животных	Хозяйство	Частота					Сравнение частот аллелей в панели и в популяции
			Генотип			Аллель		
			T/T	T/C	C/C	T	C	
Галловейская (панель)	5	ЭХ	1,00	0,00	0,00	1,00	0,00	$\chi^2 = 0,16$
Галловейская (популяция)	31	ЭХ	0,97	0,03	0,00	0,98	0,02	$p = 0,69$
Черно-пестрая (панель)	8	ОПХ	1,00	0,00	0,00	1,00	0,00	$\chi^2 = 0,00$
Черно-пестрая (популяция)	81	ОПХ	1,00	0,00	0,00	1,00	0,00	$p = 1,00$

Примечание. Обозначения хозяйств см. в табл. 1.

выборках для всех исследованных SNP. Этот результат может свидетельствовать о вероятной репрезентативности собранной панели ДНК. По нашему мнению, панель может быть полезной при предварительной селекции SNP маркеров для генетического анализа хозяйственно важных признаков у разводимых в России пород крупного рогатого скота и для проведения геномной селекции. Образцы ДНК панели могут быть использованы при разработке простых генетических тестов для массового генотипирования SNPs.

Таким образом, нами впервые в России была создана панель ДНК, которая отражает генетическое разнообразие отечественных пород крупного рогатого скота и может быть использована для крупномасштабных проектов по изучению генетического полиморфизма. Панель доступна по запросу для всех заинтересованных организаций.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Минобрнауки России, гранта МНТЦ № 1883 и РФФИ (научный проект № 13-04-00968-а).

ЛИТЕРАТУРА

- Агросервер. Мясные породы КРС. 2014. <http://www.agroserver.ru/articles/178.htm>.
- Алтухов Ю.П., Салменкова Е.А., Курбатова О.Л. и др. Динамика популяционных генофондов при антропогенных воздействиях. М.: Наука, 2004. 620 с.
- Сивкин Н.В., Стрекозов Н.И., Чинаров В.И. Молочные породы крупного рогатого скота: племенные ресурсы // Молочн. пром-сть. 2011. № 6. С. 62–64.
- Стопловский Ю.А., Ахани Азари М., Кол Н.В. и др. Дифференциация генофонда пород крупного рогатого скота по ISSR-PCR-маркерам // Изв. ТСХА. 2009. № 3. С. 89–97.
- Юдин Н.С., Нефедова М.В., Кобзев В.Ф. и др. Полиморфизм второго интрона гена *SDF1* у галловейской, герфордской и черно-пестрой пород крупного рогатого скота // Генетика. 2011. Т. 47. № 2. С. 279–283.
- Bovine NapMap Consortium, Gibbs R.A., Taylor J.F. *et al.* Genome-wide survey of SNP variation uncovers the genetic structure of cattle breeds // Science. 2009. V. 324. No. 5926. P. 528–532.
- Database of Single Nucleotide Polymorphisms (dbSNP). Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information, National Library of Medicine. 2014. available at <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/>
- Gibson G. Rare and common variants: twenty arguments // Nat. Rev. Genet. 2012. V. 13. No. 2. P. 135–145.
- Hayes B.J., Bowman P.J., Chamberlain A.J., Goddard M.E. Invited review: Genomic selection in dairy cattle: progress and challenges // J. Dairy Sci. 2009. V. 92. No. 2. P. 433–443.
- Heaton M.P., Chitko-McKown C.G., Grosse W.M. *et al.* Interleukin-8 haplotype structure from nucleotide sequence variation in commercial populations of U.S. beef cattle // Mamm. Genome. 2001. V. 12. No. 3. P. 219–226.
- Heaton M.P., Harhay G.P., Bennett G.L. *et al.* Selection and use of SNP markers for animal identification and paternity analysis in U.S. beef cattle // Mamm. Genome. 2002. V. 13. No. 5. P. 272–281.
- Heaton M.P., Leymaster K.A., Freking B.A. *et al.* Prion gene sequence variation within diverse groups of U.S. sheep, beef cattle, and deer // Mamm. Genome. 2003. V. 14. No. 11. P. 765–777.
- Heaton M.P., Keen J.E., Clawson M.L. *et al.* Use of bovine single nucleotide polymorphism markers to verify sample tracking in beef processing // J. Am. Vet. Med. Assoc. 2005. V. 226. No. 8. P. 1311–1314.
- Konnai S., Usui T., Ikeda M. *et al.* Tumor necrosis factor-alpha genetic polymorphism may contribute to progression of bovine leukemia virus-infection // Microbes Infect. 2006. V. 8. No. 8. P. 2163–2171.
- Matukumalli L.K., Lawley C.T., Schnabel R.D. *et al.* Development and characterization of a high density SNP genotyping assay for cattle // PLoS One. 2009. V. 4. No. 4. P. e5350.

DNA PANEL DESIGN FOR GENOMIC STUDIES IN RUSSIAN CATTLE BREEDS

N.S. Yudin^{1,2,3}, L.A. Vasil'eva¹, V.A. Belyavskaya⁴, R.B. Aitnazarov¹, P.N. Smirnov⁵,
M. Heaton⁶, W.W. Laegreid⁷, G.V. Orlova¹, A.G. Romashchenko¹, M.I. Voevoda^{1,2,3}

¹ Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia,
e-mail: yudin@bionet.nsc.ru;

² Institute of Internal Medicine, Novosibirsk, Russia;

³ Novosibirsk National Research State University, Novosibirsk, Russia;

⁴ State Research Center of Virology and Biotechnology VECTOR, Novosibirsk, Russia;

⁵ Novosibirsk State Agricultural University, Novosibirsk, Russia;

⁶ Meat Animal Research Center, United States Department of Agriculture, Clay Center, USA;

⁷ Wyoming State Veterinary Laboratory, Department of Veterinary Sciences,
University of Wyoming, Laramie, USA

Summary

A panel of 96 DNA samples that reflects the breadth of genetic diversity in popular Russian cattle breeds has been designed. The panel of cattle DNA contains 11 dairy breeds and 6 beef and beef-dairy breeds. The numbers of animals in each breed group vary from 4 to 8. The main criterion for selection of individual animals within each breed is to maximize the total number of unshared haploid genomes according to pedigree data. The resulting panel is equivalent to USDA MARC Beef Cattle Diversity Panel version 2.1 in the power of SNP identification (number of unshared haploid genomes = 186,1, minimum allele frequency required for its detection with 95 % probability – 1,6 %). Analysis of three SNPs shows an insignificant difference between the allele frequencies in Galloway, Hereford, Grey Ukrainian, and Black Pied herds and those in the panel. Thus, the diversity panel may be useful for identification of genetic markers associated with economically important traits in cattle, evaluation of purebred and crossbred animals, and, probably, for tentative estimation of allele frequencies in commercial populations.

Key words: cattle, breed, *Bos taurus*, DNA panel, genetic diversity, conservation genetics, SNPs, *TNF-alpha* gene, *SDF1* gene.