

Применение репродуктивных технологий для повышения эффективности геномной селекции молочного крупного рогатого скота

Н.С. Юдин^{1, 2, 3}, К.И. Лукьянов¹, М.И. Воевода^{1, 2, 3}, Н.А. Колчанов¹

¹ Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», Новосибирск, Россия

² Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт терапии и профилактической медицины», Новосибирск, Россия

³ Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Новосибирский национальный исследовательский государственный университет», Новосибирск, Россия

Геномная селекция – отбор, при котором племенная ценность животного предсказывается по маркерам, равномерно покрывающим весь геном. В работе обобщены сведения о некоторых современных тенденциях в области геномной селекции молочного крупного рогатого скота, а также о применении репродуктивных технологий для повышения эффективности отбора. Основные тенденции в развитии метода геномной селекции заключаются в повышении точности племенных оценок путем объединения референсных популяций; включении в селекционные программы генотипирования коров; предсказании генотипов отсутствующих SNP на основе чипов с более низкой плотностью маркеров и предсказании генотипов животных по генотипам родственников. В сочетании с современными репродуктивными биотехнологиями (сексирование семени, множественная овуляция и пересадка эмбрионов, трансвагинальная аспирация ооцитов с последующим экстракорпоральным оплодотворением, генотипирование эмбрионов, клонирование лучших животных-производителей и т.д.) отбор по геному потенциально способен давать еще большую экономическую выгоду. При геномной селекции молочного скота биотехнологические манипуляции с половыми клетками и эмбрионами делают возможным улучшение множества факторов, от которых зависит эффективность отбора: его интенсивности, надежности племенной оценки и интервала между поколениями. Разработаны успешные подходы для генотипирования эмбрионов по большому числу маркеров после биопсии на стадии морулы или бластоцисты, основанные на увеличении количества ДНК эмбриона путем предварительной полногеномной амплификации. В перспективе это позволит разработать новые подходы для снижения интервала между поколениями, селекции элитных маток, снижения степени инбридинга и т.д.

Ключевые слова: крупный рогатый скот; *Bos taurus*; геномная селекция; репродуктивная технология; признаки продуктивности; молочное животноводство; племенная оценка; бык-производитель; пересадка эмбриона; суперовуляция.

Application of reproductive technologies to the improvement of dairy cattle genomic selection

N.S. Yudin^{1, 2, 3}, K.I. Lukyanov¹, M.I. Voevoda^{1, 2, 3}, N.A. Kolchanov¹

¹ Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia

² Institute of Internal and Preventive Medicine, SB RAMS, Novosibirsk, Russia

³ Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

Genomic selection is a direction of breeding in which the value of an animal is predicted from DNA markers evenly covering the entire genome. This review summarizes information on modern trends in the genomic selection of dairy cattle and on application of reproductive technologies to the improvement of breeding process. The main trends in the development of genomic selection include improvement of the accuracy of breeding value estimations by combination of reference populations; use genotyping of cows in breeding programs; imputation of genotypes for absent SNPs with low marker density microarrays, and prediction of animal genotypes from the genotypes of relatives. Genomic selection can be even more profitable in combination with up-to-date reproductive biotechnologies: semen sexing, multiple ovulation and embryo transfer, ovum pick-up followed by in vitro fertilization, embryo genotyping, cloning of best breeders, etc. In programs of dairy cattle genomic selection, biotechnological procedures with gametes and embryos allow improvement of a variety of parameters determining breeding efficacy: selection intensity, accurate breeding value assessment, and generation interval. Successful methods for embryo genotyping for numerous markers after biopsy at the morula or blastocyst stage are based on whole genome amplification of embryo DNA. Eventually, these achievements will provide grounds for new

approaches to the reduction of generation interval, selection of elite cows, reduction of inbreeding rate, etc.

Key words: cattle; *Bos taurus*; genomic selection; reproductive technology; production traits; dairy husbandry; breeding value; breeding bull; embryo transfer; superovulation.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ?

Юдин Н.С., Лукьянов К.И., Воевода М.И., Колчанов Н.А. Применение репродуктивных технологий для повышения эффективности геномной селекции молочного крупного рогатого скота. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2015;19(3):277-285. DOI 10.18699/VJ15.035

HOW TO CITE THIS ARTICLE?

Yudin N.S., Lukyanov K.I., Voevoda M.I., Kolchanov N.A. Application of reproductive technologies to the improvement of dairy cattle genomic selection. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii – Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2015;19(3):277-285. DOI 10.18699/VJ15.035

Достижения в генетическом анализе и методах картирования генов количественных признаков в XX веке позволили в начале нынешнего столетия разработать и успешно реализовать, в особенности на крупном рогатом скоте молочного направления, метод геномной селекции (Смарагдов, 2013; Bouquet, Juga, 2013; Meuwissen et al., 2013; Haskell et al., 2014; Pryce et al., 2014).

Геномная селекция – это форма отбора, при котором племенная ценность предсказывается по маркерам, охватывающим весь геном. С этой целью производится генотипирование особи по десяткам тысяч однонуклеотидных полиморфных маркеров (Single Nucleotide Polymorphism, SNP), равномерно покрывающих все хромосомы. Первый этап геномной оценки животных-производителей состоит в создании контрольной референсной популяции, которая позволяет проанализировать связь между генотипами SNP и признаками. В молочном скотоводстве, как правило, эту калибровочную выборку формируют из генотипированных быков данной породы, имеющие оценки по потомству. Затем устанавливается статистическая зависимость между генотипами SNP и величиной признаков у потомства. Геномная оценка племенной ценности (Genomic Estimated Breeding Value, GEBV) вычисляется как сумма эффектов всех SNP-маркеров, которые распределены по геному примерно на одинаковом расстоянии. При высокой плотности SNP-маркеров большинство локусов количественных признаков (Quantitative Trait Loci, QTL) потенциально будут находиться в неравновесии по сцеплению с фланкирующими их генетическими маркерами.

Эффекты SNP-маркеров, выявленные в референсной популяции, можно использовать в течение нескольких поколений для достаточно точного предсказания геномных племенных оценок у молодых бычков, исходя только из результатов их генотипирования. По сравнению с традиционными методами селекции, основанными на оценке фенотипа и родословной животного, геномная селекция позволяет, во-первых, более эффективно отбирать животных по признакам, которые имеют низкую наследуемость, во-вторых, оценить большее число кандидатов для селекции и, в-третьих, повысить интенсивность селекции за счет сокращения интервала между поколениями. В настоящее время доля быков, которые продаются только на основании GEBV, без традиционного тестирования по потомству, в разных странах мира составляет от 25 до 50 % (Pryce, Daetwyler, 2012).

В последние два десятилетия для ограничения числа пересаживаемых эмбрионов племенные компании ис-

пользуют технологию биопсии эмбрионов с последующим определением пола методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) (Hasler, 2014). При использовании геномной селекции потенциальное преимущество объединения производства эмбрионов с их генотипированием становится еще выше. Современные репродуктивные технологии могут быть использованы как для повышения числа селекционных кандидатов, так и для сокращения интервала между поколениями.

К числу таких технологий, в первую очередь, относятся множественная овуляция и пересадка эмбрионов (Multiple Ovulation and Embryo Transfer, MOET), а также трансвагинальная аспирация ооцитов (Ovum Pick-Up, OPU) с последующим производством эмбрионов (In Vitro Production, IVP), которое включает экстракорпоральное оплодотворение (In Vitro Fertilization, IVF). Значительные надежды также возлагают на клонирование отдельных выдающихся животных-производителей с помощью пересадки ядер соматических клеток (Somatic Cell Nuclear Transfer, SCNT). Одна из основных проблем использования репродуктивных технологий при геномной селекции заключается в необходимости генотипирования большого числа SNP-маркеров в наименьшем числе клеток, полученных при биопсии эмбриона на доимплантационной стадии.

В обзоре обобщены сведения о некоторых современных тенденциях в области геномной селекции молочного скота, а также о применении репродуктивных технологий для повышения эффективности селекционного процесса.

Современные тенденции в геномной селекции молочного крупного рогатого скота

Повышение точности геномных племенных оценок путем объединения референсных популяций. Точность геномных племенных оценок зависит от степени неравновесия по сцеплению (linkage disequilibrium, LD) между маркерами и QTL, а также от размера референсной популяции. Поэтому геномная селекция наиболее эффективна для распространенных в мире пород, таких как голштинская. При этом повышение точности геномных оценок зависит от числа индивидов, добавленных к контрольной популяции; надежности их фенотипирования, а также их родственных отношений (Lund et al., 2011). Например, объединение голштинских референсных популяций по 4 тыс. быков каждая, из четырех основных европейских племенных компаний (UNCEIA, VikingGenetics, German Holstein Association и CRV Holding BV) повысило надеж-

ность геномных предсказаний в среднем на 10 % по сравнению с результатами, полученными при использовании только национальных референсных популяций (Lund et al., 2011). Для разных признаков и компаний выигрыш составил от 2 до 19 %. Увеличение размера контрольной выборки посредством объединения нескольких близкородственных популяций одной породы особенно важно для признаков с низкой наследуемостью.

Как известно, размер референсной популяции ограничен для местных малочисленных пород. Решить эту проблему можно только с помощью объединения животных нескольких пород в одну референсную группу. Такой подход возможен благодаря наличию у разных пород консервативных участков генома с высокой степенью LD, которое поддерживает ассоциацию между QTL и соседним SNP. Специально для анализа таких коротких блоков с высоким LD компания «Illumina» в 2010 г. выпустила биочип с высокой плотностью SNP BovineHD BeadChip, содержащий 777609 SNP (Illumina, 2015a).

Так, для 6 различных признаков повышение корреляции между предсказанными и наблюдаемыми племенными оценками для многопородной референсной популяции, состоявшей из быков нормандской, монбельярдской и голштинской пород, по сравнению с однопородной популяцией, составило от 1,6 до 2,9 % (Hoze et al., 2014). При этом средний выигрыш в точности генотипирования на HD чипе, по сравнению со стандартным 50K чипом, составил 2,2 %. Точность геномных племенных оценок для референсной популяции из четырех пород скандинавского красного скота повышалась для разных признаков молочной продуктивности от 1,3 до 9,3 %, по сравнению с однопородными популяциями (Zhou et al., 2014).

Современные методы вычисления геномных оценок, как правило, предполагают, что смешанная контрольная популяция является гомогенной в отношении QTL, контролирующих данные признаки. Исследования на модели, в которой предполагалось, что животные в этой объединенной популяции могут нести эффекты породоспецифических QTL, показали, что, по сравнению с гомогенной референсной популяцией, такая модель позволяла лишь незначительно повысить точность предсказания признаков молочной продуктивности (Makgahlela et al., 2013a). Эти же авторы отмечают, что учет различий в частоте аллелей между породами при построении матрицы родства по геномным данным не приводит к существенному повышению точности племенных оценок по сравнению с матрицей родства, построенной по родословным (Makgahlela et al., 2013b, 2014).

Таким образом, использование многопородных референсных популяций может улучшить точность оценок при геномной селекции у малочисленных пород, вероятно, благодаря наличию консервативных между породами блоков с высокой степенью LD. Дополнительное преимущество при расчете геномных племенных оценок дает использование информации о генотипах и фенотипах коров.

Генотипирование коров. Теоретическая оценка потенциальной выгоды от включения коров в программу геномной селекции показывает, что использование фенотипов и генотипов коров может вести к трехкратному

повышению генетического прироста по сравнению с традиционной селекцией и снизить интервал между поколениями быков, при этом должен поддерживаться приемлемый уровень инбридинга (Mc Hugh et al., 2011). Исследование математической модели показало, что одновременное применение данных в анализе по быкам и коровам, по сравнению с популяцией, состоявшей только из одних коров, повышало точность предсказания на 2–5 % и 1–2 % для количества жира и белка соответственно (Calus et al., 2013). Вероятно, этот эффект связан с более точной оценкой фенотипов быков в результате тестирования большого числа дочерей.

До настоящего времени геномная селекция успешно применялась в схемах разведения молочного скота по отцовской линии. Одним из наиболее важных достижений последнего времени является применение недорогих чипов для генотипирования SNP с низкой плотностью маркеров при селекции коров для получения молока и племенных коров (Boichard et al., 2012).

Предсказание генотипов отсутствующих SNP на основе чипов с более низкой плотностью маркеров. В настоящее время стандартный чип для геномной селекции крупного рогатого скота, BovineSNP50 Genotyping BeadChip, содержит зонды для анализа 54609 SNP (Illumina, 2015b). Стоимость генотипирования большой референсной популяции может быть снижена путем использования чипов с низкой плотностью SNP и предсказанием генотипов недостающих SNP для повышения числа генетических маркеров на основе предварительного генотипирования на чипах с высокой плотностью небольшой популяции животных. Недорогой чип для анализа SNP с низкой плотностью, Illumina Bovine LD chip, был специально выпущен для предсказания генотипов других SNP, которые чаще покрывают геном крупного рогатого скота (Illumina, 2015c). Чип содержит 6090 SNP, которые имеют высокую частоту редкого аллеля, а также равномерно распределены по геному, за исключением концов хромосом, где число SNP повышено.

На основании информации о генотипах 777962 SNP у 3122 быков, относящихся к 7 породам, с помощью компьютерной программы Beagle была проведена оценка точности предсказания генотипов недостающих SNP (Berry et al., 2014). Предварительно были сформированы выборки животных, для анализа которых использовали чипы с низкой (LD; 6501 SNP), средней (50K; 47770 SNP) и высокой (HD; 735151 SNP) плотностью маркеров. Средняя степень совпадения аллелей для породы при предсказании от LD до HD варьировала от 0,956 до 0,974 и от 0,947 до 0,967 при использовании однопородной или многопородной референсной популяции соответственно. Тот же параметр при предсказании от 50K до HD чипов варьировал от 0,987 до 0,994 и от 0,987 до 0,993, если контрольная выборка состояла из одной и нескольких пород соответственно.

По данным других авторов, при анализе обучающей выборки из 1115 голштинских, 61 гернзейского и 476 айрширских быков степень совпадения аллелей для предсказания генотипов от 50K до HD составляла 0,968–0,995 (Larmer et al., 2014). Исследование 5153 животных от 16 пород показало, что использование многопородной референсной

популяции практически не улучшает точности предсказания от 50К до HD, однако 99 % SNP могут быть точно предсказаны, если более 300 животных данной породы были генотипированы на HD-чипах (Hoze et al., 2013).

Исследование пяти компьютерных методов предсказания (Beagle, IMPUTE2, Findhap, AlphaImpute, FImpute) показало, что наиболее надежны методы Beagle и IMPUTE2 (Ma et al., 2013). При этом точность предсказания от LD до 50К была существенно ниже, чем от 50К до HD. Также было проведено исследование влияния размера референсной популяции и компьютерного метода на точность предсказания SNP в популяциях из 548 и 1289 животных голштинской породы, генотипированных на HD-чипе (Schrooten et al., 2014). Предсказание генотипов SNP проводили с помощью компьютерных программ Beagle и DAGPHASE. Наименьшая ошибка предсказания (0,41 %) была получена при использовании программы Beagle и референсной популяции размером 1289 животных. Некоторые авторы отмечают наличие в геноме областей с пониженной степенью совпадения аллелей после предсказания (Pryce et al., 2014). Одной из возможных причин этого может быть слабое неравновесие по сцеплению между SNP-маркерами в этих районах.

Включение HD-гаплотипов в процедуру получения геномных племенных оценок, предсказанных на основе генотипирования части животных с использованием HD-чипа, повышало их надежность на 1–2 % по сравнению с чипом 50К (Schopen, Schrooten, 2014). Использование геномных племенных оценок быков немецкой симментальской породы на основе предсказанных HD-генотипов вместо реальных 50К-генотипов позволило увеличить точность оценок на 1,5 % (Ertl et al., 2014). В другом исследовании было показано, что, хотя точность предсказания HD генотипов на основе LD генотипов довольно низка, это лишь незначительно снижает конечную точность геномных племенных оценок (Jimenez-Montero et al., 2013).

Предсказание генотипов у негенотипированных животных по генотипам родственников. При геномной селекции предсказание генотипов у животных может помочь включить выдающихся животных-производителей в процедуру расчета племенных оценок, особенно когда известна генетическая информация о родственниках. Теоретические расчеты показывают, что включение информации о генотипах отца и дедов повышает точность предсказания на 13%, а применение информации о генотипе одного, двух и четырех потомков повышает точность на 16, 23 и 35 % соответственно (Vouwman et al., 2014). В другой работе было правильно предсказано 93,5 % генотипов SNP на основе генотипов четырех потомков животного (VanRaden et al., 2013).

Использование репродуктивных технологий при геномной селекции крупного рогатого молочного скота

Скорость генетических изменений в популяции при искусственной селекции зависит от четырех основных факторов (Falconer, Maskey, 1996), классическое уравнение для описания генетического прироста при селекции:

$$\Delta G = (i \cdot r \cdot \sigma_A) / L,$$

где ΔG – ответ на отбор, т.е. разница между средним фенотипическим значением признака у потомков отобранных родителей и всего родительского поколения; i – интенсивность отбора; r – надежность племенной оценки; σ_A – аддитивное генетическое стандартное отклонение интересующего признака и L – интервал между поколениями.

При геномной селекции молочного скота биотехнологические манипуляции с половыми клетками и эмбрионами делают возможным улучшение всех параметров для ускорения генетического прироста (таблица).

По традиционной схеме селекции генетический прирост достигается путем использования искусственного осеменения спермой тестируемых по потомству быков. Поскольку в молочном скотоводстве селекция проводится по признакам, проявляющимся только у коров, тестирование по потомству необходимо для получения группы дочерей, чьи показатели используются для предсказания генетической ценности быков. Однако тестирование по потомству требует много времени (не менее 5 лет) и финансовых затрат на содержание быков и организацию проверки их дочерей. Поэтому при традиционной селекции число отбираемых молодых бычков (селекционных кандидатов) очень невелико.

В ходе геномной селекции резко снижается интервал между поколениями (рисунок). Например, компания «Nordic Cattle Genetic Evaluation» недавно снизила возраст геномного тестирования бычков всех пород до 10 мес (Nordic Cattle Genetic Evaluation ..., 2015). Представлена схема селекции, в основу которой положено геномное тестирование ооцитов, полученных от неполовозрелых телок (так называемая «велогенетика»). Считается, что при использовании такой схемы интервал между поколениями удастся сократить до 3–6 мес (Georges, Massey, 1991).

Поскольку стоимость генотипирования одного животного на стандартном 50К-чипе невелика (около 65 евро), геномная селекция позволяет существенно повысить число селекционных кандидатов, чтобы максимально увеличить шансы получения выдающихся индивидов. Геномная оценка большого числа кандидатов становится критически необходимой, когда животных анализируют по большому числу признаков с низкой наследуемостью (Humboldt et al., 2010).

Другой путь повышения эффективности геномной селекции заключается в генотипировании коров. Таким путем можно идентифицировать элитных коров-производительниц, которых впоследствии можно использовать как доноров для получения эмбрионов *in vitro* и *in vivo* (таблица). Применение сексированного семени, как было показано путем математического моделирования, существенно увеличивает ежегодный эффект селекции (Sorensen et al., 2011). Однако на уровне племенного ядра эффект сексирования оказался низким по сравнению с эмбриональными биотехнологиями. Действительно, использование сексированного семени действует главным образом через повышение числа селекционных кандидатов, приводя к изменению интенсивности селекции. Внедрение эмбриональных биотехнологий (МОЕТ, IVF) позволяет интенсифицировать процесс производства на ограниченном числе избранных элитных коров при

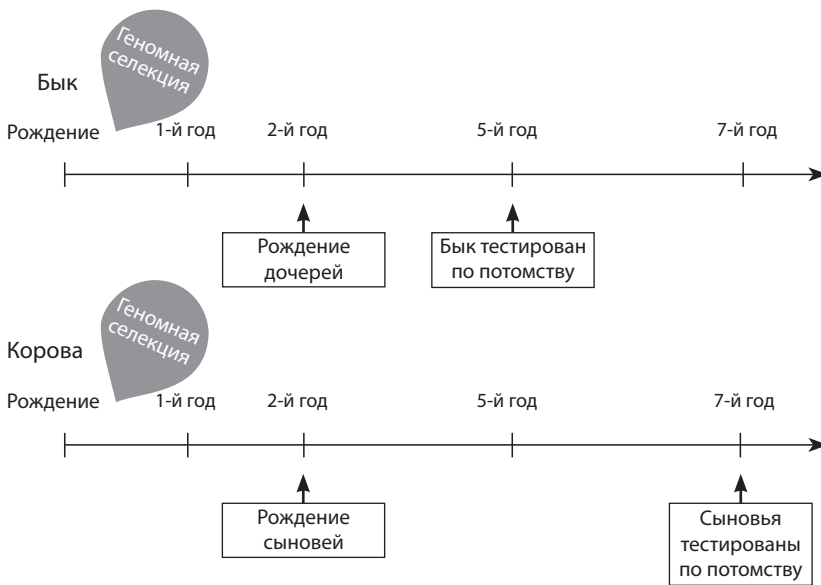
Влияние репродуктивных технологий на эффективность геномной селекции

Технология	Описание	Преимущества	Недостатки
Искусственное осеменение	Искусственное введение спермы в половые пути коровы. Сперму получают заблаговременно от элитных быков. Возможна транспортировка спермы в замороженном виде на большие расстояния	Увеличивается точность за счет фенотипирования родственников. Увеличивается интенсивность за счет снижения числа селекционных кандидатов	Повышается инбридинг за счет интенсивного использования одних и тех же элитных быков
Разделение семени по полу (сексирование)	Разделение сперматозоидов с X- и Y- хромосомой с помощью метода поточной цитометрии	Увеличивается интенсивность за счет контроля пола у потомков	Снижается фертильность спермы из-за применения флюоресцентного красителя
Множественная овуляция и пересадка эмбрионов	Метод получения большого числа потомков от выдающейся коровы <i>in vivo</i> . Включает искусственную стимуляцию коровы к образованию большого числа яйцеклеток (суперовуляцию), природное скрещивание или искусственное осеменение коровы, сбор эмбрионов хирургическим путем либо вымыванием через шейку матки и пересадку эмбрионов реципиентным коровам	Повышается интенсивность за счет использования элитных коров (процедуру можно повторять каждые 6–7 недель)	Повышается инбридинг за счет интенсивного использования одних и тех же маток-производительниц. Увеличение интервала между поколениями при хранении замороженных эмбрионов
Трансвагинальная аспирация ооцитов с последующим экстракорпоральным оплодотворением	Метод получения большого числа потомков от выдающейся коровы <i>in vitro</i> . Включает получение зрелых ооцитов путем трансвагинальной пункции фолликулов под контролем УЗИ, искусственное оплодотворение <i>in vitro</i> и пересадку эмбрионов реципиентным коровам	Повышается интенсивность за счет использования элитных коров (процедуру можно повторять 1–2 раза в неделю). Сокращается интервал между поколениями за счет проведения OPU у молодых препубертатных телок	Повышается инбридинг за счет интенсивного использования одних и тех же маток-производительниц
Клонирование	Искусственное получение генетически идентичных организмов путем переноса ядра соматической клетки в энуклеированную яйцеклетку.	Повышается интенсивность селекции за счет создания множества телят от ограниченного числа маток. Сокращается интервал между поколениями за счет использования эмбриональных стволовых клеток	Повышается инбридинг за счет интенсивного использования выдающихся элитных животных
Генотипирование эмбрионов	Генотипирование нескольких клеток, полученных при биопсии эмбрионов, с последующей пересадкой эмбрионов реципиентным коровам	Повышается интенсивность селекции и снижается инбридинг за счет тестирования большого числа селекционных кандидатов. Сокращается интервал между поколениями. Можно контролировать неаддитивные компоненты генетической изменчивости признака	Высокий процент ошибок при генотипировании менее 5–10 клеток. Необходимость проведения предварительной полногеномной амплификации

повышении интенсивности селекции коров-производительниц (Pedersen et al., 2012). Путем использования повторных процедур IVF число эмбрионов, продуцированных за определенный период времени, может быть увеличено в 2–3 раза по сравнению с технологией МОЕТ (Galli et al., 2014).

Однако МОЕТ может существенно повысить степень инбридинга, главным образом благодаря повторным процедурам получения эмбрионов от ограниченного числа элитных коров. Сокращение интервала между поколениями также может вести к повышению степени

инбридинга (Clark et al., 2013; Boichard et al., 2015). Поэтому применение генотипирования самок может ограничить инбридинг через использование схем скрещивания с учетом геномной информации. При этом родство между животными оценивается по матрице геномного сходства. Таким путем можно избежать моногенных генетических заболеваний, которые выщепляются при скрещивании животных, являющихся носителями патологического аллеля (Nicholas, Hobbs, 2014). Для противодействия повышению инбридинга также может применяться другая стратегия – межпородное скрещивание, повышающее



Сроки оценки животных-производителей при геномной селекции и традиционной оценке по потомству.

как молочную продуктивность, так и репродуктивные показатели животных (Jonas, de Koning, 2015).

Путем математического моделирования схемы геномной селекции, применявшейся в компании «Viking Red», было исследовано влияние числа быков, применявшихся для искусственного осеменения, числа телок, которым делалась процедура МОЕТ, количество процедур МОЕТ на одну телку и числа генотипированных телок на ежегодный генетический прирост (в евро) и степень инбридинга (Bouquet et al., 2015). Показано, что технология МОЕТ существенно увеличивает генетический прирост, не влияя на степень инбридинга, при условии, что размер ядерного стада, в котором проводится эта процедура, и число быков, применяемых для осеменения, достаточно велики. Увеличение числа процедур МОЕТ на одну телку оказывает более значительное влияние на генетический прирост, чем повышение числа телок, которым делалась эта процедура, однако при этом также возрастает степень инбридинга.

Биопсия эмбрионов – как сохранить их жизнеспособность?

Узким местом процедуры биопсии является необходимость достижения баланса между удалением наименьшего числа бластомеров для сохранения жизнеспособности эмбриона и получением достаточного для анализа количества ДНК. Проведение биопсии эмбрионов требует высококвалифицированного персонала и наличия дорогостоящего оборудования (например, снабженный микроманипуляторами инвертированный микроскоп). В зависимости от стадии развития эмбриона могут быть использованы три метода: биопсия с применением микроскальпеля, аспирационная биопсия и биопсия иглой. Биопсия иглой считается наиболее практичной и дает высокую частоту наступления беременности в условиях животноводческих ферм (Senariu et al., 2012).

При проведении биопсии в зависимости от метода удаляют 5–15 эмбриональных клеток. После биопсии эмбрионы культивируют *in vitro* в течение 3–48 ч и затем немедленно либо трансплантируют синхронизированным коровам-реципиентам, либо подвергают заморозке. Частота наступления беременности в результате пересадки живого или криоконсервированного эмбриона после процедуры биопсии варьирует от 31 до 62,3 % и не зависит от стадии развития эмбриона (Ponsart et al., 2014).

Замораживание эмбрионов после биопсии остается проблемой для методики генотипирования эмбрионов после экстракорпорального оплодотворения.

При использовании биопсии микроскальпелем наблюдались высокие проценты выживания после 48 ч культивирования *in vitro*, когда эмбрионы подвергали биопсии и замораживали на стадиях бластоцисты или морулы (97,1 и 88,4 % соответственно) (Ponsart et al., 2014).

Методы получения достаточного для генотипирования количества ДНК из эмбриональных клеток

Несколько исследователей сообщило, что ДНК одной или нескольких клеток, собранных при биопсии, достаточно для определения пола, анализа SNP или даже полногеномного секвенирования преимплантационного эмбриона (Carneiro et al., 2011; Van der Aa et al., 2013; Voet et al., 2013). Тем не менее количество геномной ДНК, которое выделено из нескольких клеток, может быть слишком мало для надежного анализа генетических маркеров в случае геномной селекции. Например, эффективность методики ПЦР для определения пола обратно связана с числом клеток: 85,5 % для трех и менее клеток, и 100 % для семи и более клеток (Ponsart et al., 2014). Поэтому были разработаны несколько методов для повышения количества геномной ДНК, необходимого для генотипирования множества маркеров.

Одним из первых методов для повышения выхода ДНК было использование пересадки ядер для клонирования клеток биоптатов. Для этого после биопсии клетки изолировали и смешивали с энуклеированными активированными ооцитами реципиентов. После использования пересадки ядер количество ДНК из одной бластоцисты позволяло провести множественное генотипирование панели из 45 микросателлитных маркеров со средней эффективностью 90 % (Ponsart et al., 2014). Этот дорогостоящий и трудоемкий метод, вероятно, не получит дальнейшего развития, поскольку не обеспечивает достаточного выхода геномной ДНК для анализа на чипах высокой плотности (несколько микрограммов).

Другой метод наработки большего количества ДНК основан на культивировании *in vitro* клеток, полученных путем биопсии от блас-

тоцист. Этот метод требует много времени и иногда не обеспечивает достаточного количества ДНК (Gamarrá et al., 2010). Например было показано, что только 50 % клеток биоптатов способны пролиферировать после 10 дней культивирования *in vitro* (Ramos-Ibeas et al., 2014). Тем не менее недавно появилось сообщение о селекции эмбрионов по результатам геномных племенных оценок клеточных линий фибробластов с последующим благополучным клонированием наилучших индивидов путем переноса ядра соматической клетки в энуклеированную яйцеклетку (Kasinathan et al., 2015).

Наиболее распространенный в настоящее время метод заключается в предварительной полногеномной амплификации (Whole-Genome Amplification, WGA) эмбриональной ДНК перед генотипированием на чипах (Macauley, Voet, 2014). ДНК из биоптатов эмбрионов крупного рогатого скота в настоящее время амплифицируют с использованием коммерческих наборов для WGA, таких как GenomePlex (Sigma-Aldrich, USA) (Treff et al., 2011), REPLI-g UltraFast Mini Kit (Qiagen, France) (Le Bourhis et al., 2011) или GenomiPhi V2 DNA Amplification Kit (GE Healthcare, USA) (Fisher et al., 2012). После WGA образуется 5–7 мкг ДНК, что представляет увеличение первоначального количества геномной ДНК, по крайней мере, в 40 тыс. раз (Ponsart et al., 2014).

Однако несбалансированная амплификация гетерозиготных локусов может приводить к «выпадению» отдельных аллелей, когда гетерозиготный генотип эмбриона ошибочно идентифицируют как гомозиготный. Доля таких ошибок генотипирования варьирует от 2 до 18 % (Le Bourhis et al., 2011; Humblot et al., 2010; Fisher et al., 2012; Lauri et al., 2013). Другие ошибки возникают в результате противоположного феномена, при котором гомозиготы ошибочно могут быть идентифицированы как гетерозиготы. Этот тип ошибок возникает примерно в 6,8 % случаев (Fisher et al., 2012). Показана достоверная обратная корреляция между числом ошибок генотипирования эмбриона и числом клеток, взятых при биопсии (Fisher et al., 2012). Для устранения влияния предпочтительной амплификации одного из аллелей при вычислении племенных оценок было предложено использовать только гетерозиготные маркеры (Le Bourhis et al., 2011). Качество генотипирования эмбрионов можно существенно улучшить при использовании генотипов родителей, например, такая информация может быть взята для предсказания недостающих SNP у эмбриона (Le Bourhis et al., 2011; Shojaei Saadi et al., 2014).

Ошибки генотипирования начинают возникать при снижении количества клеток перед WGA ниже 30–40 (Fisher et al., 2012; Lauri et al., 2013). Число таких ошибок при анализе ДНК, выделенной из 15 клеток, после WGA достоверно выше, чем при генотипировании интактной геномной ДНК этой же клеточной линии, и зависит от метода выделения ДНК и технологии WGA (Shojaei Saadi et al., 2014). Считается, что для надежного определения племенных оценок эмбрионов порог ошибок генотипирования не должен превышать 85 % (Le Bourhis et al., 2012). Недавно с помощью модифицированного метода полногеномного секвенирования удалось проанализировать биоптаты человека размером 5–10 клеток с точностью не более

10 ошибок на эмбрион (Peters et al., 2015). Несомненно, что дальнейшее усовершенствование методов работы с малыми количествами ДНК из биоптатов позволит решить проблему геномного анализа единичных клеток.

Использование генотипирования эмбрионов в племенной работе

При проведении анализа ДНК, включающего выделение, WGA-амплификацию и генотипирование на чипах, в условиях научного центра эмбриональные клетки после биопсии необходимо либо транспортировать в лабораторию в небольшом объеме среды, либо пересылать по почте. Условия транспортировки, как оказалось, являются критическим фактором успеха генотипирования. При анализе образцов, амплифицированных на месте забора материала, и образцов, отосланных по почте, выяснилось, что WGA-амплификацию лучше выполнять в месте проведения биопсии либо пересылать биоптаты в лабораторию по почте в замороженном состоянии (Le Bourhis et al., 2010).

Были вычислены племенные оценки для эмбрионов (молочная продуктивность и морфологические признаки) и проведено их сравнение с соответствующими оценками телят (Le Bourhis et al., 2011; Sargolzaei et al., 2012). В целом наблюдались незначительные различия между племенными оценками по данным биопсии эмбрионов и родившихся телят. Коэффициенты корреляции для разных признаков у животных голштинской породы варьируют от 0,985 до 0,997, а у монбеллиардской породы – от 0,937 до 0,998 (Ponsart et al., 2014). По данным других авторов, средний коэффициент корреляции между племенными оценками эмбрионов и телят после предсказания недостающих SNP составляет 0,991 (Sargolzaei et al., 2012).

Геномная селекция произвела революцию в молочном животноводстве. Благодаря ей значительно повысилась эффективность отбора за счет сокращения интервала между поколениями, тестирования большого числа селекционных кандидатов и улучшения точности оценок для признаков с низкой наследуемостью. Основные тенденции в развитии этого метода связаны с повышением точности племенных оценок путем объединения референсных популяций; включением в селекционные программы генотипирования коров; предсказанием генотипов отсутствующих SNP на основе чипов с более низкой плотностью маркеров и предсказанием генотипов животных по генотипам родственников.

Коммерческая выгода отбора по множеству ДНК-маркеров, равномерно распределенных по всему геному, многократно возрастает, если он сочетается с применением вспомогательных биотехнологий для получения племенной продукции от элитных животных-производителей. При геномной селекции молочного скота биотехнологические манипуляции с половыми клетками и эмбрионами позволяют улучшать множество факторов, от которых зависит эффективность отбора: его интенсивность, надежность племенной оценки и интервал между поколениями. Применение современного метода полногеномной амплификации для увеличения количества эмбриональной ДНК позволяет проводить анализ большого числа генетических маркеров у нескольких клеток,

полученных после биопсии на стадии морулы или бластоцисты. В будущем такие подходы приведут к дальнейшему снижению интервала между поколениями, эффективному контролю над степенью инбридинга, массовой селекции элитных маток и т. д.

Благодарности

Работа поддержана грантом РФФИ № 13-04-00968а и бюджетным проектом VI.58.1.1.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список литературы

Смарагдов М.Г. Геномная селекция молочного скота в мире. Пять лет практического использования. Генетика. 2013;49(11): 1251-1260.

Berry D.P., McClure M.C., Mullen M.P. Within- and across-breed imputation of high-density genotypes in dairy and beef cattle from medium- and low-density genotypes. J. Anim. Breed. Genet. 2014;131(3):165-172. DOI: 10.1111/jbg.12067

Boichard D., Chung H., Dassanneville R., David X., Eggen A., Fritz S., Gietzen K.J., Hayes B.J., Lawley C.T., Sonstegard T.S., Van Tassel C.P., VanRaden P.M., Viaud-Martinez K.A., Wiggans G.R. Design of a bovine low-density SNP array optimized for imputation. PLoS One. 2012;7:e34130. DOI: 10.1371/JOURNAL.PONE.0034130

Boichard D., Ducrocq V., Fritz S. Sustainable dairy cattle selection in the genomic era J. Anim. Breed Genet. 2015;132(2):135-143. DOI: 10.1111/jbg.12150

Bouquet A., Juga J. Integrating genomic selection into dairy cattle breeding programmes: a review. Animal. 2013;7(5):705-713. DOI: 10.1017/S1751731112002248

Bouquet A., Sorensen A.C., Juga J. Genomic selection strategies to optimize the use of multiple ovulation and embryo transfer schemes in dairy cattle breeding programs. Livestock Sci. 2015;174:18-25. DOI: http://dx.doi.org/10.1016/j.livsci.2015.01.014

Bouwman A.C., Hickey J.M., Calus M.P., Veerkamp R.F. Imputation of non-genotyped individuals based on genotyped relatives: assessing the imputation accuracy of a real case scenario in dairy cattle. Genet. Sel. Evol. 2014;46:6. DOI: 10.1186/1297-9686-46-6

Calus M.P., de Haas Y., Veerkamp R.F. Combining cow and bull reference populations to increase accuracy of genomic prediction and genome-wide association studies. J. Dairy Sci. 2013;96(10):6703-6715. DOI: 10.3168/jds.2012-6013

Carneiro M.C., Takeuchi P.L., Araujo A., Lobo R.B., Elias F.P., Vila R.A., Miranda-Furtado C.L., Ramos E.S. Sexing single bovine blastomeres using TSPY gene amplification. Genet. Mol. Res. 2011;10(4):3937-3941. DOI: 10.4238/2011

Cenariu M., Pall E., Cernea C., Groza I. Evaluation of bovine embryo biopsy techniques according to their ability to preserve embryo viability. J. Biomed. Biotechnol. 2012;2012:541384. DOI: 10.1155/2012/541384

Clark S.A., Kinghorn B.P., Hickey J.M., van der Werf J.H. The effect of genomic information on optimal contribution selection in livestock breeding programs. Genet. Sel. Evol. 2013;45:44. DOI: 10.1186/1297-9686-45-44

Ertl J., Edel C., Emmerling R., Pausch H., Fries R., Götz K.U. On the limited increase in validation reliability using high-density genotypes in genomic best linear unbiased prediction: observations from Fleckvieh cattle. J. Dairy Sci. 2014;97(1):487-496. DOI: 10.3168/jds.2013-6855

Falconer D.S., Mackay T.F.C. Introduction to Quantitative Genetics. Burnt Mill, England : Longman, 1996.

Fisher P.J., Hyndman D.L., Bixley M.J., Oback F.C., Popovic L., McGowan L.T., Berg M.C., Wells D.N. Brief communication: potential for genomic selection of bovine embryos. Proc. N.Z. Soc. Anim. Prod. 2012;72:156-158.

Galli C., Duchi R., Colleoni S., Lagutina I., Lazzari G. Ovum pick up, intracytoplasmic sperm injection and somatic cell nuclear transfer in cattle, buffalo and horses: from the research laboratory to clinical practice. Theriogenology. 2014;Jan. 1;81(1):138-151. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2013.09.008

Gamarra G., Le Bourhis D., Gall L., Laffont L., Ruffini S., Humblot P. Attempts to culture biopsied cells from *in vitro* bovine blastocysts for genotyping. Reprod. Fertil. Dev. 2010;22:238-239. DOI:10.1071/RDV22N1AB160

Georges M., Massey J.M. Velogenetics, or the synergistic use of marker assisted selection and germ-line manipulation. Theriogenology. 1991;35(1):151-159. DOI: 10.1016/0093-691X(91)90154-6

Haskell M.J., Simm G., Turner S.P. Genetic selection for temperament traits in dairy and beef cattle. Front. Genet. 2014;5:368. DOI: 10.3389/fgene.2014.00368

Hasler J.F. Forty years of embryo transfer in cattle: a review focusing on the journal Theriogenology, the growth of the industry in North America, and personal reminiscences. Theriogenology. 2014;81(1):152-169. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2013.09.010

Hoze C., Fouilloux M.N., Venot E., Guillaume F., Dassonneville R., Fritz S., Ducrocq V., Phocas F., Boichard D., Croiseau P. High-density marker imputation accuracy in sixteen French cattle breeds. Genet. Sel. Evol. 2013;45: 33. DOI: 10.1186/1297-9686-45-33

Hoze C., Fritz S., Phocas F., Boichard D., Ducrocq V., Croiseau P. Efficiency of multi-breed genomic selection for dairy cattle breeds with different sizes of reference population. J. Dairy Sci. 2014;97(6):3918-3929. DOI: 10.3168/jds.2013-7761

Humblot P., Le Bourhis D., Fritz S., Colleau J.J., Gonzalez C., Guyader Joly C., Malafosse A., Heyman Y., Amigues Y., Tissier M., Ponsart C. Reproductive technologies and genomic selection in cattle. Vet. Med. Int. 2010;2010:1-8. DOI: 10.4061/2010/192787

Illumina. Bovine HD Genotyping BeadChip. 2015a. available at http://www.illumina.com/Documents/products/datasheets/datasheet_bovineHD.pdf

Illumina. Bovine SNP50 Genotyping BeadChip. 2015b. available at http://http://www.illumina.com/Documents/products/datasheets/datasheet_bovine_snp50.pdf. Illumina.%202011c.

Illumina. Bovine LD. 2015c. available at http://www.illumina.com/documents/products/product_information_sheets/product_info_bovineLD.pdf

Jimenez-Montero J.A., Gianola D., Weigel K., Alenda R., Gonzalez-Recio O. Assets of imputation to ultra-high density for productive and functional traits. J. Dairy Sci. 2013;96(9):6047-6058. DOI: 10.3168/jds.2013-6793

Jonas E., de Koning D.J. Genomic selection needs to be carefully assessed to meet specific requirements in livestock breeding programs. Front Genet. 2015;Feb. 20;6:49. DOI: 10.3389/fgene.2015.00049

Kasinathan P., Wei H., Xiang T., Molina J.A., Metzger J., Broek D., Kasinathan S., Faber D.C., Allan M.F. Acceleration of genetic gain in cattle by reduction of generation interval. Sci. Rep. 2015;5:8674. DOI: 10.1038/srep08674

Larmer S.G., Sargolzaei M., Schenkel F.S. Extent of linkage disequilibrium, consistency of gametic phase, and imputation accuracy within and across Canadian dairy breeds. J. Dairy Sci. 2014;97(5):3128-3141. DOI: 10.3168/jds.2013-6826

Lauri A., Lazzari G., Galli C., Lagutina I., Genzini E., Braga F., Mariani P., Williams J.L. Assessment of MDA efficiency for genotyping using cloned embryo biopsies. Genomics. 2013;101(1):24-29. DOI: 10.1016/j.ygeno.2012.09.002

Le Bourhis D., Mullaart E., Humblot P., Coppieters W., Ponsart C. Bovine embryo genotyping using a 50k SNP chip. Reprod. Fertil. Dev. 2010;23:197. DOI:10.1071/RDV23N1AB193

Le Bourhis D., Mullaart E., Schrooten C., Fritz S., Coppieters W., Ponsart C. Breeding values concordance between embryos and corresponding calves. Reprod. Fertil. Dev. 2011;24:180. DOI: 10.1071/RDV24N1AB135

Lund M.S., Roos A.P., Vries A.G., Druet T., Ducrocq V., Fritz S., Guillaume F., Guldbbrandtsen B., Liu Z., Reents R., Schrooten C., See-

- fried F., Su G. A common reference population from four European Holstein populations increases reliability of genomic predictions. *Genet. Sel. Evol.* 2011;43:43. DOI: 10.1186/1297-9686-43-43
- Ma P., Brondum R.F., Zhang Q., Lund M.S., Su G. Comparison of different methods for imputing genome-wide marker genotypes in Swedish and Finnish Red Cattle. *J. Dairy Sci.* 2013;96(7):4666-4677. DOI: 10.3168/jds.2012-6316
- Macaulay I.C., Voet T. Single cell genomics: advances and future perspectives. *PLoS Genet.* 2014;10(1):e1004126. DOI: 10.1371/journal.pgen.1004126
- Makgahlela M.L., Mantysaari E.A., Strandén I., Koivula M., Nielsen U.S., Sillanpää M.J., Juga J. Across breed multi-trait random regression genomic predictions in the Nordic Red dairy cattle. *J. Anim. Breed. Genet.* 2013a;130(1):10-19. DOI: 10.1111/j.1439-0388.2012.01017.x
- Makgahlela M.L., Strandén I., Nielsen U.S., Sillanpää M.J., Mantysaari E.A. The estimation of genomic relationships using breedwise allele frequencies among animals in multibreed populations. *Dairy Sci.* 2013b;96(8):5364-5375. DOI: 10.3168/jds.2012-6523
- Makgahlela M.L., Strandén I., Nielsen U.S., Sillanpää M.J., Mantysaari E.A. Using the unified relationship matrix adjusted by breed-wise allele frequencies in genomic evaluation of a multibreed population. *J. Dairy Sci.* 2014;97(2):1117-1127. DOI: 10.3168/jds.2013-7167
- Mc Hugh N., Meuwissen T.H., Cromie A.R., Sonesson A.K. Use of female information in dairy cattle genomic breeding programs. *J. Dairy Sci.* 2011;94(8):4109-4118. DOI:10.3168/JDS.2010-4016
- Meuwissen T., Hayes B., Goddard M. Accelerating improvement of livestock with genomic selection. *Annu. Rev. Anim. Biosci.* 2013;1:221-237. DOI: 10.1146/annurev-animal-031412-103705
- Nicholas F.W., Hobbs M. Mutation discovery for Mendelian traits in non-laboratory animals: a review of achievements up to 2012. *Anim. Genet.* 2014;45(2):157-170. DOI: 10.1111/age.12103
- Nordic Cattle Genetic Evaluation (NCGE). 2015. available at <http://www.nordicebv.info/News/NewsNAVroutineEvaluation-May2nd2014.htm>
- Pedersen L.D., Kargo M., Berg P., Voergaard J., Buch L.H., Sorensen A.C. Genomic selection strategies in dairy cattle breeding programmes: sexed semen cannot replace multiple oulation and embryo transfer as superior reproductive technology. *J. Anim. Breed. Genet.* 2012;129:152-163. DOI:10.1111/J.1439-0388.2011.00958.X
- Peters B.A., Kermani B.G., Alferov O., Agarwal M.R., McElwain M.A., Gulbahce N., Hayden D.M., Tang Y.T., Zhang R.Y., Tearle R., Crain B., Prates R., Berkeley A., Munne S., Drmanac R. Detection and phasing of single base *de novo* mutations in biopsies from human *in vitro* fertilized embryos by advanced whole-genome sequencing. *Genome Res.* 2015;25(3):426-434. DOI: 10.1101/gr.181255.114
- Ponsart C., Le Bourhis D., Knijn H., Fritz S., Guyader-Joly C., Otter T., Lacaze S., Charreaux F., Schibler L., Dupassieux D., Mullaart E. Reproductive technologies and genomic selection in dairy cattle. *Reprod. Fertil. Dev.* 2014;26(1):12-21. DOI: 10.1071/RD13328
- Pryce J.E., Daetwyler H.D. Designing dairy cattle breeding schemes under genomic selection: a review of international research. *Anim. Prod. Sci.* 2012;52:107-114. DOI: 10.1071/AN11098
- Pryce J.E., Wales W.J., de Haas Y., Veerkamp R.F., Hayes B.J. Genomic selection for feed efficiency in dairy cattle. *Animal.* 2014;8(1):1-10. DOI: 10.1017/S1751731113001687
- Ramos-Ibeas P., Calle A., Pericuesta E., Laguna-Barraza R., Moros-Mora R., Lopera-Vasquez R., Mailló V., Yanez-Mo M., Gutierrez-Adan A., Rizos D., Ramirez M.A. An efficient system to establish biopsy-derived trophoblastic cell lines from bovine embryos. *Biol. Reprod.* 2014;91(1):15. DOI: 10.1095/biolreprod.114.118430
- Sargolzaei M., Vigneault C., Blondin P., Schenkel F., Chesnais J. Results from the Boviteq embryo genotyping research project. Dairy Cattle Breeding and Genetics Committee Meeting, 18 September 2012. Available at: http://lirpa.aps.uoguelph.ca/elares/sites/default/files/msargol_Embryo_Genotyping_Project.pdf.
- Schopen G.C., Schrooten C. Reliability of genomic evaluations in Holstein-Friesians using haplotypes based on the BovineHD BeadChip. *J. Dairy Sci.* 2013;Dec;96(12):7945-7951.
- Schrooten C., Dassonneville R., Ducrocq V., Brondum R.F., Lund M.S., Chen J., Liu Z., Gonzalez-Recio O., Pena J., Druet T. Error rate for imputation from the Illumina BovineSNP50 chip to the Illumina BovineHD chip. *Genet. Sel. Evol.* 2014;46:10. DOI: 10.1186/1297-9686-46-10
- Shojaei Saadi H.A., Vigneault C., Sargolzaei M., Gagne D., Fournier E., de Montera B., Chesnais J., Blondin P., Robert C. Impact of whole-genome amplification on the reliability of pre-transfer cattle embryo breeding value estimates. *BMC Genomics.* 2014;15:889. DOI: 10.1186/1471-2164-15-889
- Sorensen M.K., Voergaard J., Pedersen L.D., Berg P., Sorensen A.C. Genetic gain in dairy cattle populations is increased using sexed semen in commercial herds. *J. Anim. Breed. Genet.* 2011;128:267-275. DOI:10.1111/J.1439-0388.2011.00924.X
- Treff N.R., Su J., Tao X., Northrop L.E., Scott R.T. Jr. Single-cell whole-genome amplification technique impacts the accuracy of SNP microarray-based genotyping and copy number analyses. *Mol. Hum. Reprod.* 2011;17(6):335-343. DOI: 10.1093/molehr/gaq103
- Van der Aa N., Zamani Esteki M., Vermeesch J.R., Voet T. Preimplantation genetic diagnosis guided by single-cell genomics. *Genome Med.* 2013;5(8):71. DOI: 10.1186/gm475
- VanRaden P.M., Null D.J., Sargolzaei M., Wiggans G.R., Tooker M.E., Cole J.B., Sonstegard T.S., Connor E.E., Winters M., van Kaam J.B., Valentini A., Van Doormaal B.J., Faust M.A., Doak G.A. Genomic imputation and evaluation using high-density Holstein genotypes. *J. Dairy Sci.* 2013;96(1):668-678. DOI: 10.3168/jds.2012-5702
- Voet T., Kumar P., Van Loo P., Cooke S.L., Marshall J., Lin M.L., Zamani Esteki M., Van der Aa N., Mateiu L., McBride D.J., Bignell G.R., McLaren S., Teague J., Butler A., Raine K., Stebbings L.A., Quail M.A., D'Hooghe T., Moreau Y., Futreal P.A., Stratton M.R., Vermeesch J.R., Campbell P.J. Single-cell paired-end genome sequencing reveals structural variation per cell cycle. *Nucleic Acids Res.* 2013;41(12):6119-6138. DOI: 10.1093/nar/gkt345
- Zhou L., Heringstad B., Su G., Gulbrandsen B., Meuwissen T.H., Svendsen M., Grove H., Nielsen U.S., Lund M.S. Genomic predictions based on a joint reference population for the Nordic Red cattle breeds. *J. Dairy Sci.* 2014;97(7):4485-4496. DOI: 10.3168/jds.2013-7580