

(19)



Евразийское  
патентное  
ведомство

(21) 202090447 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки  
2020.06.15

(51) Int. Cl. C12Q 1/04 (2006.01)  
C12Q 1/68 (2018.01)  
A01K 67/02 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки  
2018.08.06

(54) СПОСОБ ОТБОРА ЖВАЧНЫХ ЖИВОТНЫХ В ОТНОШЕНИИ ЖЕЛАЕМОГО НАСЛЕДУЕМОГО ПРИЗНАКА

(31) 62/541,731

(72) Изобретатель:  
Мизрахи Ицхак (IL)

(32) 2017.08.06

(33) US

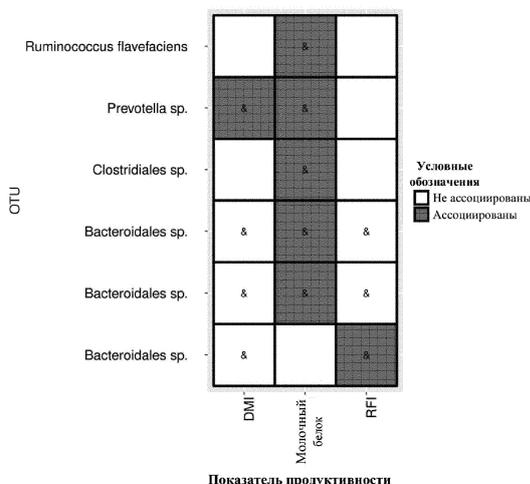
(74) Представитель:  
Угрюмов В.М., Лыу Т.Н., Гизатуллина  
Е.М., Глухарёва А.О., Строкова О.В.,  
Христофоров А.А., Гизатуллин Ш.Ф.,  
Костюшенкова М.Ю., Лебедев В.В.,  
Парамонова К.В. (RU)

(86) PCT/IL2018/050868

(87) WO 2019/030752 2019.02.14

(71) Заявитель:  
ЗЕ СТЕЙТ ОФ ИЗРАИЛ,  
МИНИСТРИ ОФ ЭГРИКАЛЧЕ  
ЭНД РУРАЛ ДЕВЕЛОПМЕНТ,  
ЭГРИКАЛЧЕРАЛ РИСЕЧ  
ОРГАНИЗЕЙШН (АРО)  
(ВОЛКАНИ СЕНТЕР); ЗЕ  
НЭШНЛ ИНСТИТЬЮТ ФОР  
БАЙОТЕКНОЛОДЖИ ИН ЗЕ НЕГЕВ  
ЛТД. (IL)

(57) Раскрыт способ отбора жвачного животного, имеющего желаемый наследуемый признак. Способ предусматривает анализ микробиома животного в отношении количества наследуемого микроорганизма, который ассоциирован с наследуемым признаком, причем количество наследуемого микроорганизма является показателем того, имеет ли животное желаемый наследуемый признак.



A1

202090447

202090447

A1

# **СПОСОБ ОТБОРА ЖВАЧНЫХ ЖИВОТНЫХ В ОТНОШЕНИИ ЖЕЛАЕМОГО НАСЛЕДУЕМОГО ПРИЗНАКА**

## **ОПИСАНИЕ**

### **Область техники и уровень техники**

Настоящее изобретение в соответствии с некоторыми вариантами его осуществления относится к способу отбора жвачного животного в отношении желаемого наследуемого признака на основании присутствия конкретных бактерий в его микробиоме.

Микробиом бычьего рубца фактически позволяет жвачному животному-хозяину переваривать свой корм, расщепляя и ферментируя его. В этом смысле эта взаимосвязь является уникальной и отличается от взаимоотношений хозяин-микробиом, которые сформировались у людей и нетравоядных животных, у которых такой зависимости не существует. Полагают, что эта строго облигатная взаимосвязь хозяин-микробиом, которая установилась примерно 50 миллионов лет назад, играет основную роль в физиологии хозяина. Несмотря на ее большую важность, воздействие природной генетической изменчивости у хозяина, обусловленной половым размножением и рекомбинацией при мейозе, на сложную взаимосвязь составляющих микробиома рубца и физиологические признаки хозяина недостаточно понятно. Известно, что существуют ассоциации между конкретными составляющими микробиома рубца и физиологией животных, преимущественно, проиллюстрированные на примере способности животного получать энергию из своего корма [Kruger Ben Shabat S, et al., 2016. ISME J 10:2958-2972].

Эти недавние результаты определяют микробиом бычьего рубца как новый рубеж в попытках повысить эффективность использования корма у дойных коров. Поскольку население непрерывно растет, это может иметь важные последствия для проблем продовольственной безопасности в качестве меры по восполнению источников пищи, доступных для потребления человеком при снижении воздействия на окружающую среду в глобальном масштабе. Несмотря на ее большую важность, сложная взаимосвязь составляющих микробиома рубца и генетических и физиологических параметров хозяина недостаточно изучена.

Предшествующий уровень техники включает в себя Guan LL, et al., 2008. FEMS Microbiology Letters 288:85-9; Roehe R, et al., 2016. PLoS Genet 12:e1005846; Li Z, et al., 2016. Microbiology Reports 8:1016-102; и международную заявку WO2017/187433.

### **Сущность изобретения**

В соответствии с аспектом настоящего изобретения предусмотрен способ отбора жвачного животного, имеющего желаемый наследуемый признак, включающий анализ микробиома животного в отношении количества наследуемого микроорганизма, который ассоциирован с наследуемым признаком, причем количество наследуемого микроорганизма является показателем того, имеет ли животное желаемый наследуемый признак.

В соответствии с аспектом настоящего изобретения предусмотрен способ разведения жвачного животного, включающий осеменение самки жвачного животного спермой от самца жвачного животного, который был отобран согласно способам, описанным в данном документе, таким образом осуществляя разведение жвачного животного.

В соответствии с аспектом настоящего изобретения предусмотрен способ увеличения количества жвачных животных, имеющих желаемый микробиом, включающий разведение самца и самки жвачных животных, причем микробиом рубца или самца, и/или самки жвачных животных содержит наследуемый микроорганизм выше предварительно определенного уровня, таким образом увеличивая количество жвачных животных, имеющих желаемый микробиом.

В соответствии с аспектом настоящего изобретения предусмотрен способ определения чистоты породы жвачных животных, включающий анализ микробиома жвачных животных, причем сходство в количестве бактерий в микробиоме является показателем чистоты породы.

В соответствии с аспектом настоящего изобретения предусмотрен способ разведения жвачного животного, включающий: осеменение самки жвачного животного, которая была отобрана согласно способам, описанным в данном документе, спермой от самца жвачного животного, таким образом осуществляя разведение жвачного животного.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящего изобретения наследуемый микроорганизм представляет собой наследуемую бактерию.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящего изобретения наследуемая бактерия относится по меньшей мере к одной из оперативных таксономических единиц (OTU), изложенных в таблице 1.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящего изобретения наследуемая бактерия относится к типу Bacteroidetes и Firmicutes, причем количество является показателем того, имеет ли животное желаемый наследуемый признак.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящего изобретения наследуемая бактерия относится к отряду Bacteroidales и Clostridiales.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящего изобретения выбирают по меньшей мере одну OTU, которая изложена в любой из SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 8, 9, 11-17, 19, 20 или 21.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящего изобретения по меньшей мере одна наследуемая бактерия является выбранной из группы, состоящей из наследуемого рода бактерий, наследуемого семейства бактерий и наследуемого отряда бактерий.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящего изобретения бактерия экспрессирует последовательность гена 16S рРНК, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1-22.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящего изобретения по меньшей мере одна OTU содержит по меньшей мере 5 OTU.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящего изобретения жвачное животное представляет собой корову.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящего изобретения способ дополнительно предусматривает применение отобранного животного для разведения.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящего изобретения желаемый наследуемый признак является выбранным из группы, состоящей из белка молока, потребления сухого вещества, продуцирования метана, эффективности использования корма и жирности молока.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящего изобретения микробиом представляет собой непатогенный микробиом.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящего изобретения анализ количества осуществляют посредством анализа экспрессии по меньшей мере одного гена в геноме по меньшей мере одной бактерии.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящего изобретения анализ количества осуществляют посредством секвенирования ДНК, полученной из образца микробиома.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящего изобретения бактерии относятся по меньшей мере к одной из оперативных таксономических единиц (OTU), изложенных в таблице 1.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящего изобретения по меньшей мере одна OTU является выбранной из группы, состоящей из рода, семейства и отряда.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящего изобретения бактерия экспрессирует последовательность гена 16S рНК, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1-22.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящего изобретения по меньшей мере одна OTU содержит по меньшей мере 5 OTU.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящего изобретения жвачное животное представляет собой корову.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящего изобретения микробиом содержит микробиом рубца или фекальный микробиом.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящего изобретения самец жвачного животного был отобран согласно способам, описанным в данном документе.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящего изобретения наследуемый микроорганизм является ассоциированным с наследуемым признаком.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящего изобретения наследуемый микроорганизм оказывает воздействие на относительное количество микробов в микробиоме.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящего изобретения микробиом рубца как самца, так самки жвачных животных содержит наследуемый микроорганизм выше предварительно определенного уровня.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящего изобретения наследуемый микроорганизм представляет собой бактерию.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящего изобретения бактерия экспрессирует последовательность гена 16S рНК, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1-22.

Если не определено иное, все технические и научные термины, используемые в данном документе, имеют такое же значение, которое обычно понятно квалифицированному специалисту в области техники, к которой относится настоящее изобретение. Несмотря на то что способы и материалы, подобные или эквивалентные описанным в данном документе, можно применять в практическом осуществлении или исследовании вариантов осуществления настоящего изобретения, ниже описаны иллюстративные способы и/или

материалы. В случае конфликта преимущественную силу будет иметь описание патентного документа, в том числе определения. Кроме того, материалы, способы и примеры являются только иллюстративными, и не предполагается, что они обязательно являются ограничивающими.

### **Описание чертежей**

В данном документе описаны некоторые варианты осуществления, исключительно в качестве примера, со ссылкой на приложенные чертежи. Конкретной ссылкой на чертежи в деталях подчеркивается, что показанные подробности представлены в качестве примера и с целью иллюстративного обсуждения вариантов осуществления настоящего изобретения. В связи с этим описание, взятое с чертежами, делает очевидным для специалистов в данной области техники, как могут быть практически реализованы варианты осуществления настоящего изобретения.

На чертежах:

Фиг. 1. Наследуемая часть микробиома коровьего рубца является филогенетически близкородственной. Среднее парное сходство в последовательности гена 16S рДНК в произвольно выбранных группах OTU рубца с одинаковым размером ( $n=22$ ) сравнивали со средним парным сходством у 22 наследуемых OTU. На оси Y представлено число групп, и на оси X представлено сходство последовательности. Группа наследуемых OTU с расчетным средним сходством 72% по последовательности гена 16S рДНК показана розовым цветом. Распределение произвольно выбранных групп OTU рубца показано синим цветом. Все произвольные группы демонстрировали более низкое сходство 16S рДНК ( $P<0,01$ ).

Фиг. 2. Наследуемые OTU демонстрируют высокий уровень присутствия. OTU с их таксономическими характеристиками представлены слева. Относительная распространенность каждой OTU по когорте коров представлена на левой секции, и присутствие каждой OTU представлено на правой секции. Зеленым обозначена OTU из отряда Bacteroidales, в то время как коричневым обозначена OTU из отряда Clostridiales.

Фиг. 3. Наследуемые OTU коррелируют с характеристиками хозяина и метаболитами рубца. Тепловая карта, описывающая корреляцию между относительной распространенностью наследуемых OTU рубца (строки) и выбранными показателями, представляющими разные физиологические характеристики хозяина или метаболиты рубца (столбцы). OTU обозначены цветовым кодом в зависимости от отряда (зеленым цветом представлены Bacteroidales, коричневым представлены Clostridiales). Физиологические

характеристики выделены черным цветом, и метаболиты рубца обозначены цветовым кодом в соответствии с четырьмя группами: аминокислоты (голубой), сахара (желтый), VFA (зеленый) и все остальные измеряемые метаболиты (серый). \*/\*\*\*/\*\*\*\* представляют номинальные р-значения, меньшие чем 0,05, 0,005 и 0,0005, соответственно.

Фиг. 4А-В. наследуемые OTU являются более связанными с физиологическими параметрами хозяина и метаболитами рубца, чем другие микробы рубца. (А) Среднюю абсолютную корреляцию (коэффициент Спирмена) наследуемых OTU с заданным показателем сравнивают с таковой в полном микробиоме. Звездочками показано значимое различие средних значений (t-критерий,  $p < 0,05$ ). Красные столбики представляют корреляцию наследуемого микробиома, в то время как голубые столбики представляют корреляцию в полном микробиоме. (В) Отношение шансов (O.R.) для всех OTU, которые должны коррелировать с заданным показателем (номинальный коэффициент Спирмена  $p < 0,05$ ), между наследуемыми OTU и всеми OTU. Ось Y: отношение шансов, ось X: р-значение, полученное в результате точного теста Фишера. Красная вертикальная линия определяет скорректированное с учетом поправки Бонферрони пороговое значение уровня значимости 0,05. Цветными точками показаны категории в соответствии с условными обозначениями.

Фиг. 5. Часть наследуемых OTU, которые оказались ассоциированными с физиологическими параметрами хозяина согласно предыдущему исследованию (Shabat, Sheerli Kruger Ben, et al., ISME J 10:2958–2972, 2016, doi:10.1038/ismej.2016.62). Шесть из 22 наследуемых OTU, которые согласно этому исследованию были ассоциированы с разными показателями продуктивности коров, а именно с потреблением сухого вещества (DMI), содержанием белка молока и эффективностью использования корма, измеренной в виде остаточного потребления корма (RFI). OTU и их таксономическая информация представлены в строках, а показатели продуктивности представлены в столбцах. Символ амперсанд внутри ячейки указывает на то, что значимая корреляция была обнаружена в представленных примерах между наследуемой OTU и показателем продуктивности.

Фиг. 6. Гистограмма, показывающая уровень ложноположительных результатов в тесте наследуемости при перестановках гипотез на основании 100 произвольных перестановок. Ось X: количество выявленных наследуемых OTU. Ось Y: количество перестановок. Красная вертикальная линия представляет количество OTU, выявленных как наследуемые при фактических данных (без перестановок).

Фиг. 7. Нулевая модель для тестирования значимости фактических  $r$ -значений коэффициента корреляции Спирмена у наследуемых OTU с каждым из показателей. Красные столбики представляют значения, полученные из профиля распространенности фактически существующих наследуемых OTU; черные столбики представляют значения, полученные в результате 1000 перестановок. При каждой такой перестановке профиль распространенности каждой OTU случайно перетасовывался.

Фиг. 8. 50 OTU с наиболее высокими оценками наследуемости, расположенные по порядку в зависимости от количества дней (образцы микробиома забирали в три разных дня), в которые оценки наследуемости оказались значимыми, в качестве первичного фактора для сортировки и средней оценки наследуемости в качестве вторичного фактора для сортировки. Ось X: день забора образцов. Ось Y: таксономическая информация для микробных OTU. Красная линия показывает пороговое значение, выше которого OTU считали наследуемыми.

Фиг. 9. Тепловая карта с изображением профилей распространенности наследуемых микробных OTU (среднее значение для трех дней забора образцов) по всей исследуемой когорте. Ось X: идентификационный номер животного в эксперименте. Ось Y: таксономическая информация для микробных OTU. Тепловая карта имеет цвет, соответствующий относительной распространенности данной OTU у данного животного. Относительная распространенность умножена на 1M для улучшения удобочитаемости. Красная горизонтальная линия показывает пороговое значение, выше которого OTU считали наследуемыми.

Фиг. 10. Тепловая карта с изображением профилей распространенности наследуемых микробных OTU (среднее значение для трех дней забора образцов) по генотипируемой подгруппе в исследуемой когорте. Ось X: идентификационный номер животного в эксперименте. Ось Y: таксономическая информация для микробных OTU. Тепловая карта имеет цвет, соответствующий относительной распространенности данной OTU у данного животного. Относительная распространенность умножена на 1M для улучшения удобочитаемости. Красная горизонтальная линия показывает пороговое значение, выше которого OTU считали наследуемыми.

Фиг. 11. Оценка наследуемости признаков хозяина. Ось X: признаки, ось Y: оценка наследуемости. Звездочка над столбиком указывает на значимую генетическую составляющую.

### **Описание конкретных вариантов осуществления настоящего изобретения**

Настоящее изобретение в соответствии с некоторыми вариантами его осуществления относится к способу отбора жвачного животного в отношении желаемого наследуемого признака на основании присутствия конкретных бактерий в его микробиоме.

Перед объяснением по меньшей мере одного варианта осуществления настоящего изобретения в деталях следует понимать, что настоящее изобретение не обязательно ограничено в своем применении деталями, изложенными в следующем описании или проиллюстрированными в разделе Примеры. Настоящее изобретение обеспечивает возможность создания других вариантов осуществления или его практическое осуществление или реализацию разными способами.

Жвачные животные поддерживают длительную облигатную взаимосвязь с микробиомом их рубца, которая берет начало 50 миллионов лет назад. В этой уникальной взаимосвязи хозяин-микробиом способность хозяина переваривать свой корм полностью зависит от микробиома, эволюционирующего совместно с ним. Это уникальное объединение поднимает вопрос, касающийся зависимости между генетическими и физиологическими параметрами жвачных животных и структурой, составом и метаболизмом микробиома рубца. Для выяснения этой взаимосвязи авторы настоящего изобретения оценивали ассоциацию генетических параметров хозяина с филогенетическим и функциональным составом микробиома рубца. Они осуществляли это, изучая популяцию из 78 дойных коров голштино-фризской породы с применением комбинации данных о микробиоте рубца и других фенотипах от каждого животного с генотипическими данными от подгруппы из 47 животных. Более конкретно, при применении оценок наследуемости на основе SNP, объединенных с данными секвенирования ампликонов, признаками хозяина и метаболитами рубца, авторы настоящего изобретения идентифицировали 22 оперативных таксономических единиц (OTU), распространенности которых были ассоциированы с метаболическими признаками рубца и физиологическими признаками хозяина, и которые демонстрировали измеримую наследуемость (см. фиг. 8).

Данные результаты демонстрируют, что наследуемые виды микробов представляют собой связанную филогенетическую группу (фиг. 1). Эти данные соответствуют фундаментальному экологическому принципу, что микроорганизмы, которые делят подобную экологическую нишу, более склонны к филогенетической близости друг с другом, чем организмы не делящие одну и ту же нишу. Измеренные метаболиты и физиологические параметры обычно объединяют в кластеры в соответствии с их категорией на основании

иерархической кластеризации профиля их корреляции с различными наследуемыми OTU (столбцы на тепловой карте, фиг. 3). Например, большинство аминокислот объединяются в кластер, некоторые летучие жирные кислоты располагаются в паре, и шесть из девяти показателей продуктивности соседствуют друг с другом на тепловой карте. В то же время, что касается наследуемых OTU, даже в пределах выделенной ниши наследуемых OTU, идентифицированных в этом исследовании, можно увидеть, что объединение в кластер OTU в соответствии с их профилями распространенности (строки на тепловой карте, фиг. 3) разделяет их в высокой степени в соответствии с их таксономическими принадлежностями, например, восемь из девяти неизвестных семейств *Bacteroidales* образуют кластер, и три из пяти *Prevotella* образуют кластер.

Кроме того, авторы настоящего изобретения обнаружили, что наследуемые бактерии содержат более высокие доли микробов, коррелирующие с признаками хозяина и с метаболическими параметрами рубца (фиг. 4А и В). Эти данные говорят о том, что генетическая изменчивость хозяина может оказывать измеримое воздействие на физиологические признаки хозяина, а также на метаболизм рубца, потенциально модулируя распространенность различных групп микробов рубца. Эти данные указывают на то, что генетические параметры хозяина ассоциированы с конкретными бактериями рубца, которые потенциально более склонны оказывать влияние на метаболизм рубца и физиологические параметры хозяина. Примечательно, что метаболиты и признаки хозяина, корреляцию которых с наследуемыми бактериями выявили, также были связаны их метаболизмом. Это можно увидеть по корреляционным значениям продуцирования метана, соотношения пропионат:ацетат, содержания лактата, пропионата и бутирата, а также эффективности извлечения энергии у хозяина (представленной в виде RFI), которые находятся в корреляции с наследуемыми бактериями. Особенно интересно наблюдать, что наследуемые бактерии в основном коррелируют с соотношением пропионат:ацетат (среднее значение  $|r|=0,64$ ), которое обратно пропорционально коррелирует с метаногенезом и содержанием лактата и в то же время положительно коррелирует с RFI, которое оценивает эффективность извлечения энергии (фиг. 3 и 4). Еще одним примечательным результатом является признак содержания белка молока, который коррелировал с наследуемыми микробами и демонстрировал наиболее высокое отношение шансов, указывающее на повышенное содержание наследуемых бактерий, связанных с этим признаком хозяина (фиг. 4). Эти наблюдения дополнительно подкрепляет мнение о трехсторонней взаимосвязи между генотипом хозяина, бактериями рубца и признаками хозяина.

Таким образом, в соответствии с одним аспектом настоящего изобретения предусмотрен способ отбора жвачного животного, имеющего желаемый наследуемый признак, включающий анализ в микробиоме животного в отношении количества наследуемого микроорганизма, который ассоциирован с наследуемым признаком, причем количество наследуемого микроорганизма является показателем того, имеет ли животное желаемый наследуемый признак.

Жвачные животные, предполагаемые настоящим изобретением, включают в себя, например, крупный рогатый скот (например, коров), коз, овец, жирафов, американского бизона, зубра, яков, азиатского буйвола, оленя, верблюдов, альпак, лам, гиу, антилопу, вилорогую антилопу и антилопу нильгау.

В соответствии с конкретным вариантом осуществления жвачное животное представляет собой корову или быка, например, крупный рогатый скот *Bos taurus* или крупный рогатый скот голштино-фризской породы.

В соответствии с конкретным вариантом осуществления животное, которое подвергают отбору, является новорожденным, как правило, возрастом не более одного года. В соответствии с еще одним вариантом осуществления животное, которое подвергают отбору, имеет возраст не более двух суток. В соответствии с еще одним вариантом осуществления животное, которое подвергают отбору, имеет возраст не более трех суток. В соответствии с еще одним вариантом осуществления животное, которое подвергают отбору, имеет возраст не более 1 недели. В соответствии с еще одним вариантом осуществления животное, которое подвергают отбору, имеет возраст не более 2 недель. В соответствии с еще одним вариантом осуществления животное, которое подвергают отбору, имеет возраст не более 1 месяца. В соответствии с еще одним вариантом осуществления животное, которое подвергают отбору, имеет возраст не более 3 месяцев. В соответствии с еще одним вариантом осуществления животное является взрослым.

Фраза «наследуемый признак» (также называемый «передающимся по наследству признаком») в контексте данного документа относится к признаку, изменчивость по которому у индивидуумов в заданной популяции является обусловленной отчасти (или целиком) генетической вариацией. Вследствие этих генетических вариаций относительная или абсолютная распространенность конкретных популяций микробов в микробиоме (которые служат в качестве маркеров) является сходной от одного поколения к следующему поколению при статистически значимом уровне достоверности.

Микроорганизм может быть классифицирован как наследуемый, когда изменения его распространенности в группе животных могут быть объяснены генетической изменчивостью у животных.

Статистические методы, которые можно применять в контексте настоящего изобретения, включают в себя, без ограничения, подход с однокомпонентной GRM (геномная матрица родства), MAF-стратифицированный GREML (GREMLLMS), LDL- и MAF-стратифицированный GREML (GREMLLLDMS), однокомпонентные и MAF-стратифицированные LD-скорректированные анализы родства (LDAK-SC и LDAK-MS), расширенный генеалогический анализ с GRM со сравнением с пороговыми значениями, сглаживание ковариации Treelet (Treelet Covariance Smoothing) (TCS), регрессию LD-оценки и BOLT-REML.

В соответствии с одним вариантом осуществления признак связан с метаболизмом рубца, причем его примеры включают в себя, без ограничения, соотношение пропионат:ацетат, количество/концентрацию метана в рубце, количество/концентрацию пропионовой кислоты в рубце и количество/концентрацию валериановой кислоты в рубце. Кроме того, признак может представлять собой количество/концентрацию аминокислоты в рубце, такой как глицин, аспарат и тирозин.

В соответствии с еще одним вариантом осуществления признак связан с характерной чертой хозяина, примеры которой включают в себя, без ограничения, количество белка или жира, присутствующего в молоке животного, потребление сухого вещества или эффективность использования корма.

Примеры наследуемых признаков, которые, как показали авторы настоящего изобретения, являются по меньшей мере частично наследуемыми, включают в себя эффективность использования корма, продуцирование метана.

В контексте данного документа термин «эффективность использования корма» относится к способности животного к извлечению энергии из своего корма. Эффективность использования корма представляет собой различие между фактическим потреблением корма животным и прогнозируемым потреблением им корма, исходя из уровня его производительности и массы тела. Таким образом, животное с «высокой» эффективностью использования корма представляет собой животное, которое производит больше молока или имеет массу большую, чем прогнозируемые, исходя из потребления им корма. Животное с «отрицательной» эффективностью использования корма представляет собой животное, которое производит меньше молока или имеет массу меньшую, чем прогнозируемые, исходя

из потребления им корма. В соответствии с одним вариантом осуществления эффективность использования энергии измеряют с применением способа остаточного потребления корма (RFI) (Koch *et al.*, 1963, J Anim Sci, 22, 486- 494), и ее можно рассчитать согласно формулам Национального научно-исследовательского совета (National Research Council) от 2001 года. Ожидаемые значения RFI для каждой коровы можно рассчитать, исходя из уравнения множественной регрессии.

В соответствии с одним вариантом осуществления животное можно классифицировать как имеющее низкое RFI (или высокую эффективность использования корма), когда его RFI по меньшей мере на 0,05 стандартного отклонения ниже среднего RFI в стаде (причем стадо составляет по меньшей мере 15 животных).

В соответствии с одним вариантом осуществления животное можно классифицировать как имеющее низкое RFI (или высокую эффективность использования энергии), когда его RFI по меньшей мере на 0,05 стандартного отклонения ниже среднего RFI в стаде (причем стадо составляет по меньшей мере 15 животных).

В соответствии с одним вариантом осуществления животное можно классифицировать как имеющее низкое RFI (или высокую эффективность использования энергии), когда его RFI по меньшей мере на 1 стандартное отклонение ниже среднего RFI в стаде (причем стадо составляет по меньшей мере 15 животных).

В соответствии с одним вариантом осуществления животное можно классифицировать как имеющее низкое RFI (или высокую эффективность использования энергии), когда его RFI по меньшей мере на 2 стандартных отклонения ниже среднего RFI в стаде, причем стадо составляет по меньшей мере 15 животных.

В соответствии с одним вариантом осуществления животное можно классифицировать как имеющее низкое RFI (или высокую эффективность использования энергии), когда его RFI по меньшей мере на 3 стандартных отклонения ниже среднего RFI в стаде, причем стадо составляет по меньшей мере 15 животных.

В соответствии с одним вариантом осуществления животное можно классифицировать как имеющее низкое RFI (или высокую эффективность использования энергии), когда его RFI по меньшей мере на 4 стандартных отклонения ниже среднего RFI в стаде (причем стадо составляет по меньшей мере 15 животных).

В соответствии с одним вариантом осуществления животное можно классифицировать как имеющее низкое RFI (или высокую эффективность использования энергии), когда его

RFI по меньшей мере на 5 стандартных отклонений ниже среднего RFI в стаде (причем стадо составляет по меньшей мере 15 животных).

В соответствии с одним вариантом осуществления животное можно классифицировать как имеющее низкое RFI (или высокую эффективность использования энергии), когда его RFI по меньшей мере на 6 стандартных отклонений ниже среднего RFI в стаде (причем стадо составляет по меньшей мере 15 животных).

В соответствии с одним вариантом осуществления животное можно классифицировать как имеющее высокое RFI (или низкую эффективность использования корма), когда его RFI по меньшей мере на 0,05 стандартного отклонения выше среднего RFI в стаде (причем стадо составляет по меньшей мере 15 животных).

В соответствии с одним вариантом осуществления животное можно классифицировать как имеющее высокое RFI (или низкую эффективность использования энергии), когда его RFI по меньшей мере на 0,05 стандартного отклонения выше среднего RFI в стаде (причем стадо составляет по меньшей мере 15 животных).

В соответствии с одним вариантом осуществления животное можно классифицировать как имеющее высокое RFI (или низкую эффективность использования энергии), когда его RFI по меньшей мере на 1 стандартное отклонение выше среднего RFI в стаде (причем стадо составляет по меньшей мере 15 животных).

В соответствии с одним вариантом осуществления животное можно классифицировать как имеющее высокое RFI (или низкую эффективность использования энергии), когда его RFI по меньшей мере на 2 стандартных отклонения выше среднего RFI в стаде, причем стадо составляет по меньшей мере 15 животных.

В соответствии с одним вариантом осуществления животное можно классифицировать как имеющее высокое RFI (или низкую эффективность использования энергии), когда его RFI по меньшей мере на 3 стандартных отклонения выше среднего RFI в стаде, причем стадо составляет по меньшей мере 15 животных.

В соответствии с одним вариантом осуществления животное можно классифицировать как имеющее высокое RFI (или низкую эффективность использования энергии), когда его RFI по меньшей мере на 4 стандартных отклонения выше среднего RFI в стаде (причем стадо составляет по меньшей мере 15 животных).

В соответствии с одним вариантом осуществления животное можно классифицировать как имеющее высокое RFI (или низкую эффективность использования энергии), когда его

RFI по меньшей мере на 5 стандартных отклонений ниже среднего RFI в стаде (причем стадо составляет по меньшей мере 15 животных).

В соответствии с одним вариантом осуществления животное можно классифицировать как имеющее высокое RFI (или низкую эффективность использования энергии), когда его RFI по меньшей мере на 6 стандартных отклонений выше среднего RFI в стаде (причем стадо составляет по меньшей мере 15 животных).

В соответствии с одним вариантом осуществления животное можно классифицировать как имеющее низкое RFI (или высокую эффективность использования энергии), когда потребление им сухого вещества (DMI) меньше на 1 кг в сутки, чем прогнозируемое в соответствии с ожидаемым потреблением им корма (рассчитанным в зависимости от массы и производства молока, как описано выше в данном документе).

В соответствии с одним вариантом осуществления животное можно классифицировать как имеющее низкое RFI (или высокую эффективность использования энергии), когда потребление им сухого вещества (DMI) меньше на 2 кг в сутки, чем прогнозируемое в соответствии с ожидаемым потреблением им корма.

В соответствии с одним вариантом осуществления животное можно классифицировать как имеющее низкое RFI (или высокую эффективность использования энергии), когда потребление им сухого вещества (DMI) меньше на 4 кг в сутки, чем прогнозируемое в соответствии с ожидаемым потреблением им корма.

В соответствии с одним вариантом осуществления животное можно классифицировать как имеющее низкое RFI (или высокую эффективность использования энергии), когда потребление им сухого вещества (DMI) меньше на 8 кг в сутки, чем прогнозируемое в соответствии с ожидаемым потреблением им корма.

В соответствии с одним вариантом осуществления животное можно классифицировать как имеющее низкое RFI (или высокую эффективность использования энергии), когда потребление им сухого вещества (DMI) меньше на 16 кг в сутки, чем прогнозируемое в соответствии с ожидаемым потреблением им корма.

В соответствии с одним вариантом осуществления животное можно классифицировать как имеющее низкое RFI (или высокую эффективность использования энергии), когда потребление им сухого вещества (DMI) меньше на 32 кг в сутки, чем прогнозируемое в соответствии с ожидаемым потреблением им корма.

В соответствии с одним вариантом осуществления животное можно классифицировать как имеющее низкое RFI (или высокую эффективность использования

энергии), когда оно производит в 1,5 раза большее количество молока, или его масса в 1,5 раза больше массы, которую прогнозируют в соответствии с потреблением им корма.

В соответствии с одним вариантом осуществления животное можно классифицировать как имеющее низкое RFI (или высокую эффективность использования энергии), когда оно производит в 2 раза большее количество молока, или его масса в 2 раза больше массы, которую прогнозируют в соответствии с потреблением им корма.

В соответствии с одним вариантом осуществления животное можно классифицировать как имеющее низкое RFI (или высокую эффективность использования энергии), когда оно производит в 2,5 раза большее количество молока, или его масса в 2,5 раза больше массы, которую прогнозируют в соответствии с потреблением им корма.

В соответствии с одним вариантом осуществления животное можно классифицировать как имеющее низкое RFI (или высокую эффективность использования энергии), когда оно производит в 3 раза большее количество молока, или его масса в 3 раза больше массы, которую прогнозируют в соответствии с потреблением им корма.

В соответствии с одним вариантом осуществления животное можно классифицировать как имеющее низкое RFI (или высокую эффективность использования энергии), когда оно производит в 3,5 раза большее количество молока, или его масса в 3,5 раза больше массы, которую прогнозируют в соответствии с потреблением им корма.

В соответствии с одним вариантом осуществления животное можно классифицировать как имеющее низкое RFI (или высокую эффективность использования энергии), когда оно производит в 4 раза большее количество молока, или его масса в 4 раза больше массы, которую прогнозируют в соответствии с потреблением им корма.

В соответствии с одним вариантом осуществления животное можно классифицировать как имеющее низкое RFI (или высокую эффективность использования энергии), когда оно производит в 4,5 раза большее количество молока, или его масса в 4,5 раза больше массы, которую прогнозируют в соответствии с потреблением им корма.

В соответствии с одним вариантом осуществления животное можно классифицировать как имеющее низкое RFI (или высокую эффективность использования энергии), когда оно производит в 5 раз большее количество молока, или его масса в 5 раз больше массы, которую прогнозируют в соответствии с потреблением им корма.

Термин «продуцирование метана» относится к количеству метана, выделяемого животными самими по себе или продуцируемого микробиомом. Его можно измерять в

единицах, представляющих собой г (граммы) в сутки или г на кг потребленного сухого вещества.

В соответствии с одним вариантом осуществления животное можно классифицировать как «продуцент большого количества метана», когда продуцирование им метана по меньшей мере на 0,05 стандартного отклонения выше среднего продуцирования метана в стаде.

В соответствии с одним вариантом осуществления животное можно классифицировать как «продуцент большого количества метана», когда продуцирование им метана по меньшей мере на 0,5 стандартного отклонения выше среднего продуцирования метана в стаде.

В соответствии с одним вариантом осуществления животное можно классифицировать как «продуцент большого количества метана», когда продуцирование им метана по меньшей мере на 1 стандартное отклонение выше среднего продуцирования метана в стаде.

В соответствии с одним вариантом осуществления животное можно классифицировать как «продуцент большого количества метана», когда продуцирование им метана по меньшей мере на 2 стандартных отклонения выше среднего продуцирования метана в стаде.

В соответствии с одним вариантом осуществления животное можно классифицировать как «продуцент большого количества метана», когда продуцирование им метана по меньшей мере на 3 стандартных отклонения выше среднего продуцирования метана в стаде.

В соответствии с одним вариантом осуществления животное можно классифицировать как «продуцент большого количества метана», когда продуцирование им метана по меньшей мере на 4 стандартных отклонения выше среднего продуцирования метана в стаде.

В соответствии с одним вариантом осуществления животное можно классифицировать как «продуцент большого количества метана», когда продуцирование им метана по меньшей мере на 5 стандартных отклонений выше среднего продуцирования метана в стаде.

В соответствии с одним вариантом осуществления животное можно классифицировать как «продуцент большого количества метана», когда продуцирование им метана по меньшей мере на 6 стандартных отклонений выше среднего продуцирования метана в стаде.

Термин «продуцирование малого количества метана» относится к количеству, составляющему менее 100 г в сутки или 10 г на кг потребленного сухого вещества, продуцируемому в микробиоме (например, микробиоме рубца/фекальном микробиоме) животного.

В соответствии с одним вариантом осуществления животное можно классифицировать как «продуцент малого количества метана», когда продуцирование им метана по меньшей мере на 0,05 стандартного отклонения ниже среднего продуцирования метана в стаде.

В соответствии с одним вариантом осуществления животное можно классифицировать как «продуцент малого количества метана», когда продуцирование им метана по меньшей мере на 0,5 стандартного отклонения ниже среднего продуцирования метана в стаде.

В соответствии с одним вариантом осуществления животное можно классифицировать как «продуцент малого количества метана», когда продуцирование им метана по меньшей мере на 1 стандартное отклонение ниже среднего продуцирования метана в стаде.

В соответствии с одним вариантом осуществления животное можно классифицировать как «продуцент малого количества метана», когда продуцирование им метана по меньшей мере на 2 стандартных отклонения ниже среднего продуцирования метана в стаде.

В соответствии с одним вариантом осуществления животное можно классифицировать как «продуцент малого количества метана», когда продуцирование им метана по меньшей мере на 3 стандартных отклонения ниже среднего продуцирования метана в стаде.

В соответствии с одним вариантом осуществления животное можно классифицировать как «продуцент малого количества метана», когда продуцирование им метана по меньшей мере на 4 стандартных отклонения ниже среднего продуцирования метана в стаде.

В соответствии с одним вариантом осуществления животное можно классифицировать как «продуцент малого количества метана», когда продуцирование им метана по меньшей мере на 5 стандартных отклонений ниже среднего продуцирования метана в стаде.

В соответствии с одним вариантом осуществления животное можно классифицировать как «продуцент малого количества метана», когда продуцирование им метана по меньшей мере на 6 стандартных отклонений ниже среднего продуцирования метана в стаде.

Термин «микробиом» в контексте данного документа относится ко всей совокупности микробов (бактерий, грибов, простейших), их генетических элементов (геномов) в определенном окружении.

Образец микробиоты содержит образец микробов и или их компонентов или продуктов из микробиома.

В соответствии с конкретным вариантом осуществления микробиом представляет собой микробиом рубца. В соответствии с другими вариантами осуществления микробиом представляет собой фекальный микробиом.

В соответствии с еще одним вариантом осуществления микробиом получен от здорового животного (т.е. микробиом представляет собой непатогенный микробиом).

Для того чтобы анализировать микробы в микробиоме, собирают образец микробиоты от животного. Это осуществляют с помощью любых средств, которые обеспечивают

возможность выделения микробов или их компонентов или продуктов микробиома и являются подходящими для соответствующего источника микробиома, например, рубца.

Рубец можно собирать с применением способов, известных в уровне техники, и они включают в себя, например, применение желудочного зонда с вакуумным пробоотборником из рубца. Как правило, рубец собирают после кормления.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления вместо анализа образца рубца применяют образец фекалий, который отражает микробиом рубца. Следовательно, в соответствии с этим вариантом осуществления анализируют фекальный микробиом.

В соответствии с одним вариантом осуществления этого аспекта настоящего изобретения анализируют распространенность конкретных бактериальных таксонов в образце микробиоты.

Способы количественного определения уровней микробов (например, бактерий) из различных таксонов описаны в данном документе ниже.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления определение уровня или набора уровней одного или нескольких типов микробов или их компонентов или продуктов предусматривает определение уровня или набора уровней одной или нескольких последовательностей ДНК. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления одна или несколько последовательностей ДНК содержат любую последовательность ДНК, которую можно применять для установления различий между отличающимися типами микробов. В соответствии с определенными вариантами осуществления одна или несколько последовательностей ДНК содержат последовательности гена 16S рРНК. В соответствии с определенными вариантами осуществления одна или несколько последовательностей ДНК содержат последовательности гена 18S рРНК. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления амплифицируют 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 50, 100, 1000, 5000 или больше последовательностей.

Таксономическое выделение вида можно осуществлять с применением подходящей компьютерной программы (например, BLAST) при сравнении с подходящей справочной базой данных (например, со справочной базой данных 16S рРНК).

При определении того, является ли нуклеиновая кислота или белок, по существу, гомологичными или имеют определенный процент идентичности последовательности с последовательностью согласно настоящему изобретению, сходство последовательности можно определить с помощью общепринятых алгоритмов, которые, как правило, позволяют введение небольшого количества гэпов для того, чтобы достичь наилучшего соответствия. В

частности, «процентную идентичность» двух полипептидов или двух последовательностей нуклеиновой кислоты определяют с применением алгоритма из Karlin and Altschul (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:2264-2268, 1993). Такой алгоритм встроен в программы BLASTN и BLASTX в Altschul et al. (J. Mol. Biol. 215:403-410, 1990). Поиски нуклеотидов с помощью BLAST можно осуществлять с использованием программы BLASTN для получения нуклеотидных последовательностей, гомологичных молекуле нуклеиновой кислоты согласно настоящему изобретению. В равной степени, поиски белков с помощью BLAST можно осуществлять с использованием программы BLASTX для получения аминокислотных последовательностей, которые являются гомологичными полипептиду согласно настоящему изобретению. Для получения выравниваний с гэпами с целью сравнения можно использовать Gapped BLAST, как описано в Altschul et al. (Nucleic Acids Res. 25:3389-3402, 1997). При использовании программ BLAST и Gapped BLAST используют параметры по умолчанию в соответствующих программах (например, BLASTX и BLASTN).

В соответствии с одним вариантом осуществления для того, чтобы классифицировать микроба как относящегося к конкретному роду, он должен характеризоваться по меньшей мере 90% гомологией последовательности, по меньшей мере 91% гомологией последовательности, по меньшей мере 92% гомологией последовательности, по меньшей мере 93% гомологией последовательности, по меньшей мере 94% гомологией последовательности, по меньшей мере 95% гомологией последовательности, по меньшей мере 96% гомологией последовательности, по меньшей мере 97% гомологией последовательности, по меньшей мере 98% гомологией последовательности, по меньшей мере 99% гомологией последовательности с эталонным микробом, который, как известно, относится к конкретному роду. В соответствии с конкретным вариантом осуществления гомология последовательности составляет собой по меньшей мере 95%.

В соответствии с еще одним вариантом осуществления для того, чтобы классифицировать микроба как относящегося к конкретному виду, он должен характеризоваться по меньшей мере 90% гомологией последовательности, по меньшей мере 91% гомологией последовательности, по меньшей мере 92% гомологией последовательности, по меньшей мере 93% гомологией последовательности, по меньшей мере 94% гомологией последовательности, по меньшей мере 95% гомологией последовательности, по меньшей мере 96% гомологией последовательности, по меньшей мере 97% гомологией последовательности, по меньшей мере 98% гомологией последовательности, по меньшей мере 99% гомологией последовательности с эталонным микробом, который, как известно,

относится к конкретному виду. В соответствии с конкретным вариантом осуществления гомология последовательности составляет собой по меньшей мере 97 %.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления образец микробиоты, подвергаемый непосредственному анализу в отношении уровня или набора уровней одной или нескольких последовательностей ДНК. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления ДНК выделяют из образца микробиоты, и выделенную ДНК подвергают анализу в отношении уровня или набора уровней одной или нескольких последовательностей ДНК. Способы выделения микробной ДНК являются хорошо известными в уровне техники. Примеры включают, без ограничения, экстракцию смесью фенол-хлороформ и широкий спектр коммерчески доступных наборов, в том числе набор QIAamp DNA Stool Mini Kit (Qiagen, Валенсия, Калифорния, США).

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления уровень или набор уровней одного или нескольких последовательностей ДНК определяют посредством амплификации последовательностей ДНК с применением ПЦР (например, стандартной ПЦР, полуколичественной или количественной ПЦР). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления уровень или набор уровней одной или нескольких последовательностей ДНК определяют посредством амплификации последовательностей ДНК с применением количественной ПЦР. Эти и другие основные процедуры амплификации ДНК хорошо известны практикующим специалистам в данной области техники и описаны в Ausebel et al. (Ausubel F M, Brent R, Kingston R E, Moore D, Seidman J G, Smith J A, Struhl K (eds). 1998. *Current Protocols in Molecular Biology*. Wiley: New York).

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления последовательности ДНК амплифицируют с применением праймеров, специфических в отношении одной или нескольких последовательностей, которые отличают отдельные типы микробов от других отличающихся типов микробов. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления последовательности гена 16S рРНК или их фрагменты амплифицируют с применением праймеров, специфических в отношении последовательностей гена 16S рРНК. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления последовательности ДНК 18S амплифицируют с применением праймеров, специфических в отношении последовательностей ДНК 18S.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления уровень или набор уровней одной или нескольких последовательностей гена 16S рРНК определяют с применением технологии филочипов (PhyloChip). Применение филочипов хорошо известно в уровне

техники и описано в Hazen et al. ("Deep-sea oil plume enriches indigenous oil-degrading bacteria." *Science*, 330, 204-208, 2010), при этом полное содержание данного источника включено посредством ссылки. Вкратце, последовательности генов 16S рРНК амплифицируют и метят из ДНК, экстрагированной из образца микробиоты. Амплифицированная ДНК затем гибридизируется с матрицей, содержащей зонды для генов микробной 16S рРНК. Уровень связывания с каждым зондом затем определяют количественно, обеспечивая уровень образца типа микроба, соответствующего выявленной с помощью зонда последовательности гена 16S рРНК. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления анализ с помощью филочипов осуществляет коммерческий поставщик. Примеры включают в себя, без ограничения, Second Genome Inc. (Сан-Франциско, Калифорния).

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления определение уровня или набора уровней одного или нескольких типов микробов или их компонентов или продуктов предусматривает определение уровня или набора уровней одной или нескольких молекул микробной РНК (например, транскриптов). Способы количественного определения уровней транскриптов РНК являются хорошо известными в уровне техники и включают в себя, без ограничения, анализ методом Нозерн-блоттинга, полуколичественной ПЦР с обратной транскриптазой, количественной ПЦР с обратной транскриптазой и анализа на микроматрицах. Эти и другие основные процедуры выявления РНК транскрипта описаны в Ausubel et al. (Ausubel F M, Brent R, Kingston R E, Moore D D, Seidman J G, Smith J A, Struhl K (eds). 1998. *Current Protocols in Molecular Biology*. Wiley: New York).

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления определение уровня или набора уровней одного или нескольких типов микробов или их компонентов или продуктов предусматривает определение уровня или набора уровней одного или нескольких микробных белков. Способы количественного определения уровней белка являются хорошо известными в уровне техники и включают в себя, без ограничения, анализ методом Вестерн-блоттинга и масс-спектрометрию. Эти и все другие основные процедуры выявления описаны в Ausubel et al. (Ausubel F M, Brent R, Kingston R E, Moore D D, Seidman J G, Smith J A, Struhl K (eds). 1998. *Current Protocols in Molecular Biology*. Wiley: New York). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления определение уровня или набора уровней одного или нескольких типов микробов или их компонентов или продуктов предусматривает определение уровня или набора уровней одного или нескольких метаболитов. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления уровни метаболитов определяют с помощью масс-спектрометрии.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления уровни метаболитов определяют с помощью ядерной магнитно-резонансной спектроскопии. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления уровни метаболитов определяют с помощью твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления уровни метаболитов определяют с помощью колориметрии. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления уровни метаболитов определяют с помощью спектрофотометрии.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления определяют, каким является распределение семейств микробов в микробиоме. Тем не менее, характеристику можно выполнять на более детальных уровнях, например, на уровне рода и/или вида, и/или на уровне штамма или вариации (например, варианты) в пределах вида, если необходимо (в том числе в отношении присутствия или отсутствия различных генетических элементов, таких как гены, присутствия или отсутствия плазмид и т.д.). В качестве альтернативы, можно применять более высокие таксономические категории, такие как тип, класс или отряд. Цель заключается в идентификации того, какие микробы (обычно бактерии, но также, необязательно, грибы (например, дрожжи), простейшие и т.д.) присутствуют в образце от жвачного животного, а также относительных распределений этих микробов, например, выраженных в виде процента от общего количества микробов, которые присутствуют, таким образом устанавливая паттерн или характерный профиль микробов для исследуемого животного.

В соответствии с другими вариантами осуществления настоящего изобретения, когда рассматривают много таксонов, оценивают общий паттерн микрофлоры, т.е. идентифицируют не только конкретные таксоны, но и учитывают процент каждого составляющего таксона по сравнению со всеми таксонами, которые выявляют, и, обычно или необязательно, соотношение между ними. Специалисты в данной области техники поймут, что существует много возможных способов выражения или компилирования таких данных, все из которых включены в настоящее изобретение. Например, формат «круговой диаграммы» можно применять для описания профиля микрофлоры; или отношения могут быть выражены в числовом виде или графически в виде соотношений или процентных отношений всех выявленных таксонов и т.д. Кроме того, данные могут подвергаться манипуляции для того, чтобы рассматривались только выбранные подгруппы таксонов (например, ключевые показатели с сильными положительными корреляциями). Данные

могут быть выражены, например, в процентах от общего количества выявленных микробов или в виде массовых процентов и т.д.

Способы анализа сходства генетического окружения у двух жвачные животные можно осуществлять с применением анализов генотипирования, известных в уровне техники.

В контексте данного документа термин «генотипирование» относится к процессу определения генетических вариаций у индивидуумов вида. Однонуклеотидные полиморфизмы (SNP) представляют собой наиболее распространенный тип генетической вариации, который применяют для генотипирования, и по определению они представляют собой различия по одному основанию в конкретном локусе, которые обнаруживаются у более чем 1% популяции. SNP обнаруживаются как в кодирующих, так и в некодирующих участках генома, и они могут быть ассоциированы с представляющим интерес фенотипическим признаком, таким как представляющий интерес количественный фенотипический признак. Следовательно, SNP можно применять в качестве маркеров для представляющих интерес количественных фенотипических признаков. Еще один распространенный тип генетической вариации, который применяют для генотипирования, представляют собой «InDels» или вставки и делеции нуклеотидов переменной длины. В случае генотипирования как SNP, так и InDel существует много способов для определения генотипа у индивидов. Выбранный способ обычно зависит от необходимой пропускной способности, которая зависит как от числа генотипируемых индивидов, так и от числа исследуемых генотипов для каждого индивида. Выбранный способ также зависит от количества материала в образце, доступном от каждого индивида или образца. Например, секвенирование можно применять для определения присутствия или отсутствия маркеров, таких как SNP, например, такие технологии секвенирования, как секвенирование по Сенгеру и высокопроизводительное секвенирование (HTS). Секвенирование по Сенгеру может включать секвенирование с выявлением посредством (капиллярного) электрофореза, при котором до 384 капилляров можно анализировать в ходе секвенирования за один проход. Высокопроизводительное секвенирование включает параллельное секвенирование тысяч или миллионов или большего числа последовательностей за один раз. HTS можно определить как секвенирование «второго» поколения, т.е. методики, основывающиеся на твердофазном пиросеквенировании, или как секвенирование «третьего» поколения (Next-Next Generation sequencing), основывающееся на секвенировании отдельных нуклеотидов в реальном масштабе времени (SMRT). Доступны технологии HTS, такие как предлагаемые компаниями Roche, Illumina и Applied Biosystems (Life Technologies). Дополнительные технологии

высокопроизводительного секвенирования описаны и/или доступны от компаний Helicos, Pacific Biosciences, Complete Genomics, Ion Torrent Systems, Oxford Nanopore Technologies, Nabsys, ZS Genetics, GnuBio. Каждая из этих технологий секвенирования имеет свой собственный способ подготовки до фактической стадии секвенирования. Эти стадии могут быть включены в способ высокопроизводительного секвенирования. В определенных случаях стадии, которые являются специфическими для стадии секвенирования, можно интегрировать в протокол подготовки образца до фактической стадии секвенирования из соображений эффективности или экономии. Например, адаптеры, которые лигированы с фрагментами, могут содержать секции, которые можно применять в последующих стадиях секвенирования (так называемые адаптеры для секвенирования). Праймеры, которые применяют для амплификации подгруппы фрагментов перед секвенированием, могут содержать в своей последовательности части, которые вводят секции, которые можно в дальнейшем применять на стадии секвенирования, например, при введении в ходе стадии амплификации адаптера для секвенирования или захватывающего фрагмента в ампликон, который можно применять на последующей стадии секвенирования. Стадии амплификации можно опустить в зависимости от применяемой технологии секвенирования.

Для применения с настоящим изобретением предполагаются чипы с низкой плотностью и высокой плотностью, в том числе матрицы для определения SNP, содержащие от 3000 до 800000 SNP. В качестве примера, с помощью чипа для «50К» SNP измеряют примерно 50000 SNP, и его обычно применяют в промышленном животноводстве для установления генетического качества или показателей геномной оценки племенной ценности (GEBV). В соответствии с определенными вариантами осуществления настоящего изобретения можно применять любой из следующих чипов для определения SNP: BovineSNP50 v1 BeadChip (Illumina), Bovine SNP v2 BeadChip (Illumina), Bovine 3K BeadChip (Illumina), Bovine LD BeadChip (Illumina), Bovine HD BeadChip (Illumina), Geneseek<sup>RTM</sup> Genomic Profiler<sup>TM</sup> LD BeadChip или Geneseek<sup>RTM</sup> Genomic Profiler<sup>TM</sup> HD BeadChip.

В соответствии с одним вариантом осуществления для того чтобы измерить генетическое сходство между животными рассчитывают генетическое родство между животными на основании данных SNP. С этой целью можно получить матрицу, которая оценивает генетическое родство в каждой отдельной паре животных. Эта матрица основывается на подсчитанном количестве общих аллелей, взвешенном по редкости аллеля:

$$A_{jk} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n \left( \frac{(x_{ij} - 2p_i)(x_{ik} - 2p_i)}{2p_i(1-p_i)} \right), \text{ где } A_{jk} \text{ представляет собой оценку генетического}$$

родства между животными  $j$  и  $k$ ;  $x_{ij}$  и  $x_{ik}$  представляют собой подсчитанные количества эталонных аллелей у животных  $j$  и  $k$ , соответственно;  $p_i$  представляет собой долю эталонного аллеля в популяции; и  $n$  представляет собой общее количество SNP, применяемых для оценки родства.

Для того чтобы идентифицировать виды микробов, у которых значительные доли их вариации в профилях распространенности могут объясняться наследуемыми генетическими факторами, образец микробиоты анализируют таким образом, чтобы обнаружить таксоны (например, виды) микробов, демонстрирующие подобную распространенность (или абсолютную, или относительную) у животных, которые имеют сходное генетическое окружение.

В соответствии с одним вариантом осуществления микробы или OTU, которые демонстрируют существенную наследуемую составляющую, рассматривают как таковые, если их оценка наследуемости составляет  $>0,01$ , и  $P$ -значение составляет  $<0,1$ . Будет понятно, что уровень достоверности можно повысить или понизить в соответствии с точностью теста. Таким образом, например, в соответствии с еще одним вариантом осуществления микробов, которые демонстрируют существенную наследуемую составляющую, рассматривают как таковых, если их оценка наследуемости составляет  $>0,01$ , и  $P$ -значение составляет  $<0,05$ . Другие предполагаемые оценки наследуемости, предполагаемые авторами настоящего изобретения, включают в себя  $>0,02$  и  $P$ -значение  $<0,1$ ,  $>0,03$  и  $P$ -значение  $<0,1$ ,  $>0,04$  и  $P$ -значение  $<0,1$ ,  $>0,05$  и  $P$ -значение  $<0,1$ ,  $>0,06$  и  $P$ -значение  $<0,1$ ,  $>0,07$  и  $P$ -значение  $<0,1$ ,  $>0,08$  и  $P$ -значение  $<0,1$ ,  $>0,09$  и  $P$ -значение  $<0,1$ ,  $>0,1$  и  $P$ -значение  $<0,1$ ,  $>0,2$  и  $P$ -значение  $<0,1$ ,  $>0,3$  и  $P$ -значение  $<0,1$ ,  $>0,4$  и  $P$ -значение  $<0,1$ ,  $>0,5$  и  $P$ -значение  $<0,1$ ,  $>0,6$  и  $P$ -значение  $<0,1$ ,  $>0,7$  и  $P$ -значение  $<0,1$ ,  $>0,8$  и  $P$ -значение  $<0,1$ .

Другие предполагаемые оценки наследуемости, предполагаемые авторами настоящего изобретения, включают в себя  $>0,02$  и  $P$ -значение  $<0,05$ ,  $>0,03$  и  $P$ -значение  $<0,05$ ,  $>0,04$  и  $P$ -значение  $<0,05$ ,  $>0,05$  и  $P$ -значение  $<0,05$ ,  $>0,06$  и  $P$ -значение  $<0,05$ ,  $>0,07$  и  $P$ -значение  $<0,05$ ,  $>0,08$  и  $P$ -значение  $<0,05$ ,  $>0,09$  и  $P$ -значение  $0,05$ ,  $>0,1$  и  $P$ -значение  $0,05$ ,  $>0,2$  и  $P$ -значение  $0,05$ ,  $>0,3$  и  $P$ -значение  $0,05$ ,  $>0,4$  и  $P$ -значение  $0,05$ ,  $>0,5$  и  $P$ -значение  $0,05$ ,  $>0,6$  и  $P$ -значение  $0,05$ ,  $>0,7$  и  $P$ -значение  $0,05$ ,  $>0,8$  и  $P$ -значение  $0,05$ .

В соответствии с конкретным вариантом осуществления оценка наследуемости составляет  $>0,7$ , и  $P$ -значение составляет  $<0,05$ .

Для повышения достоверности анализа наследуемости можно ограничить исключительно бактериальными таксонами, которые присутствуют по меньшей мере у 20%, 25%, 30%, 40%, 50% или большей части генотипируемой популяции. Кроме того, анализы наследуемости для каждого бактериального таксона можно осуществлять несколько раз, например, в несколько разных суток для забора образцов (например, 2, 3, 4, 5 или больше суток). Только бактериальные таксоны, которые демонстрировали существенную наследуемую составляющую (например, оценку наследуемости, составляющую  $>0,7$  и  $p$ -значение  $<0,05$ ) во все отдельные сутки для отбора образцов, можно рассматривать как наследуемые.

В соответствии с одним вариантом осуществления наследуемые бактерии относятся к типу Bacteroidetes и/или Firmicutes, причем количество типа является показателем того, имеет ли животное желаемый наследуемый признак.

В соответствии с еще одним вариантом осуществления наследуемая бактерия относится к отряду Bacteroidales и/или Clostridiales, причем количество типа является показателем того, имеет ли животное желаемый наследуемый признак.

Как упоминалось, при осуществлении процедур, описанных выше в данном документе, авторы настоящего изобретения идентифицировали 22 OTU, которые соответствовали критериям наследуемых.

Термин «OTU» в контексте данного документа относится к терминальному листу в филогенетическом дереве и определен последовательностью нуклеиновой кислоты, например, полным геномом или специфической геновой последовательностью и всеми последовательностями, которые имеют идентичность последовательности с этой последовательностью нуклеиновой кислоты на уровне вида. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления конкретная геновая последовательность может представлять собой последовательность 16S или часть последовательности 16S. В соответствии с другими вариантами осуществления полные геномы двух организмов секвенируют и сравнивают. В соответствии с еще одним вариантом осуществления генетическому сравнению можно подвергать выбранные участки, такие как метки на основе мультилокусных последовательностей (MLST), конкретные гены или наборы генов. В соответствии с вариантами осуществления 16S OTU, которые имеют более чем 97% среднюю идентичность нуклеотидов по всей 16S или по некому вариабельному участку 16S, рассматривают как одну и ту же OTU. См., например, Claesson et al., 2010. Comparison of two next-generation sequencing technologies for resolving highly complex microbiota composition using tandem

variable 16S rRNA gene regions. *Nucleic Acids Res* 38: e200. Konstantinidis et al., 2006. The bacterial species definition in the genomic era. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 361: 1929-1940. В вариантах осуществления, включающих полный геном, MLST, конкретные гены, отличные от 16S, или наборы генов, OTU, которые имеют более чем 95% среднюю идентичность нуклеотидов, считаются одной и той же OTU. См., например, Achtman and Wagner. 2008. Microbial diversity and the genetic nature of microbial species. *Nat. Rev. Microbiol.* 6: 431-440; Konstantinidis et al., 2006, выше. The bacterial species definition in the genomic era. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 361: 1929-1940. OTU можно определить посредством сравнения последовательностей между организмами. Обычно последовательности с менее чем 95% идентичностью последовательности не рассматриваются как формирующие часть одной и той же OTU. OTU также могут характеризоваться любой комбинацией нуклеотидных маркеров или генов, в частности, высококонсервативных генов (например, генов «домашнего хозяйства») или их комбинацией. При такой характеристике используют, например, данные WGS или последовательность полного генома. В контексте данного документа «тип» бактерии относится к OTU, которая может находиться на уровне штамма, вида, клады или семейства.

В соответствии с одним вариантом осуществления OTU изложена в таблице 1 в данном документе ниже.

Таблица 1

<p>&gt;denovo103806 k__Bacteria; p__Bacteroidetes; c__Bacteroidia; o__Bacteroidales; SEQ ID NO: 1 TGAGGAATATTGGTCAATGGACGGAAGTCTGAACCAGCCATGCCGCGTGAAGGAAGAA TGCCCTATGGGTTGTAAACTTCTTTTGCCGCAGAGTAATAAGGGGCGTGCGCGCCCCGA TGAGAGTATGCGGCGAATAAGCATCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACG GAGGATGCGAGCGTTATCCGGATTTATTGGGTTTAAAGGGTGCAGGCGGACAGCTA AGTCAGCGGTGAAATAT</p>
<p>&gt;denovo113091 k__Bacteria; p__Bacteroidetes; c__Bacteroidia; o__Bacteroidales; SEQ ID NO: 2 TGAGGAATATTGGACAATGGCCGAGAGGCTGATCCAGCCATGCCGCGTGCGGGAAGAC GGCCCTATGGGTTGTAAACCGCTTTTGTTCGGGGAGCAATAAGGTCCACGCGTGGACTGA TGAGAGTACCTGGCGAATAAGCATCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACG GAGGATGCAAGCGTTATCCGGATTTATTGGGTTTAAAGGGTGCAGTAGGCGGCGAGGTA AGCGTGAGGTGAAAGCT</p>
<p>&gt;denovo21902 k__Bacteria; p__Firmicutes; c__Clostridia; o__Clostridiales; SEQ ID NO: 3 TGGGGAATATTGGGCAATGGGGGGAACCCTGACCCAGCAACGCCGCGTGGAGGAAGA AGGTCTTCGGATCGTAAACTCCTGTCCTAAGAGACGAGCAGGAGACGGTAACTTAGGA GGAAGCCCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGGGCAAGCGTTG TCCGGAATGATTGGGCGTAAAGGGCGCGTAGGCGGCCGCAGAAGTCTGAAGTGAATA CCCGCTTTCAAGGTGGGTA</p>
<p>&gt;denovo246439 k__Bacteria; p__Bacteroidetes; c__Bacteroidia; o__Bacteroidales; SEQ ID NO: 4 TGAGGAATATTGGTCAATGGGCGGAAGCCTGAACCAGCCATGCCGCGTGTGGGAAGAA GGCCCTATGGGTTGTAAACCACTTTTAGCCGGGAGTAATAAGGGGCGTGCGCGCCCCG ATGAGAGTACCGGCGGAATAAGCATCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATAC GGAGGATGCAAGCGTTATCCGGATTTATTGGGTTTAAAGGGTGCAGTAGGCGGACCGTT AAGTCAGCGGTGAAAGGT</p>
<p>&gt;denovo311676 k__Bacteria; p__Bacteroidetes; c__Bacteroidia; o__Bacteroidales; SEQ ID NO: 5 TGAGGAATATTGGTCAATGGACGGAAGTCTGAACCAGCCATGCCGCGTGCGGGAAGAC GGCCCTATGGGTTGTAAACCGCTTTTCCCCGGGAGTAATAAGGCCCGTGCGCGGGCCGA TGAGAGTACCGGGGGAATAAGCATCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACG</p>

GAGGATGCAAGCGTTATCCGGATTTATTGGGTTTAAAGGGTGCGTAGGCGGACCGTTA AGTCAGCGGTGAAATGT
>denovo443895 k__Bacteria; p__Firmicutes; c__Clostridia; o__Clostridiales; SEQ ID NO: 6 TGGGGAATATTGGGCAATGGGCGAAAGCCTGACCCAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAA GGCCTTCGGGTTGTAAAGCTCTGTTATAGTTGACGAAGGAAGTGACGGTAGGCTATAA GGAAGCCCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGGGCGAGCGTTG TCCGGAATGACTGGGCGTAAAGGGCGTGTAGGCGGTCATTTAAGTCTGGAGTGAAAGT CCTGCATTCAATGTGGGA
>denovo462168 k__Bacteria; p__Firmicutes; c__Clostridia; o__Clostridiales; f__Veillonellaceae; g__Succiniclasticum; SEQ ID NO: 7 TGGGGAATCTTCCGCAATGGGCGCAAGCCTGACGGAGCAACGCCGCGTGGGTGAGGAA GTTCTTCGGAACGTAAAGCCCTGTTGTACATGACGAACGTGTATCCTATCAACAACGGG ATGCAATGACGGTAGTGTACGAGGAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGT AATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCATGTAGGCGGT GATGTAAGTCTGTCTGTG
>denovo467472 k__Bacteria; p__Bacteroidetes; c__Bacteroidia; o__Bacteroidales; SEQ ID NO: 8 TGAGGAATATTGGACAATGGCCGAGAGGCTGATCCAGCCATGCCGCGTGCGGGAAGAC GGCCCTATGGGTTGTAAACCGCTTTTGTGGAGAGCAATAAGAGTCACGTGTGACTTGA TGAGAGTATCCAGCGAATAAGCATCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACG GAGGATGCGAGCGTTATCCGGATTTATTGGGTTTAAAGGGTGCGTAGGCGGATGATTA AGCGTGAGGTGAAATGC
>denovo475173 k__Bacteria; p__Bacteroidetes; c__Bacteroidia; o__Bacteroidales; f__Prevotellaceae; g__Prevotella; SEQ ID NO: 9 TGAGGAATATTGGTCAATGGGCGAGAGCCTGAACCAGCCAAGTAGCGTGCAGGATGAC GGCCCTATGGGTTGTAACTGCTTTTGCATGGGAATAAAGTGCGGGACGCGTCCCGTTT TGTATGTACCATGAGAATAAGGACCGGCTAATCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACG GAAGGTCCGGGCGTTATCCGGATTTATTGGGTTTAAAGGGAGCGCAGGCTGGAGATTA AGCGTGACGTGAAATGC
>denovo582030 k__Bacteria; p__Bacteroidetes; c__Bacteroidia; o__Bacteroidales; SEQ ID NO: 10 TGAGGAATATTGGTCAATGGGCGGAAGCCTGAACCAGCCAAGTCGCGTGAAGGATGAA

GGCATTATGTGTTGTAAACTTCTTTAGCTGTGGAGAAATAAGGTGGTCGAGACCACCGA  
 TGCTAGTACACAGAGAATAAGGATCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACG  
 GAGGATCCGAGCGTTATCCGGATTCATTGGGTTTAAAGGGTGCAGGCGGTGCCTTAA  
 GTCAGCGGTAAAATCG

>denovo610253 k\_\_Bacteria; p\_\_Bacteroidetes; c\_\_Bacteroidia; o\_\_Bacteroidales; f\_\_S24-7; SEQ  
 ID NO: 11

TGAGGAATATTGGTCAATGGGCGGTAGCCTGAACCAGCCAAGTCGCGTGCGGGAAGAA  
 GGCCCTACGGGTCGTAAACCGCTTTTGTTCGGGGAGCAAAGTGCGCCACGTGTGGTGTAT  
 TGCGAGTACCCGAAGAAAAAGCATCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACG  
 GAGGATGCGAGCGTTATCCGGATTTATTGGGTTTAAAGGGTGCAGGCGGCGCGTCA  
 AGTCAGCGGTCAAATG

>denovo65476 k\_\_Bacteria; p\_\_Bacteroidetes; c\_\_Bacteroidia; o\_\_Bacteroidales;  
 f\_\_Prevotellaceae; g\_\_Prevotella; SEQ ID NO: 12

TTCGGCATATTGGTCAATGGGCGCGAGCCTGAACCAGCCAAGTAGCGTGCAGGATGAC  
 GGCCCTATGGGTTGTAAACTGCTTTTATATAGGGATAAAGTCGGGGACGTGTCCCCGTT  
 TGTAGTACTATATGAATAAGGACCGGCTAATCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACG  
 GAAGGTCCGGGCGTTATCCGGATTTATTGGGTTTAAAGGGAGCGCAGGCCGGAGGCTA  
 AGCGTGACGTGAAATGT

>denovo67695 k\_\_Bacteria; p\_\_Bacteroidetes; c\_\_Bacteroidia; o\_\_Bacteroidales; SEQ ID NO: 13

TGAGGAATATTGGACAATGGCCGAAAGGCTGATCCAGCCATGCCGCGTGCGGGAAGAC  
 GGCCCTATGGGTTGTAAACCGCTTTTGTGGGGAGCAATAAGGGCCACGTGTGACCCGA  
 TGAGAGTACCCAGCGAATAAGCATCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACG  
 GAGGATGCAAGCGTTATCCGGATTTATTGGGTTTAAAGGGTGCAGTAGGCGGACGATTA  
 AGCGTGAGGTGAAATGC

>denovo698975 k\_\_Bacteria; p\_\_Bacteroidetes; c\_\_Bacteroidia; o\_\_Bacteroidales;  
 f\_\_[Paraprevotellaceae]; SEQ ID NO: 14

TGAGGAATATTGGTCAATGGGCGGAAGCCTGAACCAGCCAAGTAGCGTGAAGGATGAC  
 GGCCCTACGGGTTGTAAACTTCTTTTATGCGGGAACAAAGTGCGCCACGCGTGGCGTTT  
 TGCGCGTACCGCAGGAAAAAGCACCGGCTAATCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACG  
 GAAGGTGCGAGCGTTATCCGGATTCATTGGGTTTAAAGGGAGCGTAGGCGGAGCGCCA  
 AGTCAGCTGTGAAATCC

>denovo746686 k\_\_Bacteria; p\_\_Firmicutes; c\_\_Clostridia; o\_\_Clostridiales; f\_\_Lachnospiraceae;  
SEQ ID NO: 15

TGGGGAATATTGCACAATGGAGGAACTCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAGTGAAGAA  
GTATTTTCGGTATGTAAAGCTCTATCAGCAGGGAAGATAATGACGGTACCTGAATAAGA  
AGCACCGGCTAAATACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTATGGTGCAAGCGTTATCC  
GGATTTACTGGGTGTAAAGGGAGTGCAGGCGGTCTGAAAAGTCAGATGTGAAAGCCCG  
GGGCTCAACCCCGGGACT

>denovo780334 k\_\_Bacteria; p\_\_Firmicutes; c\_\_Clostridia; o\_\_Clostridiales; f\_\_Lachnospiraceae;  
SEQ ID NO: 16

TGGGGAATATTGCACAATGGGGGAAACCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAGTGAAGAA  
GTATTTTCGGTATGTAAAGCTCTATCAGCAGGGAAGAAAATGACGGTACCTGACTAAGA  
AGCCCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGGGCAAGCGTTATCC  
GGATTTACTGGGTGTAAAGGGAGCGCAGACGGAAGAACAAGTCTGATGTGAAATGCGG  
GGGCTCAACTCCTGAATT

>denovo780566 k\_\_Bacteria; p\_\_Bacteroidetes; c\_\_Bacteroidia; o\_\_Bacteroidales;  
f\_\_Prevotellaceae; g\_\_Prevotella; SEQ ID NO: 17

TGAGGAATATTGGTCAATGGGCGAGAGCCTGAACCAGCCAAGTAGCGTGCAGGAAGAC  
GGCCCTATGGGTTGTAAACTGCTTTTATATAGGGATAAAGTCGGGGACGTGTCCCCGTT  
TGTAGGTACTATATGAATAAGGACCGGCTAATTCCTGCCAGCAGCCGCGGTAATACG  
GAAGGTCCGGGCGTTATCCGGATTTATTGGGTTTAAAGGGAGCGCAGGCCGGCTTTTAA  
GCGTGACGTGAAATGT

>denovo794443 k\_\_Bacteria; p\_\_Bacteroidetes; c\_\_Bacteroidia; o\_\_Bacteroidales;  
f\_\_Prevotellaceae; g\_\_Prevotella; SEQ ID NO: 18

TGAGGAATATTGGTCAATGGGCGCGAGCCTGAACCAGCCAAGTAGCGTGCAGGATGAC  
GGCCCTATGGGTTGTAAACTGCTTTTGGAGGGGAATAAAGTCGTCTACGTGTAGGTGTT  
TGCATGTACCCTCAGAATAAGGACCGGCTAATTCCTGCCAGCAGCCGCGGTAATACG  
GAAGGTCCTGGCGTTATCCGGATTTATTGGGTTTAAAGGGAGCGCAGGCCGGGCGATTA  
AGCGTGACGTGAAATGC

>denovo812512 k\_\_Bacteria; p\_\_Bacteroidetes; c\_\_Bacteroidia; o\_\_Bacteroidales;  
f\_\_Prevotellaceae; g\_\_Prevotella; SEQ ID NO: 19

TGAGGAATATTGGTCAATGGCCGCGAGGCTGAACCAGCCAAGTAGCGTGCAGGATGAC  
GGCCCTCTGGGTTGTAAACTGCTTTTATGCGGGAACAAAGGCGTCTACGTGTAGTCGTG

TGCGTGTACCGCAGGAAAAAGGACCGGCTAATTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACG  
 GAAGGTCCGGGCGTTATCCGGATTTATTGGGTTTAAAGGGAGCGCAGGCTGAAGCGCA  
 AGCCGGCTGTAAAATTT

>denovo836347 k\_\_Bacteria; p\_\_Bacteroidetes; c\_\_Bacteroidia; o\_\_Bacteroidales; SEQ ID NO: 20  
 TGAGGAATATTGGTCAATGGGCGGAAGCCTGAACCAGCCAAGTCGCGTGAAGGATGAA  
 GGTATTATGTATTGTAAACTTCTTTAGCTGTGGAGAAATAAGGTGCTCGTGAGCACCGA  
 TGCTAGTACACAGAGAATAAGGGTCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACG  
 GAGGACCCGAGCGTTATCCGGATTCATTGGGTTTAAAGGGTGCAGGCGGCTTCTTAA  
 GTCAGCGGTAAAATCG

>denovo875125 k\_\_Bacteria; p\_\_Firmicutes; c\_\_Clostridia; o\_\_Clostridiales; f\_\_Veillonellaceae;  
 SEQ ID NO: 21

TGGGGAATCTTCCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAA  
 GGTCTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGAAGGGGACGCACGGCGCCTGTTACAAGATAGC  
 AGGTGAATGACGGTACCCTTCGAGGAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGG  
 TAATACGTAGGCGGCAAGCGTTGTCCGGAATCATTGGGCGTAAAGGGAGCGCAGGTGG  
 ACGTATAGGTCCTTCTTA

>denovo887467 k\_\_Bacteria; p\_\_Firmicutes; c\_\_Clostridia; o\_\_Clostridiales; f\_\_Ruminococcaceae;  
 g\_\_Ruminococcus; s\_\_flavifaciens SEQ ID NO: 22

TGGGGAATATTGCACAATGGGGGAAACCCTGATGCAGCGATGCCGCGTGGAGGAAGAA  
 GGTTTTTCGGATTGTAAACTCCTGTCTTAAAGGACGATAATGACGGTACTTTAGGAGGAA  
 GCTCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGAGCGAGCGTTGTCCG  
 GAATTACTGGGTGTAAAGGGAGCGTAGGCGGGAGTGCAAGTCAGATGTGAAATACATG  
 GGCTCAACCCATGGGCT

В соответствии с одним вариантом осуществления OTU изложена в любой из последовательностей, изложенных в SEQ ID NO: 1-22. В соответствии с еще одним вариантом осуществления OTU изложена в SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 8, 9, 11-17, 19, 20 или 21.

Конкретные OTU для конкретных признаков кратко изложены в таблице 2 в данном документе ниже. В таблице (1) означает положительную корреляцию, (-1) означает отрицательную корреляцию, и (0) означает отсутствие значимой корреляции.

*Таблица 2*

SEQ ID NO:	Аспарат	Глицин	Тирозин	Пропио- новая кислота	Валери- новая кислота	Пропионат/ ацетат	Нормализо- ванное DMI	Выделение метана	Жирность молока	Содержа- ние белка в молоке	Общее RFI
3	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
12	1	0	1	-1	-1	-1	0	1	0	1	0
13	1	1	1	-1	-1	-1	1	1	1	1	1
1	1	1	1	-1	-1	-1	1	1	0	1	1
2	1	1	1	-1	-1	-1	1	1	1	1	1
4	1	1	1	-1	-1	-1	1	1	1	1	1
5	1	1	1	-1	-1	-1	1	1	1	1	1
6	1	1	1	-1	-1	-1	1	1	1	1	1
7	1	1	1	-1	-1	-1	0	1	1	1	0
8	1	1	1	-1	-1	-1	1	1	1	1	0
9	0	0	0	-1	-1	-1	1	1	0	1	1
10	1	1	1	-1	-1	-1	1	1	0	1	1
11	1	1	1	-1	-1	-1	1	1	1	1	1
14	-1	-1	-1	0	0	0	0	0	0	-1	0
15	-1	-1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	-1	-1
16	1	0	1	-1	-1	-1	1	1	1	1	1
17	1	0	1	-1	-1	-1	1	1	0	1	0
18	1	1	1	-1	-1	-1	1	1	1	1	1
19	-1	-1	-1	1	1	1	-1	-1	0	-1	-1
20	1	1	1	-1	-1	-1	1	1	0	0	1
21	-1	-1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	-1	-1
22	-1	-1	-1	0	0	1	0	0	-1	-1	0

Настоящим изобретением дополнительно предусмотрен анализ множества описанных выше OTU. Следовательно, анализируют по меньшей мере одну OTU, по меньшей мере две, по меньшей мере три, по меньшей мере четыре, по меньшей мере пять, по меньшей мере шесть, по меньшей мере семь, по меньшей мере восемь, по меньшей мере девять, по меньшей мере десять, по меньшей мере 11, по меньшей мере 12, по меньшей мере 13, по меньшей мере 14, по меньшей мере 15 или все из описанных выше OTU.

Будет понятно, что после того как животное было классифицировано как имеющее достаточное количество наследуемого микроорганизма, которое коррелирует с желаемым фенотипом, его можно отобрать (например, отделить от остального стада) и классифицировать как имеющее этот фенотип. В соответствии с одним вариантом осуществления животное клеймят таким образом, чтобы было понятно, что оно содержит этот фенотип.

В соответствии с одним вариантом осуществления животное отбирают как кандидата для разведения. Таким образом, животное может считаться подходящим в качестве донора гамет для естественного спаривания, искусственного осеменения или оплодотворения *in vitro*.

Таким образом, в соответствии с еще одним аспектом настоящего изобретения предусмотрен способ разведения жвачного животного, включающий: осеменение самки жвачного животного, которая была отобрана согласно способам, описанным в данном документе, спермой от самца жвачного животного, таким образом осуществляя разведение жвачного животного.

В соответствии с еще одним аспектом настоящего изобретения предусмотрен способ разведения жвачного животного, включающий: осеменение самки жвачного животного спермой от самца жвачного животного, который был отобран согласно способам по любому из пп. 1-14, таким образом осуществляя разведение жвачного животного.

Разведение одного или нескольких быков с коровами предпочтительно осуществляют с помощью искусственного осеменения, но, в качестве альтернативы, ее можно осуществлять с помощью естественного осеменения.

В соответствии с еще одним аспектом настоящего изобретения предусмотрен способ определения чистоты породы жвачных животных, включающий анализ микробиома жвачных животных, причем сходство в количестве бактерий в микробиоме является показателем чистоты породы.

Таким образом, двух животных из одного и того же вида можно считать относящимися к одинаковой породе, когда количество (например, частота выявления) в

микробиоме по меньшей мере одного, по меньшей мере двух, по меньшей мере трех, по меньшей мере четырех, по меньшей мере пяти, по меньшей мере шести, по меньшей мере семи, по меньшей мере восьми, по меньшей мере девяти или даже по меньшей мере 10 или всех из бактериальных OTU, изложенных в таблице 1, является сходным при статистически значимом уровне достоверности. В соответствии с еще одним вариантом осуществления два животных из одного и того же вида можно считать относящимися к одинаковой породе, когда количество (например, относительная доля) в микробиоме по меньшей мере 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60% или даже 70% бактерий, относящихся к типу Bacteroidetes и/или Firmicutes или относящихся к отряду Bacteroidales и/или Clostridiales, является идентичным.

Поскольку авторы настоящего изобретения показали, что распространенность конкретных микробов в микробиоме рубца является наследуемой, авторы настоящего изобретения также предполагают, что представляется возможным осуществлять разведение жвачных животных, имеющих особую распространенность микробов в своем микробиоме. Будет понятно, что ее можно осуществлять, не имея какой-либо информации относительно признака или цели, которые ассоциированы с наследуемой бактерией.

Таким образом, в соответствии с еще одним вариантом осуществления предусмотрен способ увеличения количества жвачных животных, имеющих желаемый микробиом, включающий разведение самца и самки указанных жвачных животных, причем микробиом рубца или указанного самца, и/или указанной самки жвачных животных содержит наследуемый микроорганизм выше предварительно определенного уровня, таким образом увеличивая количество жвачных животных, имеющих желаемый микробиом.

Отбор животных, имеющих микробиомы рубца, которые содержат наследуемые микробы (например, бактерии), можно осуществлять посредством анализа образцов микробиомов рубца, как дополнительно описано выше в данном документе.

Как упоминается, наследуемый микроорганизм может быть ассоциирован с известным наследуемым признаком. Примеры наследуемых признаков представлены в данном документе выше.

В качестве дополнения или альтернативы, наследуемый микроорганизм может воздействовать на относительное количество микробов в микробиоме животного (т.е. общий состав микробиома).

Примеры наследуемых микроорганизмов (например, бактерий) описаны в данном документе выше – например, бактерии, экспрессирующие последовательность гена 16S рРНК, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1-22.

В контексте данного документа термин «приблизительно» относится к  $\pm 10\%$

Термины «содержит», «содержащий», «включает в себя», «включающий в себя», «имеющий» и родственные им по значению термины означают «включающий в себя, без ограничения».

Термин «состоящий из» означает «включающий в себя и ограниченный».

Термин «состоящий, по существу, из» означает, что композиция, способ или структура могут включать дополнительные ингредиенты, стадии и/или части, но только если дополнительные ингредиенты, стадии и/или части не изменяют существенно основные и новые характеристики заявленных композиции, способа или структуры.

В контексте данного документа формы единственного числа включают в себя соответствующие формы множественного числа, если контекст явно не предписывает иное. Например, термин «соединение» или «по меньшей мере одно соединение» могут включать в себя ряд соединений, в том числе их смеси.

Во всем данном описании различные варианты осуществления настоящего изобретения могут быть представлены в формате диапазона. Следует понимать, что описание в формате диапазона предназначено только удобства и краткости, и его не следует толковать как жесткое ограничение в отношении объема настоящего изобретения. Соответственно, следует понимать, что описание диапазона специально раскрывает все возможные поддиапазоны, а также отдельные численные значения в пределах этого диапазона. Например, следует учитывать, что описание диапазона, такого как от 1 до 6, специально раскрывает поддиапазоны, такие как от 1 до 3, от 1 до 4, от 1 до 5, от 2 до 4, от 2 до 6, от 3 до 6 и т.д., а также отдельные числа в пределах этого диапазона, например, 1, 2, 3, 4, 5 и 6. Это применимо независимо от широты диапазона.

Во всех случаях, когда в данном документе указан численный диапазон, предполагается, что он включает в себя любое приведенное числительное (дробь или целое число) в пределах указанного диапазона. Фразы «варьирующий/находящийся в диапазоне» между первым указанным числом и вторым указанным числом и «варьирующий/находящийся в диапазоне» от первого указанного числа «до» второго указанного числа используют в данном документе взаимозаменяемо, и подразумевается, что они включают в себя первое и второе указанные числа, а также все дробные и целые числа между ними.

В контексте данного документа термин «способ» относится к методам, средствам, методикам и процедурам для выполнения данной задачи, в том числе, без ограничения, те методы, средства, методики и процедуры, которые или известны практикующим

специалистам в областях химии, фармакологии, биологии, биохимии и медицины, или могут быть легко разработаны ими на основании известных методов, средств, методик и процедур.

В случае когда делают ссылку на конкретные последовательности в перечне последовательностей, следует учитывать, что такая ссылка также охватывает последовательности, которые, по существу, соответствуют ее комплементарной последовательности, которая включает в себя незначительные вариации последовательности, являющиеся результатом, например, ошибок секвенирования, ошибок клонирования или других изменений, приводящих в результате к замене оснований, делеции оснований или добавлению оснований, при условии, что частота таких вариаций составляет менее чем 1 на 50 нуклеотидов, в качестве альтернативы, менее чем 1 на 100 нуклеотидов, в качестве альтернативы, менее чем 1 на 200 нуклеотидов, в качестве альтернативы, менее чем 1 на 500 нуклеотидов, в качестве альтернативы, менее чем 1 на 1000 нуклеотидов, в качестве альтернативы, менее чем 1 на 5000 нуклеотидов, в качестве альтернативы, менее чем 1 на 10000 нуклеотидов.

Стоит учесть, что определенные признаки настоящего изобретения, которые для ясности описаны в контексте отдельных вариантов осуществления, также могут быть представлены в комбинации в одном варианте осуществления. Напротив, различные признаки настоящего изобретения, которые из соображений краткости описаны в контексте одного варианта осуществления, также могут быть представлены отдельно или в любой подходящей подкомбинации или, если это является подходящим, в любом другом описанном варианте осуществления настоящего изобретения. Определенные признаки, описанные в контексте различных вариантов осуществления, не следует рассматривать как основные признаки этих вариантов осуществления, если вариант осуществления является недействующим без этих элементов.

Различные варианты осуществления и аспекты настоящего изобретения, которые определены выше в данном документе и которые заявлены в разделе Формула изобретения ниже, получают экспериментальное подтверждение в следующих примерах.

### **ПРИМЕРЫ**

Ниже будут представлены следующие примеры, которые вместе с приведенными выше описаниями иллюстрируют некоторые варианты осуществления настоящего изобретения, не ограничивая его.

В целом, номенклатура, используемая в данном документе, и лабораторные процедуры, используемые в настоящем изобретении, включают в себя молекулярные, биохимические, микробиологические методики и методики на основе использования рекомбинантной ДНК. Такие методики всесторонне объяснены в литературе. См., например, "Molecular Cloning: A laboratory Manual" Sambrook et al., (1989); "Current Protocols in Molecular Biology" Volumes I-III Ausubel, R. M., ed. (1994); Ausubel et al., "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley and Sons, Baltimore, Maryland (1989); Perbal, "A Practical Guide to Molecular Cloning", John Wiley & Sons, New York (1988); Watson et al., "Recombinant DNA", Scientific American Books, New York; Birren et al. (eds) "Genome Analysis: A Laboratory Manual Series", Vols. 1-4, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York (1998); методики, изложенные в патентах США №№ 4666828; 4683202; 4801531; 5192659 и 5272057; "Cell Biology: A Laboratory Handbook", Volumes I-III Cellis, J. E., ed. (1994); "Culture of Animal Cells - A Manual of Basic Technique" by Freshney, Wiley-Liss, N. Y. (1994), Third Edition; "Current Protocols in Immunology" Volumes I-III Coligan J. E., ed. (1994); Stites et al. (eds), "Basic and Clinical Immunology" (8th Edition), Appleton & Lange, Norwalk, CT (1994); Mishell and Shiigi (eds), "Selected Methods in Cellular Immunology", W. H. Freeman and Co., New York (1980); доступные иммунологические анализы развернуто описаны в патентной и научной литературе, см., например, патенты США №№ 3791932; 3839153; 3850752; 3850578; 3853987; 3867517; 3879262; 3901654; 3935074; 3984533; 3996345; 4034074; 4098876; 4879219; 5011771 и 5281521; "Oligonucleotide Synthesis" Gait, M. J., ed. (1984); "Nucleic Acid Hybridization" Hames, B. D., and Higgins S. J., eds. (1985); "Transcription and Translation" Hames, B. D., and Higgins S. J., eds. (1984); "Animal Cell Culture" Freshney, R. I., ed. (1986); "Immobilized Cells and Enzymes" IRL Press, (1986); "A Practical Guide to Molecular Cloning" Perbal, B., (1984), и "Methods in Enzymology" Vol. 1-317, Academic Press; "PCR Protocols: A Guide To Methods And Applications", Academic Press, San Diego, CA (1990); Marshak et al., "Strategies for Protein Purification and Characterization - A Laboratory Course Manual" CSHL Press (1996); при этом все из указанных источников включены посредством ссылки так, как если бы они были полностью изложены в данном документе. Другие основные источники приведены в данном документе. Полагают, что процедуры являются хорошо известными в уровне техники и представлены для удобства читателя. Вся информация, содержащаяся в них, включена в данный документ посредством ссылки.

### **Материалы и методы**

*Экстрагирование микробной ДНК:* Микробную фракцию рубцовой жидкости разделяли, следуя способу из Stevenson and Weimer, 2007, Applied Microbiology and Biotechnology 75:165-174, с незначительными модификациями, которые были выполнены в Jami et al., 2013, The ISME journal 7:1069-1079. ДНК экстрагировали, как было описано в Stevenson and Weimer (выше).

*Экстрагирование геномной ДНК:* 500 мкл цельной крови от каждого отдельного животного смешивали с 500 мкл Tris-HCl (pH 8,0), насыщенного фенолом, и 500 мкл DDW (бидистиллированная вода). Смесь встряхивали в течение 4 часов при комнатной температуре, а затем центрифугировали при 7500 g в течение 5 мин., водную фазу переносили в новую пробирку с 500 мкл Tris-HCl (pH 8,0), насыщенного смесью фенол-хлороформ (1:1), а затем центрифугировали при 7500 g в течение 5 мин. Водную фазу, содержащую ДНК, переносили в новую пробирку для дальнейшей обработки.

*Генотипирование животных:* Животные принадлежали к стаду исследовательского центра Volcani Center Сельскохозяйственной исследовательской организации (Agricultural Research Organization), Израиль. Среди генотипируемых животных присутствовало одиннадцать групп, каждая из которых имела общего отца (группы полусибсов). Одна такая группа состояла из четырех полусибсов, другая состояла из трех полусибсов, а все остальные группы состояли из двух полусибсов. Кроме того, присутствовало две пары полусибсов, имеющих общую мать. Среди генотипируемых животных не было полных сибсов. Генетическое родство между коровами оценивали исключительно по их геномной информации.

Образцы экстрагированной геномной ДНК от животных загружали на чип для определения SNP у коров Bovine SNP Chip 50K, который нацелен на 54609 распространенных SNP, которые равномерно распределены по геному коров (Illumina). Используемая модель чипа для определения SNP представляла собой Illumina BovineSNP50-24 v3.0 с номером в каталоге 20000766, и его обработку осуществляли, следуя протоколу производителя (Adler et al., 2013, JoVE (Journal of Visualized Experiments):e50683-e50683), в Центре геномики в Головном биомедицинском центре (Genomics Center of the Biomedical Core Facility) Технион, Израиль.

*Секвенирование и анализ 16S рРНК:* Амплификацию V2 участка 16S осуществляли с использованием праймеров CCTACGGGAGGCAGCAG (SEQ ID NO: 1; прямой) и CCGTCAATTCMTTTRAGT (SEQ ID NO: 2; обратный). Библиотеки затем собирали в пул, а

впоследствии секвенировали на одной проточной кювете MiSeq (Illumina) в течение 251 циклов с каждого конца фрагментов, следуя анализу с использованием Casava 1.8. В общей сложности 49760478 ридов со спаренными концами получали из общей выборки, при этом получали в среднем 106325 ридов со спаренными концами на образец. Программный комплекс QIIME версии 1.7.037 использовали для контроля качества данных и анализов. Анализ OTU осуществляли на видовых кластерах (97% идентичность), которые создавали с применением UCLUST. OTU подвергали таксономическому выделению с применением BLAST при сравнении с 16S рРНК в справочной базе данных RDP. Одноэлементные классы и двухэлементные классы фильтровали из набора данных, получая в результате 85К видов со средним значением, составляющим 5039 на образец.

*Контроль качества данных геномина:* Генотипы 47 индивидов из данного анализа комбинировали со справочным набором из 2691 отдельных генотипов, которые собирали от отдельных дойных коров голштино-фризской породы на фермах по всему Израилю и Голландии (с разрешения Израильской ассоциации селекционеров крупного рогатого скота (Israeli Cow Breeders Association), ICBA). Справочный набор генотипов позволял более робастный контроль качества (QC) и создание матрицы генетического родства. QC осуществляли с использованием программы PLINK со следующими параметрами:

```
-cow --file isgenotype_all --maf 0.05 --geno 0.05 --mind 0.05 --out isgenotype_all_qc --recode12
```

SNP, которые не генотипировались у более чем 5% индивидов, удаляли. Аналогично, индивидов удаляли из анализа, если у них генотипировали менее 95% локусов (SNP), охватываемых чипом для определения SNP.

354 индивида (один относился к исследуемой группе) удаляли вследствие низкого генотипирования, 3797 SNP удаляли вследствие «пропуска» в генотипируемых популяциях, и 11290 SNP не удовлетворяли критерию MAF. Общее количество SNP, проходящих QC, составило 40812.

*Создание матрицы генетического родства:* Все животные и SNP, которые прошли QC, использовали для создания матрицы, которая оценивает генетическое родство в каждой отдельной паре животных. Программное обеспечение GCTA (Yang et al. 2011, The American Journal of Human Genetics 88:76-82) использовали для расчета матрицы родства. Матрица основывается на подсчитанном количестве общих аллелей, взвешенном по редкости аллеля:

$$A_{jk} = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N \left( \frac{(x_{ij} - 2p_i)(x_{ik} - 2p_i)}{2p_i(1 - p_i)} \right)$$

где  $A_{jk}$  представляет собой оценку генетического родства между животными  $j$  и  $k$ .  $X_{ij}$ ,  $X_{ik}$  представляют собой подсчитанные количества эталонных аллелей у животных  $j$  и  $k$ , соответственно.  $p_i$  представляет собой долю эталонного аллеля в популяции.  $N$  представляет собой общее количество SNP, используемых для оценки родства.

*Оценки наследуемости:* Оценки наследуемости каждого вида получали, исходя из распределения относительной распространенности рассматриваемого вида с оцененным генетическим родством между животными. Оценку осуществляли с применением программного обеспечения GCTA. Модель, используемая этим программным обеспечением, называется общей наследуемостью и отражает объясненную наследуемость всех SNP, которые прошли QC. Модель представляет собой:

$$y = X\beta + Wu + \varepsilon$$

где  $y$  представляет собой наблюдений (фенотипы).  $\beta$  представляет собой вектор фиксируемых эффектов (исследуемые ковариаты).  $X$  представляет собой матрицу плана.  $u$  представляет собой вектор эффекта SNP.  $W$  представляет собой матрицу стандартизированных генотипов.  $\varepsilon$  представляет собой индивидуальный (остаточный) эффект.

Следовательно, дисперсия в модели может быть обусловлена двумя источниками, генетическими факторами и случайной погрешностью, следующим образом:

$$V = WW' \sigma_u^2 + I\sigma_\varepsilon^2$$

где  $V$  представляет собой общую дисперсию.  $I$  представляет собой матрицу идентичности ( $n \times n$ ).  $\sigma_u^2$  представляет собой дисперсию вследствие генетических факторов (общие эффекты SNP).  $\sigma_\varepsilon^2$  представляет собой дисперсию вследствие генетических факторов (общие эффекты SNP).  $\sigma_\varepsilon^2$  представляет собой дисперсию вследствие индивидуальных эффектов (остаточных).

Далее, GСТА оценивает значение  $\sigma_u^2$  и  $\sigma_u^2$  and  $\sigma_g^2$ , и, следовательно, наследуемость оценивают как:

$$h^2 = \frac{\sigma_u^2}{\sigma_u^2 + \sigma_\epsilon^2}$$

*Сравнение филогенетического расстояния в рамках наследуемых бактериальных OTU с таковым в рамках общего микробиома рубца:* Сходство ДНК (в процентах) в каждой отдельной паре в рамках 22 наследуемых бактериальных OTU рассчитывали с применением clustalw2 (44), а затем рассчитывали среднее значение для этих значений сходства. Эталонный диапазон средних значений сходства рассчитывали, произвольно выбирая 100 подгрупп, каждая из которых имела одинаковый размер ( $n=22$ ), взятых из пула OTU, появляющихся по меньшей мере у 12 генотипируемых животных (9К). Значения сходства ДНК по парам и их средние значения рассчитывали для каждой произвольной подгруппы. Чтобы получить уровень значимости для среднего значения сходства в рамках группы наследуемых бактериальных OTU, среднее значение сходства в ней ранжировали в рамках всех 100 средних значений сходства, которые получали от произвольных подгрупп.

*Отношение шансов для корреляции OTU:*

$$\frac{hc/hn}{nc/nn}$$

где  $hc$  представляет собой подсчитанное количество наследуемых OTU, коррелирующих с показателем,  $hn$  представляет собой подсчитанное количество наследуемых OTU, не коррелирующих с показателем,  $nc$  представляет собой подсчитанное количество ненаследуемых OTU, коррелирующих с показателем, и  $nn$  представляет собой подсчитанное количество ненаследуемых OTU, не коррелирующих с показателем. В этом контексте OTU коррелировала с показателем, если она имела номинальный коэффициент Спирмена  $p < 0,05$ .

*Статистика и графики:* Статистический анализ осуществляли с применением программного обеспечения R, и графики строили с применением пакетов ggplot2 и rheatmap.

*План эксперимента:* Основная цель заключалась в том, чтобы идентифицировать виды микробов, у которых значительные доли их вариации в профилях распространенности могут объясняться наследуемыми генетическими факторами. Для достижения этого авторы настоящего изобретения анализировали информацию по генотипированию распространенных SNP у 47 дойных коров голштинской породы. Эту информацию объединяли с

дополнительными данными для этих животных из недавнего исследования (Kruger et al., 2016, ISME J 10:2958-2972). Для каждого животного ген 16S рРНК секвенировали из образцов, полученных в три последовательных дня. Также количественно определяли метаболиты рубца, и осуществляли анализы метаболической активности рубца, такие как продуцирование метана в рубце *ex vivo*, и измерения расщепления клетчатки. Метаданные показателей продуктивности отдельных коров и физиологические показатели объединяли. Имеющие низкое качество и неинформативные SNP удаляли с применением программного комплекса QC (см. материалы и методы). Анализ результатов секвенирования ампликона 16S осуществляли с применением программного комплекса QIIME. Таксономические профили микробиома рубца, представленные 85K OTU уровня вида (три образца на животное), ассоциировали с геномными данными, представленными результатами генотипирования локусов с распространенными SNP (см. Методы). В частности, авторы настоящего изобретения сфокусировались на идентификации наследуемых микробных OTU, а не на величине оценок наследуемости. Этот подход является более робастным для значений оценок наследуемости, которые являются типичными в случае малых размеров выборки в процедуре оценки. Микробные OTU, которые, как было обнаружено, ассоциированы с геномами животных, дополнительно коррелировали с данными метаболомики микробиомов, а также с физиологическими параметрами и параметрами продуктивности животного.

### **Результаты**

*Наследуемые виды имеют высокое филогенетическое родство и имеют повышенное содержание представителей отряда Bacteroidales*

Первая стадия данного анализа заключалась в идентификации наследуемых видов бактерий, т.е. виды микробов, у которых значительные доли их вариации в профилях распространенности могут объясняться наследуемыми генетическими факторами. Это будет отражаться в виде высокого сходства распространенности определенных видов у животных, которые имеют сходный генетический фон. Соответственно, оценивали родство между всеми парами животных в когорте. Эту оценку выполняли, рассматривая и подсчитанное количество, и редкость аллелей (SNP) в эталонных генотипах. Эти парные оценки генетического родства использовали вместе с профилем распространенности каждого вида для расчета их оценки наследуемости.

Для повышения достоверности этого анализа анализ наследуемости ограничивали исключительно OTU, которые присутствовали по меньшей мере у 12 генотипируемых

животных (25% генотипируемой подгруппы), как ранее описано (Benson AK et al, 2010, Proceedings of the National Academy of Sciences 107:18933-18938). Кроме того, три независимых анализа наследуемости осуществляли для каждой OTU, один для каждого дня забора образцов. Только OTU, которые демонстрировали существенную наследуемую составляющую (оценка наследуемости  $>0,7$  и  $p$ -значение  $<0,05$ ) во все три отдельных дня забора образцов, рассматривали как наследуемые OTU. Следуя этой процедуре, в результате анализа получали 22 наследуемых OTU, которые соответствуют этим критериям (фиг. 8), все из них относятся к царству Бактерии. Несмотря на то что процедура оценки значимости наследуемости основывается на параметрическом тесте, тем не менее, авторы настоящего изобретения проверяли робастность этих данных, оценивая распределение уровня ложноположительных результатов в тесте при перестановках гипотез. Для этой цели они создали нулевую модель со 100 итерациями, где в каждой итерации они повторяли анализы наследуемости после перетасовывания в случайном порядке генетических профилей. При 94% перестановок количество OTU, определенных как наследуемые, было меньшим чем 22, в то время как при большинстве перестановок количество OTU, определенных как наследуемые, составляло менее 5 (фиг. 6).

Интересно заметить, что наследуемые OTU проявляли высокий уровень присутствия у животных, варьирующий от 50% до 100% животных, причем большинство появлялось у 70-100% оцениваемых животных (фиг. 2, 9 и 10). Профиль распространенности наследуемых микробов коррелировал с профилем их присутствия (коэффициент корреляции Спирмена между подсчитанными количествами присутствующих и суммами распространенности:  $r=0,75$ ,  $p<5\times 10^{-5}$ ).

Когда измеряли филогенетическое расстояние между этими OTU, обнаружили, что они имеют высокую степень филогенетического родства на основании сходства их нуклеотидных последовательностей 16S (фиг. 1).

Эти OTU относятся к двум главным типам в микробиоме рубца, а именно к Bacteroidetes и Firmicutes, и сгруппированы в двух преобладающих отрядах в рубце, Bacteroidales и Clostridiales (фиг. 2).

Авторы настоящего изобретения дополнительно изучали, представляет ли этот филогенетический состав наследуемых OTU общий видовой состав в рубце. Было обнаружено, что отряд Bacteroidales представлен в наследуемых OTU большим числом видов, чем он представлен во всем микробиоме рубца (тенденция, точный тест Фишера  $p<0,053$ ).

*Распространенность наследуемых бактерий коррелирует с признаками хозяина, а также с метаболическими параметрами рубца и может в значительной степени объяснять высокую долю вариации между животными*

Авторы настоящего изобретения выдвинули гипотезу, что наследуемые таксоны, которые коррелируют с геномом хозяина, будут потенциально связаны с метаболизмом рубца, а также с физиологическими параметрами хозяина. Следовательно, авторы настоящего изобретения искали корреляцию между наследуемыми микробами и всеми измеряемыми физиологическими параметрами животных, а также с метаболическими параметрами рубца. Подробно, они исследовали корреляцию профиля распространенности по когорте из 78 коров каждой наследуемой OTU с профилем для каждого измеренного показателя (метаболита рубца или другого показателя). Затем они сравнивали среднюю корреляцию наследуемых OTU с каждым из метаболитов рубца и физиологическими параметрами хозяина с нулевой моделью. При каждой из 1000 итераций нулевой модели они перетасовывали профиль распространенности каждой наследуемой OTU и пересчитывали их среднее значение коэффициента корреляции с каждым из метаболитов рубца и физиологическими параметрами хозяина. Этот анализ выявил, что наследуемые OTU проявляют сильную и значимую корреляцию со многими из метаболических параметров рубца, а также с физиологическими параметрами хозяина (фиг. 3, 7).

Что касается метаболизма рубца, наиболее сильные корреляции в случае наследуемых OTU присутствовали с соотношением пропионат:ацетат (наибольшая величина  $r=0,86$ , среднее значение  $|r|=0,64$ ), метаболизмом метана (наибольшая величина  $r=0,69$ , среднее значение  $|r|=0,49$ ), пропионовой кислоты (наибольшая величина  $r=-0,6245274$ , среднее значение  $|r|=0,44$ ) и валериановой кислоты (наибольшая величина  $r=-0,57$ , среднее значение  $|r|=0,39$ ), а также с концентрацией нескольких аминокислот, а именно глицина, аспартата и тирозина (с наибольшей величиной  $r=0,51$ ,  $0,5$ ,  $-0,53$  и средним значением  $|r|=0,32$ ,  $0,39$ ,  $0,36$ , соответственно). Что касается признаков хозяина, параметрами с наибольшей корреляцией являлось содержание белка в молоке (наибольшая величина  $r=0,46$ , среднее значение  $|r|=0,33$ ), потребление сухого вещества (наибольшая величина  $r=0,41$ , среднее значение  $|r|=0,28$ ), эффективность использования корма (представленная остаточным потреблением корма - RFI, наибольшая величина  $r=0,26$ , среднее значение  $|r|=0,39$ ) и жирность молока (наибольшая величина  $r=0,39$ , среднее значение  $|r|=0,25$ ). Более того, когда анализировали отдельную корреляцию наследуемых OTU с соотношением пропионат:ацетат, метаболизмом метана, содержанием пропионовой кислоты и валериановой кислоты, обнаружили, что

большинство этих OTU коррелировали либо положительно, либо отрицательно с этими параметрами (фиг. 4А). Что касается физиологических параметров хозяина, большинство наследуемых OTU положительно коррелировали с RFI, DMI и содержанием белка в молоке.

Эти данные поставили вопрос, отличается ли часть наследуемых микробов, которые коррелируют с физиологическими параметрами хозяина и метаболизмом рубца, от обнаруживаемой в общем микробиоме рубца. Для этой цели авторы настоящего изобретения рассчитывали для каждого показателя отношение шансов для корреляции OTU (см. Материалы и методы) и идентифицировали значительно более высокие отношения шансов для OTU, которые должны коррелировать с заданным показателем в рамках наследуемого микробиома, для многих параметров. Это было особенно заметно для параметров, с которыми эти наследуемые микробы демонстрировали высокую корреляцию (фиг. 4В).

Независимо было обнаружено, что одна из наследуемых OTU с филогенетической ассоциацией Bacteroidales, которая оказалась наследуемой и сильно коррелировала с признаком эффективности использования корма в этом исследовании, коррелировала с этим признаком в предыдущем исследовании (Kruger Ben Shabat S, et al., 2016. ISME J 10:2958-2972) (фиг. 5). Кроме того, пять других наследуемых OTU с филогенетической ассоциацией Bacteroidales, *Prevotella*, Clostridiales и *Flavefaciens*, как оказалось, сильно коррелируют с содержанием белка в молоке в этом исследовании, а также оказалась, что одна OTU из рода *Prevotella*, упомянутая выше, существенно коррелировала с потреблением сухого вещества (DMI) в этом предыдущем исследовании (фиг. 5).

*Физиологические признаки рубца и животного демонстрируют варьирующие оценки наследуемости*

После идентификации наследуемых видов микробов, которые демонстрируют корреляцию с признаками хозяина, авторы настоящего изобретения задались целью оценить наследуемость разных важных признаков метаболизма хозяина и рубца, с которыми, как было обнаружено, находятся в корреляции наследуемые микробы (фиг. 11). VFA, пропионат, сукцинат и валерат вместе с содержанием белка в молоке с измеряемыми показателями эффективности RFI и DMI демонстрировали значимые оценки наследуемости.

**СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ**

1. Reyniers JA. 1959. The pure-culture concept and gnotobiotics. *Annals of the New York Academy of Sciences* 78:3-16.
2. Gilbert JA, Neufeld JD. 2014. Life in a world without microbes. *PLoS biology* 12:e1002020.
3. Mizrahi I. 2013. Rumen symbioses, p 533-544, *The Prokaryotes*. Springer.
4. Kittelmann S, Pinares-Patiño CS, Seedorf H, Kirk MR, Ganesh S, McEwan JC, Janssen PH. 2014. Two different bacterial community types are linked with the low-methane emission trait in sheep. *PLoS One* 9:e103171.
5. Shi W, Moon CD, Leahy SC, Kang D, Froula J, Kittelmann S, Fan C, Deutsch S, Gagic D, Seedorf H. 2014. Methane yield phenotypes linked to differential gene expression in the sheep rumen microbiome. *Genome research* 24:1517-1525.
6. Ross EM, Moate PJ, Maret LC, Cocks BG, Hayes BJ. 2013. Metagenomic predictions: from microbiome to complex health and environmental phenotypes in humans and cattle. *PloS one* 8:e73056.
7. Wallace RJ, Rooke JA, McKain N, Duthie C-A, Hyslop JJ, Ross DW, Waterhouse A, Watson M, Roehe R. 2015. The rumen microbial metagenome associated with high methane production in cattle. *BMC genomics* 16:839.
8. Jami E, White BA, Mizrahi I. 2014. Potential role of the bovine rumen microbiome in modulating milk composition and feed efficiency. *PLoS One* 9:e85423.
9. Carberry CA, Kenny DA, Han S, McCabe MS, Waters SM. 2012. Effect of phenotypic residual feed intake and dietary forage content on the rumen microbial community of beef cattle. *Applied and environmental microbiology* 78:4949-4958.
10. Mizrahi I. 2012. The role of the rumen microbiota in determining the feed efficiency of dairy cows, p 203-210, *Beneficial Microorganisms in Multicellular Life Forms*. Springer.
11. Guan LL, Nkrumah JD, Basarab JA, Moore SS. 2008. Linkage of microbial ecology to phenotype: correlation of rumen microbial ecology to cattle's feed efficiency. *FEMS Microbiology Letters* 288:85-91.
12. McCann JC, Wiley LM, Forbes TD, Rouquette Jr FM, Tedeschi LO. 2014. Relationship between the rumen microbiome and residual feed intake-efficiency of Brahman bulls stocked on bermudagrass pastures. *PLoS One* 9:e91864.

13. Kruger Ben Shabat S, Sasson G, Doron-Faigenboim A, Durman T, Yaacoby S, Berg Miller ME, White BA, Shterzer N, Mizrahi I. 2016. Specific microbiome-dependent mechanisms underlie the energy harvest efficiency of ruminants. *ISME J* 10:2958-2972.
14. Fernando SC, Purvis H, Najar F, Sukharnikov L, Krehbiel C, Nagaraja T, Roe B, DeSilva U. 2010. Rumen microbial population dynamics during adaptation to a high-grain diet. *Applied and Environmental Microbiology* 76:7482-7490.
15. Kim M, Morrison M, Yu Z. 2011. Phylogenetic diversity of bacterial communities in bovine rumen as affected by diets and microenvironments. *Folia microbiologica* 56:453.
16. Kittelmann S, Janssen PH. 2011. Characterization of rumen ciliate community composition in domestic sheep, deer, and cattle, feeding on varying diets, by means of PCR-DGGE and clone libraries. *FEMS Microbiology Ecology* 75:468-481.
17. Kocherginskaya SA, Aminov RI, White BA. 2001. Analysis of the rumen bacterial diversity under two different diet conditions using denaturing gradient gel electrophoresis, random sequencing, and statistical ecology approaches. *Anaerobe* 7:119-134.
18. Tajima K, Aminov R, Nagamine T, Matsui H, Nakamura M, Benno Y. 2001. Diet-dependent shifts in the bacterial population of the rumen revealed with real-time PCR. *Applied and environmental microbiology* 67:2766-2774.
19. Friedman N, Shriker E, Gold B, Durman T, Zarecki R, Ruppin E, Mizrahi I. 2017. Diet-induced changes of redox potential underlie compositional shifts in the rumen archaeal community. *Environmental microbiology* 19:174-184.
20. Shaani Y, Eliyahu D, Mizrahi I, Yosef E, Ben-Meir Y, Nikbachat M, Solomon R, Mabjeesh SJ, Miron J. 2016. Effect of feeding ensiled mixture of pomegranate pulp and drier feeds on digestibility and milk performance in dairy cows. *Journal of Dairy Research* 83:35-41.
21. Roehe R, Dewhurst RJ, Duthie C-A, Rooke JA, McKain N, Ross DW, Hyslop JJ, Waterhouse A, Freeman TC, Watson M. 2016. Bovine host genetic variation influences rumen microbial methane production with best selection criterion for low methane emitting and efficiently feed converting hosts based on metagenomic gene abundance. *PLoS Genet* 12:e1005846.
22. Li Z, Wright ADG, Si H, Wang X, Qian W, Zhang Z, Li G. 2016. Changes in the rumen microbiome and metabolites reveal the effect of host genetics on hybrid crosses. *Environmental Microbiology Reports* 8:1016-1023.

23. Caporaso JG, Kuczynski J, Stombaugh J, Bittinger K, Bushman FD, Costello EK, Fierer N, Peña AG, Goodrich JK, Gordon JI. 2010. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nature methods* 7:335-336.
24. Benson AK, Kelly SA, Legge R, Ma F, Low SJ, Kim J, Zhang M, Oh PL, Nehrenberg D, Hua K. 2010. Individuality in gut microbiota composition is a complex polygenic trait shaped by multiple environmental and host genetic factors. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107:18933-18938.
25. VanRaden P, Van Tassell C, Wiggans G, Sonstegard T, Schnabel R, Taylor J, Schenkel F. 2009. Invited review: Reliability of genomic predictions for North American Holstein bulls. *Journal of dairy science* 92:16-24.
26. Williams Y, Pryce J, Grainger C, Wales W, Linden N, Porker M, Hayes B. 2011. Variation in residual feed intake in Holstein-Friesian dairy heifers in southern Australia. *Journal of Dairy Science* 94:4715-4725.
27. Benson AK. 2016. The gut microbiome - an emerging complex trait. *Nature genetics* 48:1301-1302.
28. Felsenstein J. 1985. Phylogenies and the comparative method. *The American Naturalist* 125:1-15.
29. Ungerfeld EM, Rust SR, Burnett R. 2003. Use of some novel alternative electron sinks to inhibit ruminal methanogenesis. *Reproduction Nutrition Development* 43:189-202.
30. Öztürk M. 1991. Conversion of acetate, propionate and butyrate to methane under thermophilic conditions in batch reactors. *Water Research* 25:1509-1513.
31. Bryant M. 1979. Microbial methane production—theoretical aspects. *Journal of Animal Science* 48:193-201.
32. Kamke J, Kittelmann S, Soni P, Li Y, Tavendale M, Ganesh S, Janssen PH, Shi W, Froula J, Rubin EM. 2016. Rumen metagenome and metatranscriptome analyses of low methane yield sheep reveals a Sharpea-enriched microbiome characterised by lactic acid formation and utilisation. *Microbiome* 4:56.
33. Rogers J, Peirce-Sandner S, Papas A, Polan C, Sniffen C, Muscato T, Staples C, Clark J. 1989. Production responses of dairy cows fed various amounts of rumen-protected methionine and lysine. *Journal of dairy science* 72:1800-1817.
34. Stevenson DM, Weimer PJ. 2007. Dominance of *Prevotella* and low abundance of classical ruminal bacterial species in the bovine rumen revealed by relative quantification real-time PCR. *Applied Microbiology and Biotechnology* 75:165-174.

35. Jami E, Israel A, Kotser A, Mizrahi I. 2013. Exploring the bovine rumen bacterial community from birth to adulthood. *The ISME journal* 7:1069-1079.
36. Ron M, Blanc Y, Band M, Ezra E, Weller J. 1996. Misidentification rate in the Israeli dairy cattle population and its implications for genetic improvement. *Journal of Dairy Science* 79:676-681.
37. Adler AJ, Wiley GB, Gaffney PM. 2013. Infinium assay for large-scale SNP genotyping applications. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*:e50683-e50683.
38. Edgar RC. 2010. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics* 26:2460-2461.
39. Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of molecular biology* 215:403-410.
40. Cole JR, Wang Q, Cardenas E, Fish J, Chai B, Farris RJ, Kulam-Syed-Mohideen A, McGarrell DM, Marsh T, Garrity GM. 2009. The Ribosomal Database Project: improved alignments and new tools for rRNA analysis. *Nucleic acids research* 37:D141-D145.
41. Purcell S, Neale B, Todd-Brown K, Thomas L, Ferreira MA, Bender D, Maller J, Sklar P, De Bakker PI, Daly MJ. 2007. PLINK: a tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses. *The American Journal of Human Genetics* 81:559-575.
42. Yang J, Lee SH, Goddard ME, Visscher PM. 2011. GCTA: a tool for genome-wide complex trait analysis. *The American Journal of Human Genetics* 88:76-82.
43. Yang J, Benyamin B, McEvoy BP, Gordon S, Henders AK, Nyholt DR, Madden PA, Heath AC, Martin NG, Montgomery GW. 2010. Common SNPs explain a large proportion of the heritability for human height. *Nature genetics* 42:565-569.
44. Larkin MA, Blackshields G, Brown N, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, Valentin F, Wallace IM, Wilm A, Lopez R. 2007. Clustal W and Clustal X version 2.0. *bioinformatics* 23:2947-2948.
45. Team RC. 2016. *R: A language and environment for statistical computing*. Vienna: R Foundation for Statistical Computing; 2014.
46. Wickham H. 2016. *ggplot2: elegant graphics for data analysis*. Springer.
47. Kolde R. 2015. *pheatmap: Pretty Heatmaps*. R package version 1.0. 2.

**ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ**

1. Способ отбора жвачного животного, имеющего желаемый наследуемый признак, включающий анализ микробиома животного в отношении количества наследуемого микроорганизма, который ассоциирован с указанным наследуемым признаком, причем количество указанного наследуемого микроорганизма является показателем того, имеет ли животное желаемый наследуемый признак.

2. Способ по п. 1, причем указанный наследуемый микроорганизм представляет собой наследуемую бактерию.

3. Способ по п. 2, причем указанная наследуемая бактерия относится по меньшей мере к одной из оперативных таксономических единиц (OTU), изложенных в таблице 1.

4. Способ по п. 2, причем указанная наследуемая бактерия относится к типу Bacteroidetes и Firmicutes, при этом количество является показателем того, имеет ли животное желаемый наследуемый признак.

5. Способ по п. 2, причем указанная наследуемая бактерия относится к отряду Bacteroidales и Clostridiales.

6. Способ по п. 3, причем выбирают указанную по меньшей мере одну OTU, которая изложена в любой из SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 8, 9, 11-17, 19, 20 или 21.

7. Способ по любому из п. 3 или п. 6, причем указанную по меньшей мере одну наследуемую бактерию выбирают из группы, состоящей из наследуемого рода бактерий, наследуемого семейства бактерий и наследуемого отряда бактерий.

8. Способ по любому из пп. 3, 6 или 7, причем указанная бактерия экспрессирует последовательность гена 16S рРНК, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1-22.

9. Способ по любому из пп. 3, 6, 7 или 8, причем указанная по меньшей мере одна OTU содержит по меньшей мере 5 OTU.

10. Способ по любому из пп. 3-9, причем жвачное животное представляет собой корову.

11. Способ по любому из пп. 3-10, дополнительно включающий применение отобранного животного для разведения.

12. Способ по любому из пп. 3-11, причем желаемый наследуемый признак является выбранным из группы, состоящей из белка молока, потребления сухого вещества, продуцирования метана, эффективности использования корма и жирности молока.

13. Способ по любому из пп. 3-12, причем микробиом представляет собой непатогенный микробиом.

14. Способ по любому из пп. 3-13, причем указанный анализ количества осуществляют посредством анализа экспрессии по меньшей мере одного гена в геноме указанной по меньшей мере одной бактерии.

15. Способ по любому из пп. 3-13, причем указанный анализ количества осуществляют посредством секвенирования ДНК, полученной из образца указанного микробиома.

16. Способ определения чистоты породы жвачных животных, включающий анализ микробиома указанных жвачных животных, причем сходство количества бактерий в указанном микробиоме является показателем чистоты породы.

17. Способ по п. 16, причем указанные бактерии относятся по меньшей мере к одной из оперативных таксономических единиц (OTU), изложенных в таблице 1.

18. Способ по п. 17, причем указанная по меньшей мере одна OTU является выбранной из группы, состоящей из рода, семейства и отряда.

19. Способ по п. 17, причем указанная бактерия экспрессирует последовательность гена 16S рРНК, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1-22.

20. Способ по любому из пп. 16-19, причем указанная по меньшей мере одна OTU содержит по меньшей мере 5 OTU.

21. Способ по любому из пп. 16-20, причем жвачное животное представляет собой корову.

22. Способ по любому из пп. 3-21, причем указанный микробиом содержит микробиом рубца или фекальный микробиом.

23. Способ разведения жвачного животного, включающий: осеменение самки жвачного животного, которая была отобрана согласно способам по любому из пп. 1-15, спермой от самца жвачного животного, таким образом осуществляя разведение жвачного животного.

24. Способ по п. 23, причем указанный самец жвачного животного был отобран согласно способам по любому из пп. 1-15.

25. Способ разведения жвачного животного, включающий: осеменение самки жвачного животного спермой от самца жвачного животного, который был отобран согласно способам по любому из пп. 1-15, таким образом осуществляя разведение жвачного животного.

26. Способ увеличения количества жвачных животных, имеющих желаемый микробиом, включающий разведение самца и самки указанных жвачных животных, причем микробиом рубца или указанного самца, и/или указанной самки жвачных животных содержит наследуемый микроорганизм выше предварительно определенного уровня, таким образом увеличивая количество жвачных животных, имеющих желаемый микробиом.

27. Способ по п. 26, причем указанный наследуемый микроорганизм является ассоциированным с наследуемым признаком.

28. Способ по п. 26, причем указанный наследуемый микроорганизм оказывает воздействие на относительное количество микробов указанного микробиома.

29. Способ по п. 26, причем микробиом рубца как указанного самца, так и указанной самки жвачных животных содержит наследуемый микроорганизм выше предварительно определенного уровня.

30. Способ по п. 26, причем указанный наследуемый микроорганизм представляет собой бактерию.

31. Способ по п. 30, причем указанная бактерия экспрессирует последовательность гена 16S рРНК, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1-22.