

<https://doi.org/10.30766/2072-9081.2024.25.3.453-464>

УДК 636.082.12:636.32/.38.082.13



Использование таргетного секвенирования для генотипирования овец породы джалгинский меринос

© 2024. А. Ю. Криворучко, А. А. Каниболоцкая✉, Л. Н. Скорых, О. Н. Криворучко

ФГБНУ «Северо-Кавказский Федеральный научный аграрный центр», г. Михайловск, Ставропольский край, Российская Федерация

Однонуклеотидные полиморфизмы (SNP), как наиболее важный тип генетической изменчивости, широко используются для подтверждения происхождения сельскохозяйственных животных и играют важную роль в селекции и разведении. Наиболее важным преимуществом при идентификации аллелей SNP является точность, что позволяет с уверенностью определять генотип. AgriSeq (ThermoFisher (США)) – это технология секвенирования, которая может быть использована для целенаправленной амплификации и повторного секвенирования тысяч мишеней SNP в рамках одной реакции. Этот метод специально адаптирован для животноводства и уже содержит готовые панели для некоторых видов домашних животных, однако, для использования их у овец необходимо провести предварительный отбор локусов, пригодных для генотипирования секвенированием. Цель работы: изучить эффективность выявления и распространенности локусов из предложенного набора SNP при обследовании новых поколений овец породы джалгинский меринос. Материалом для исследования послужили данные таргетного секвенирования геномов овец российских пород по сформированному набору локусов с целью выявления однонуклеотидных полиморфизмов. Предложенная панель локусов, модифицированная после валидации на втором поколении животных, содержит 352 замены, пригодных для генотипирования секвенированием и 413 полиморфизмов, ассоциированных с мясной продуктивностью животных. Оценка частоты встречаемости полиморфизмов, имеющих достоверную связь с показателями мясной продуктивности, между группами 2021 и 2022 года рождения показала, что большинство замен почти не различаются по частоте встречаемости между поколениями. Полученные в результате исследований показатели частоты встречаемости замен в группе выбранных животных позволяют сделать заключение, что выбранные нами полиморфизмы находятся в локусах, не подверженных существенным перестройкам в течение нескольких поколений, и могут быть информативны в течение достаточно длительного времени.

Ключевые слова: панель локусов, секвенирование, AgriSeq, SNP, генотип, частота встречаемости, овцы

Благодарности: работа выполнена при поддержке Минобрнауки РФ в рамках Государственного задания ФГБНУ «Северо-Кавказский Федеральный научный аграрный центр» (тема № FNMU-2022-0009).

Авторы благодарят рецензентов за их вклад в экспертную оценку этой работы.

Конфликт интересов: авторы заявили об отсутствии конфликта интересов.

Для цитирования: Криворучко А. Ю., Каниболоцкая А. А., Скорых Л. Н., Криворучко О. Н. Использование таргетного секвенирования для генотипирования овец породы джалгинский меринос. Аграрная наука Евро-Северо-Востока. 2024;25(3):453–464. DOI: <https://doi.org/10.30766/2072-9081.2024.25.3.453-464>

Поступила: 12.04.2024

Принята к публикации: 31.05.2024

Опубликована онлайн: 26.06.2024

The use of targeted sequencing for genotyping sheep of the Dzhalginsky Merino breed

© 2024. Alexander Yu. Krivoruchko, Anastasia A. Kanibolotskaya✉, Larisa N. Skorykh, Olga N. Krivoruchko

North Caucasus Federal Agricultural Research Centre, Mikhailovsk, Stavropol Territory, Russian Federation

Single Nucleotide polymorphisms (SNP) as the most important type of genetic variability are widely used to confirm the origin of farm animals and they play an important role in breeding and raising. Their most important advantage in the identification of SNP alleles is accuracy which makes it possible to determine the genotype precisely. AgriSeq (ThermoFisher (USA)) is a sequencing technology that can be used to purposefully amplify and re-sequence thousands of SNP targets in a single reaction. This method is specially adapted for animal husbandry and already contains ready-made panels for some types of domestic animals. However, in order to use them in sheep, it is necessary to pre-select loci suitable for genotyping by sequencing. The purpose of the work is to study the effectiveness of identifying and prevalence of loci from the proposed set of SNPs in the examination of new generations of sheep of the Dzhalginsky Merino breed. The material for the study was data

from targeted sequencing of the genomes of Russian sheep breeds according to the formed set of loci in order to identify single-nucleotide polymorphisms. The proposed panel of loci, modified after validation on the second generation of animals, contains 352 substitutions suitable for genotyping by sequencing and 413 polymorphisms associated with meat productivity of animals. An assessment of the frequency of polymorphisms with a reliable relationship with meat productivity indicators between the groups born in 2021 and 2022 has shown that most substitutions almost do not differ in frequency between generations. The indicators of the frequency of occurrence of substitutions in the group of selected animals obtained as a result of research indicate that selected polymorphisms are located in loci that are not subjected to significant rearrangements for several generations and can be informative for quite a long time.

Keywords: locus panel, sequencing, AgriSeq, SNP, genotype, frequency of occurrence, sheep

Acknowledgments: the research was carried out under the support of the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation within the state assignment of the North Caucasus Federal Agricultural Research Centre (theme No. FNMU-2022-0009).

The authors thank the reviewers for their contributions to the peer review of this work.

Conflict of interest: the authors declared no conflict of interest.

For citations: Krivoruchko A. Yu., Kanibolotskaya A. A., Skorykh L. N., Krivoruchko O. N. The use of targeted sequencing for genotyping sheep of the Dzhalginsky Merino breed. *Agrarnaya nauka Evro-Severo-Vostoka* = Agricultural Science Euro-North-East. 2024;25(3):453–464. (In Russ.). DOI: <https://doi.org/10.30766/2072-9081.2024.25.3.453-464>

Received: 12.04.2024

Accepted for publication: 31.05.2024

Published online: 26.06.2024

Животноводство на современном уровне развития становится все более зависимым от передовых научных разработок в области генетики и селекции. Это необходимо для поддержания племенной ценности существующих пород и выведения новых с высокими показателями продуктивности. Использование генетических технологий позволяет сделать более точным учет движения животных в хозяйствах, существенно ускорить процесс селекции и контролировать наличие в популяции только животных с желательным генотипом. За счет применения методов геномики только за последние годы удалось добиться серьезных достижений в селекционной работе по улучшению продуктивных качеств крупного рогатого скота [1, 2], свиней [3], овец [4] и ряда других сельскохозяйственных животных.

Изучение генома животных в настоящее время чаще всего используют для подтверждения достоверности происхождения путем сравнения генотипов родительских особей и потомков. Несмотря на совершенствование методов индивидуальной маркировки животных бирками, использование радиочастотных меток и широкое применение искусственного осеменения в племенных хозяйствах, окончательным методом экспертизы родственных отношений отдельных особей признается только генотипирование. Наиболее широко применяется генотипирование по микросателлитным локусам, обладающих достаточным полиморфизмом внутри породы, но очень редко изменяющихся при передаче наследственной информации. Метод хорошо отработан, достаточно дешевый при массовом использовании,

но имеет свои ограничения, связанные с небольшим количеством одновременно оцениваемых локусов [5].

Более точным и применимым не только для подтверждения достоверности происхождения, но и для ряда других задач генотипирования сельскохозяйственных животных является метод выявления однонуклеотидных полиморфизмов (SNP). Они широко представлены в геноме и могут быть структурной основой изменения активности генов [6]. Ранее для применения на большом количестве животных с сохранением приемлемой стоимости анализа использовали технологию ДНК-биочипов [7]. У этой технологии есть свои недостатки, связанные с необходимостью конструирования ДНК-биочипа и сложностью внесения изменений в его структуру при адаптации под конкретную породу животных. Этот метод эффективно применялся в геномной селекции и позволил существенно повысить продуктивность крупного рогатого скота [8], овец [9] и свиней [3].

Широкое применение методов генотипирования по отдельным однонуклеотидным полиморфизмам как с целью подтверждения достоверности происхождения, так и для выявления положительных генотипов по маркерам продуктивных признаков стало возможным с использованием высокопроизводительного секвенирования нового поколения (NGS) [10, 11]. Удобство применения в массовом масштабе связано с тем, что сам принцип этого метода позволяет одновременно на одном секвенаторе выявлять тысячи полиморфизмов в сотнях образцов ДНК от разных животных

[12, 13]. Каждый образец ДНК помечен собственным баркодом и изучается изолированно от других последовательностей нуклеотидов, но все исследования выполняются на одном чипе секвенатора за один запуск прибора. Это позволяет резко снизить стоимость генотипирования каждого отдельного животного, но выполнить исследование с необходимым числом прочтений каждого нуклеотида [14].

Для более удобного использования методов генотипирования секвенированием в практическом животноводстве уже разработан ряд геномных платформ и программное обеспечение для автоматизации пробоподготовки и учета результатов после получения данных по прочтениям геномных библиотек. Особого внимания среди подобных информационных разработок заслуживает технология AgriSeq, разработанная компанией ThermoFisher (США). В составе технологии как программное обеспечение, позволяющее в удобном интерактивном режиме создавать дизайн панелей для генотипирования секвенированием, так и весь цикл синтеза реагентов для подготовки библиотек ДНК. Важно отметить, что она специально адаптирована для животноводства и содержит готовые панели для крупного рогатого скота и свиней [14]. Однако для использования ее у овец необходимо было провести предварительный отбор локусов, пригодных для генотипирования секвенированием. При этом требуется такой набор локусов, который позволил бы не только оценить достоверность происхождения животных, но и был бы полезен для использования при селекции с целью повышения мясной продуктивности конкретной породы. Ранее мы разработали панель локусов для генотипирования секвенированием овец породы джалгинский меринос на основе данных, полученных с помощью ДНК-биочипов Illumina и проведенного полногеномного поиска ассоциаций. В результате был получен набор из 881 локуса, включающий как наиболее распространенные варианты 468 полиморфизмов для оценки достоверности происхождения, так и 413 SNP, достоверно связанные с параметрами мясной продуктивности [15]. Дальнейшим этапом исследований по использованию методов генотипирования секвенированием в овцеводстве является изучение эффективности выявления и распространенности локусов из предложенного набора при

обследовании новых поколений овец породы джалгинский меринос, что и стало целью нашего исследования.

Цель исследований –изучить эффективность выявления и распространенности локусов из предложенного набора SNP при обследовании новых поколений овец породы джалгинский меринос.

Научная новизна – впервые разработана панель локусов для генотипирования секвенированием овец породы джалгинский меринос.

Материал и методы. Исследования проводили на базе лабораторий ФГАОУ ВО «Северо-Кавказский федеральный университет», Всероссийского научно-исследовательского института овцеводства и козоводства (ВНИИОК) – филиала ФГБНУ «Северо-Кавказский Федеральный научный аграрный центр» и ФГБОУ ВО «Ставропольский государственный аграрный университет». Материалом для исследования послужили данные таргетного секвенирования геномов овец российских пород по сформированному набору локусов с целью выявления однонуклеотидных полиморфизмов.

Объектом исследования на первом этапе генотипирования секвенированием являлись бараны 2021 года рождения в возрасте 12 месяцев (отбор образцов ДНК проводили в 2022 г.) породы джалгинский меринос. Всего было генотипировано 55 баранов. Выбранные животные принадлежали не менее чем к трем неродственным селекционным линиям, внутри линий степень родства не превышала 50 % по отцу. Животные содержались в одинаковых оптимальных условиях в племенных хозяйствах Ставропольского края. Все животные были клинически здоровы и получали полноценный смешанный рацион.

Объектом исследования второго этапа генотипирования секвенированием по модифицированному набору локусов служили годовалые бараны породы джалгинский меринос 2022 года рождения (отбор образцов ДНК выполнен в 2023 г.). Количество образцов составило 55 единиц. Критерии отбора были те же, что и на предыдущем этапе исследования.

Генотипирование секвенированием выполняли в два этапа. На первом этапе генотипировали животных 2021 года рождения, был проведен анализ частоты встречаемости SNP в изучаемых локусах генома и сделаны выводы о дальнейшем использовании отдельных полиморфизмов для генотипирования секвениро-

ванием в рамках предложенной панели. Сравнение частоты встречаемости для оценки стабильности выявления отдельных SNP в целях генотипирования животных проводили с ранее полученными данными путем генотипирования на чипах Ovine Infinium HD BeadChip 600K (Illumina Inc. CA, США). Для дальнейшего исследования на панели локусов были исключены замены, показавшие снижение частоты встречаемости хотя бы одного из генотипов – дикого гомозиготного, гетерозиготного или мутантного гомозиготного. Доработанная панель локусов использовалась на втором этапе эксперимента для генотипирования животных 2022 года рождения. Для выявленных полиморфизмов в образцах ДНК баранов следующего поколения также провели оценку частоты встречаемости генотипов и сделали окончательный вывод о возможности их использования для дальнейшей практической работы в области молекулярно-генетической экспертизы.

Подготовка образцов ДНК и генотипирование секвенированием нового поколения. Геномную ДНК выделяли из образцов цельной крови, взятой в асептических условиях из яремной вены, с помощью набора Pure Link Genomic DNA MiniKit (Invitrogen Life Technologies, США) в соответствии с протоколом производителя. Количественный показатель содержания ДНК в выделенной пробе определяли с использованием NanoDrop OneC (ThermoFisher, США). Подготовку библиотек ДНК проводили с использованием праймеров и реагентов, подобранных на основании нашей заявки для кастомизации панели локусов в среде AgriSeq, в соответствии с рекомендациями производителя (Thermo Fisher Scientific, США). Генотипирование секвенированием выполняли с использованием высокопроизводительного секвенатора Ion GeneStudio S5 (Thermo Fisher Scientific, США) в соответствии с протоколом производителя. Первичную обработку результатов генотипирования проводили с помощью программного обеспечения Torrent Suite™ и Ion Reporter™ (Thermo Fisher Scientific, США).

Контроль качества генотипирования проводили с использованием программного обеспечения Torrent Suite™ и PLINK V.1.07. Длина 97 % прямых и обратных ридов находилась в пределах 150-152 п. н. Для 64 % прямых и 58 % обратных ридов было зарегистрировано не менее чем 36-кратное прочтение. Коли-

чество прочтений с кратностью меньше 30 составило около 2 %. Содержание GC в среднем составило 44,6 % при диапазоне для большинства ридов в пределах от 18 до 75 %. В дальнейшую обработку данных были включены образцы с показателем количества выявленных однонуклеотидных полиморфизмов больше 0,95 (Call Rate). Из анализа исключили однонуклеотидные полиморфизмы с частотой минорных аллелей (MAF – Minor Allele Frequency) меньше 0.01, частотой потерянных генотипов (missing genotype) больше 0.1. В качестве порогового значения по критерию Харди-Вайнберга (Hardy–Weinberg equilibrium) использовали значение $p = 0.00001$.

Генетический и статистический анализы. Анализ частоты встречаемости SNP по результатам генотипирования секвенирование проводили с использованием электронных таблиц Excel 2021 (Microsoft, США). Отдельно изучались частоты встречаемости полиморфизмов, используемых для подтверждения достоверности происхождения и замен, связанных с продуктивными качествами животных в каждой из исследуемых пород. Визуализацию и построение графиков проводили с применением пакета статистической обработки в Excel 2021 (Microsoft, США). Анализируемые полиморфизмы были представлены биаллельными SNP, аллелям присвоены обозначения A и B, в соответствии с проведенными нами первичным анализом и картированием на геном по наименованиям на чипе Ovine Infinium HD BeadChip 600K (Illumina Inc. CA, США). Для картирования и номенклатурного наименования SNP использовали сборку генома Ovis_Aries_3.1.

Результаты и их обсуждение. Оценку результатов генотипирования секвенированием у животных 2021 года рождения проводили по набору локусов, соответствующему породе джалгинский меринос. В набор локусов входили 413 полиморфизмов, влияющих на продуктивные качества джалгинских мериносов и 468 замен, применимых для подтверждения достоверности происхождения у этой породы.

Результаты генотипирования секвенированием по локусам, используемым для подтверждения достоверности происхождения, показали, что средняя частота встречаемости диких гомозигот составил около 0,3, что является оптимальным показателем для этих целей генотипирования (табл. 1).

Таблица 1 – Параметры генотипируемых для подтверждения достоверности происхождения SNP у баранов породы джалгинский меринос 2021 года рождения /
Table 1 – Parameters of genotyped SNP to confirm the authenticity of the origin in rams of the Dzhalginsky Merino breed born in 2021

Показатель / Index	Среднее / Average	Ошибка среднего / The error of the average	Min	Max
Частота встречаемости / Frequency of occurrence:				
диких гомозигот / wild homozygotes	0,299	0,027	0,230	0,370
гетерозигот / heterozygotes	0,402	0,022	0,320	0,480
мутантных гомозигот / mutant homozygotes	0,307	0,031	0,154	0,444
Частота дикого аллеля / The frequency of the wild allele	0,520	0,060	0,390	0,610
Частота мутантного аллеля / The frequency of the mutant allele	0,480	0,090	0,230	0,670

Изучение распределения диких гомозиготных вариантов полиморфизмов по количеству в зависимости от частоты встречаемости показало, что наибольшее число полиморфизмов имели частоту около 0,230 и 0,323 (рис. 1). Наименьшее количество замен имели частоту встречаемости около 0,370. Оптимальной

мы считаем и выявленную среднюю частоту встречаемости у мутантных гомозиготных вариантов. Однако разброс значений от 0,154 до 0,444 (табл. 1) указывает на большое количество образцов, у которых мутантный гомозиготный генотип встречается или слишком редко, или наоборот – слишком часто.

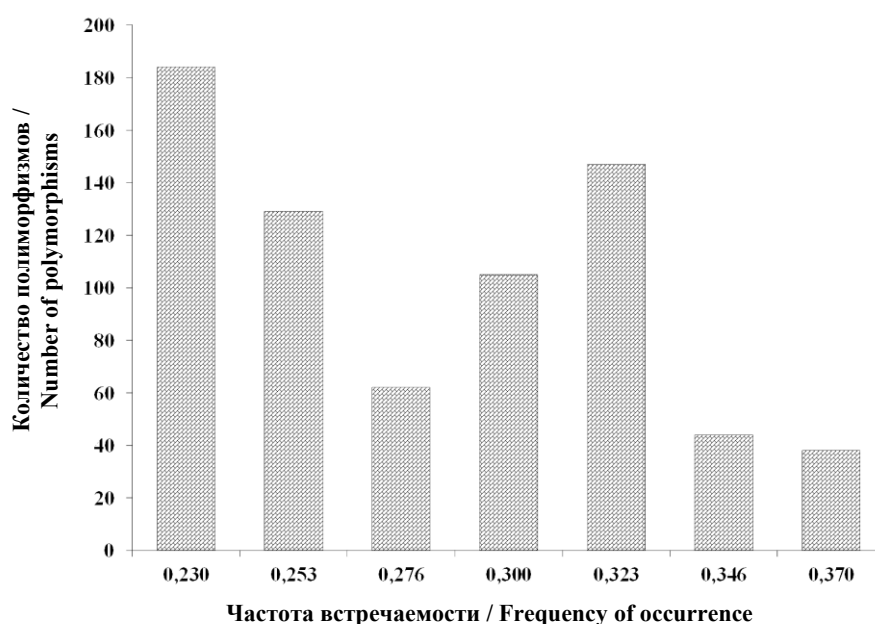


Рис. 1. Количество SNP с разной частотой встречаемости у баранов породы джалгинский меринос. Дикие гомозиготные генотипы /

Fig. 1. The number of SNPs with different frequency of occurrence in rams of the Dzhalginsky Merino breed. Wild homozygous genotypes

Это подтверждает и распределение замен по количеству в зависимости от частоты (рис. 2). Чаще всего среди мутантных гомозиготных генотипов встречались полиморфизмы с частотой около 0,202 и 0,444, меньше всего замен имело частоту около 0,396.

Средняя частота встречаемости гетерозиготных вариантов исследуемых SNP была

достаточно высокой, при этом, даже минимальные показатели были несколько завышены относительно оптимального показателя 0,3 (табл. 1). Наиболее часто выявлялись гетерозиготные генотипы по изучаемым полиморфизмам с частотами 0,400 и 0,426, меньше всего замен обнаруживалось в области частоты встречаемости 0,372 и 0,464 (рис. 3).

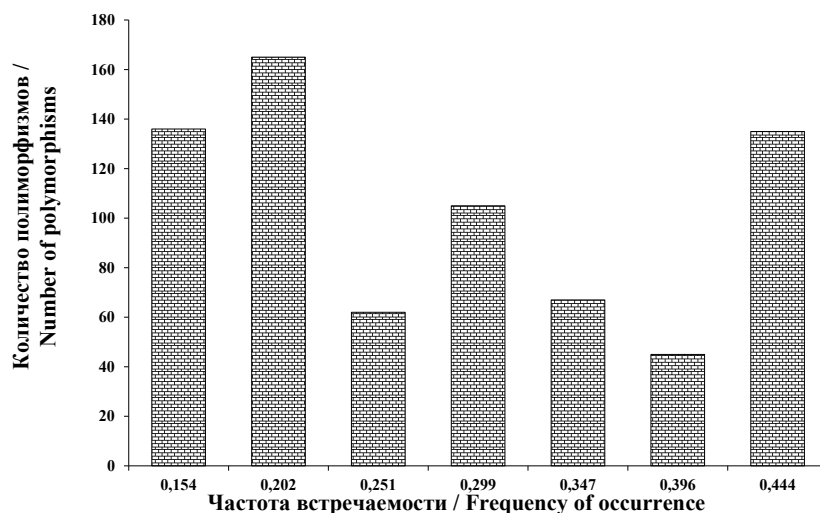


Рис. 2. Количество SNP с разной частотой встречаемости у баранов породы джалгинский меринос. Мутантные гомозиготные генотипы /

Fig. 2. The number of SNPs with different frequency of occurrence in rams of the Dzhalginsky Merino breed. Mutant homozygous genotypes

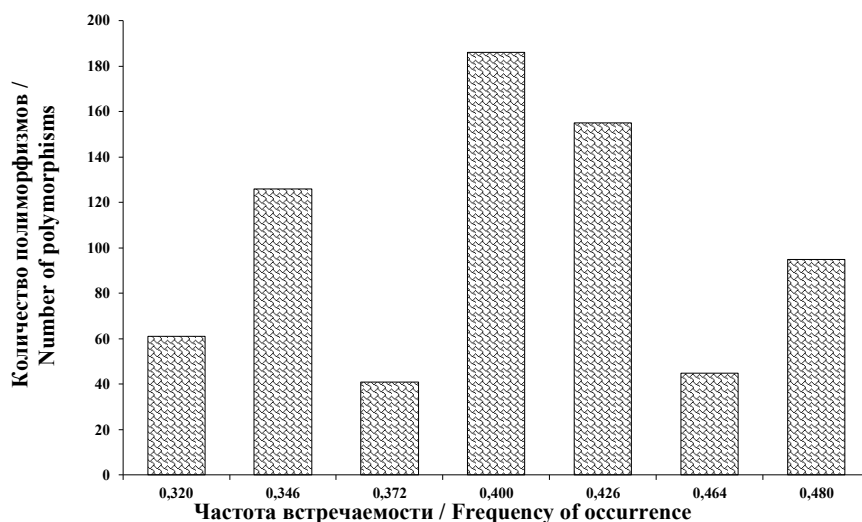


Рис. 3. Количество SNP с разной частотой встречаемости у баранов породы джалгинский меринос. Гетерозиготные генотипы

Fig. 3. The number of SNPs with different frequency of occurrence in rams of the Dzhalginsky Merino breed. Heterozygous genotypes

Средние показатели частоты встречаемости дикого и мутантного аллелей в исследуемой популяции были близкими по значению, что указывает на удовлетворительное для генотипирования по выбранным локусам распределение аллелей у животных по вариантам изучаемых SNP (табл. 1).

Проведение генотипирования секвенированием по локусам мясной продуктивности у баранов породы джалгинский меринос продемонстрировало, что для диких гомозиготных вариантов изучаемых полиморфизмов средняя частота встречаемости была близка к оптимальному показателю 0,3 (табл. 2).

Однако разброс частоты встречаемости был очень высоким – от 0,101 до 0,493. Наибольшее число замен имели частоту встречаемости около 0,232, меньше всего полиморфизмов было по краям диапазона – на частотах около 0,101 и 0,493 (рис. 4).

Гетерозиготные варианты исследуемых полиморфизмов имели достаточно высокую частоту встречаемости – около 0,4. Разброс частоты в этой группе генотипов составил от 0,022 до 0,762. Наибольшее количество замен имели частоту встречаемости с пиками около 0,240, 0,360 и 0,419 (рис. 5).

Таблица 2 – Параметры используемых для оценки мясной продуктивности SNP при генотипировании баранов породы джалгинский меринос 2021 года рождения /
Table 2 – Parameters used to assess the meat productivity of SNP in the genotyping of sheep of the Dzhalginsky Merino breed born in 2021

Показатель / Index	Среднее / Average	Ошибка среднего / The error of the average	Min	Max
Частота встречаемости / Frequency of occurrence:				
диких гомозигот / wild homozygotes	0,296	0,014	0,101	0,493
гетерозигот / heterozygotes	0,311	0,018	0,121	0,479
мутантных гомозигот / mutant homozygotes	0,406	0,019	0,022	0,762
Частота дикого аллеля / The frequency of the wild allele	0,430	0,040	0,180	0,740
Частота мутантного аллеля / The frequency of the mutant allele	0,570	0,060	0,260	0,820

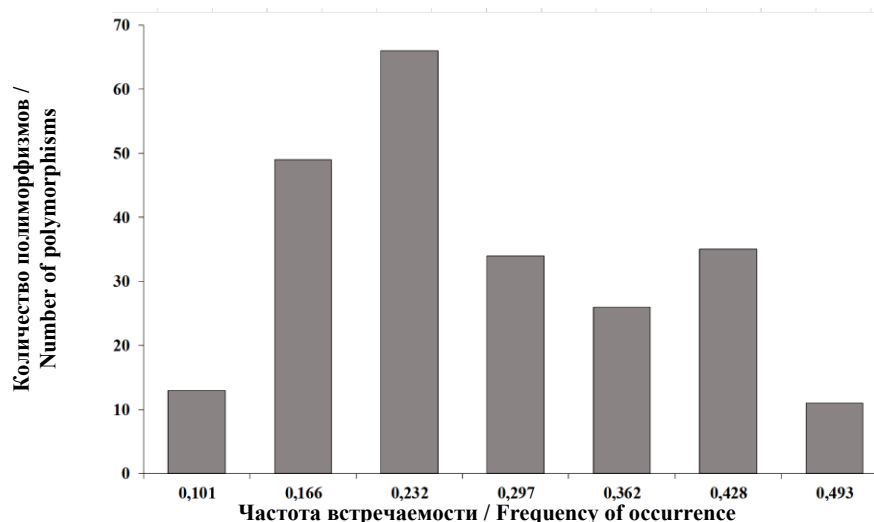


Рис. 4. Количество связанных с мясной продуктивностью SNP с разной частотой встречаемости у баранов породы джалгинский меринос. Дикие гомозиготные генотипы /

Fig. 4. The number of SNPs associated with meat productivity with different frequency of occurrence in rams of the Dzhalginsky merino breed. Wild homozygous genotypes

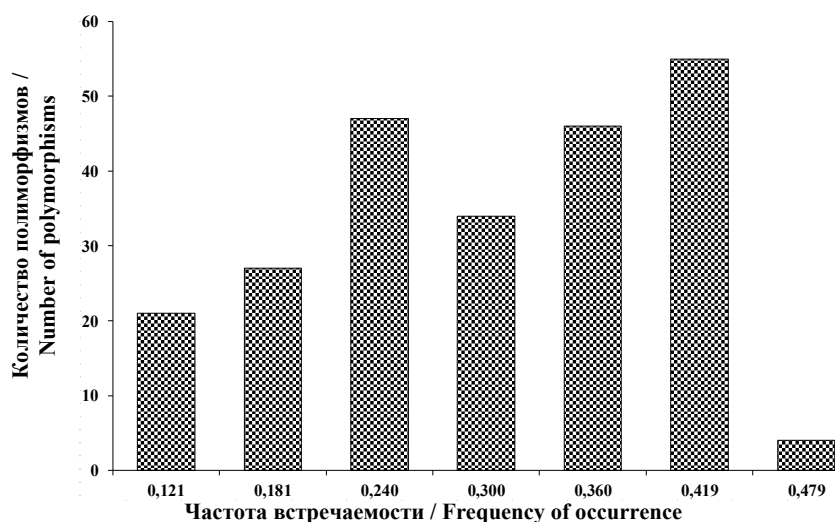


Рис. 5. Количество связанных с мясной продуктивностью SNP с разной частотой встречаемости у баранов породы Джалгинский меринос. Гетерозиготные генотипы /

Fig. 5. The number of SNPs associated with meat productivity with different frequency of occurrence in rams of the Dzhalginsky Merino breed. Heterozygous genotypes

Мутантные гомозиготные генотипы у исследуемых животных имели среднюю частоту встречаемости, больше чем на 30 % превышающую оптимальный интервал. Также отмечена очень высокая дисперсия частоты

встречаемости отдельных полиморфизмов – от 0,022 до 0,762. При этом максимальное число замен имели частоту около 0,510, минимальное количество – 0,762 (рис. 6).

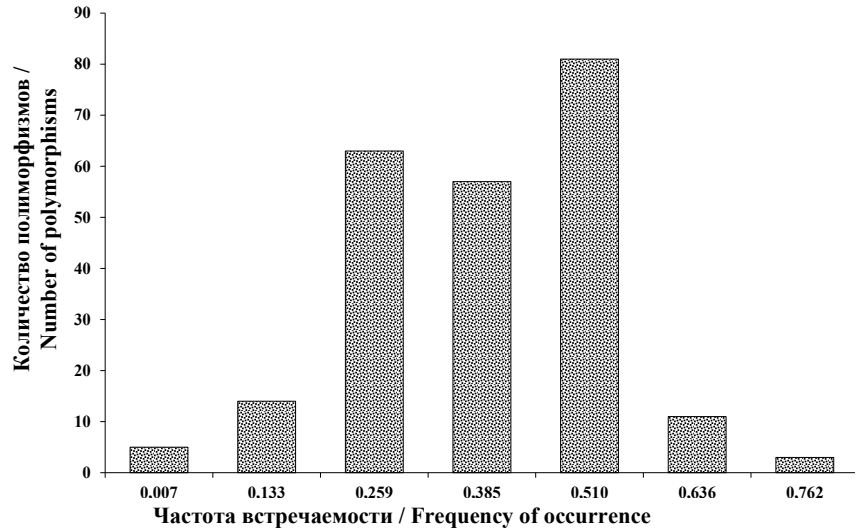


Рис. 6. Количество связанных с мясной продуктивностью SNP с разной частотой встречаемости у баранов породы джалгинский меринос. Мутантные гомозиготные генотипы /

Fig. 6. The number of SNPs associated with meat productivity with different frequency of occurrence in rams of the Dzhalginsky merino breed. Mutant homozygous genotypes

Сравнение частоты встречаемости полиморфизмов при генотипировании секвенированием с данными, полученными нами ранее при генотипировании на ДНК-биочипах, показало, что имеется изменение этого показателя

для всех вариантов генотипов. Так, частота встречаемости диких гомозиготных генотипов по каждой из замен изменилась в среднем на 12% (табл. 3).

Таблица 3 – Изменение частоты встречаемости SNP у баранов породы джалгинский меринос 2021 года рождения по сравнению с данными генотипирования на ДНК-биочипах /

Table 3 – Change in the frequency of occurrence of SNP in rams of the Dzhalginsky Merino breed born in 2021 compared with genotyping data on DNA biochips

Показатель / Index	Среднее / Average	Ошибка среднего / The error of the average	Min	Max
Изменение частоты встречаемости, % / Changing the frequency of occurrence, %:				
диких гомозигот / wild homozygotes	12,126	0,75	0,084	29,246
гетерозигот / heterozygotes	10,377	1,15	0,005	25,266
мутантных гомозигот / mutant homozygotes	17,208	1,92	0,013	55,044

При этом минимально зарегистрированное изменение составило 0,084 % (что, практически соответствует отсутствию изменений), а максимальное – 29,246 %. Для гетерозиготных генотипов изменение частоты встречаемости замен в среднем мало отличалось от диких гомозиготных вариантов, составив 10,377 %. Такая же тенденция отмечена и в отношении минимального (0,005)

и максимального зарегистрированных изменений частоты встречаемости, составивших 25,266 %. Наибольшие изменения в частоте встречаемости выявлены нами для мутантных гомозиготных генотипов, которые составили целых 17,208 % в среднем. И, если минимальное изменение частоты было близким к нулю, то максимальный показатель был наибольшим из всех генотипов, составив 55,044 %.

Полученные результаты по изменению частоты встречаемости отдельных полиморфизмов могут связаны с продолжающейся селекционной работой в породе и дрейфом генов, который за несколько лет, прошедших после получения нами данных с ДНК-биочипов, привел к некоторому изменению частоты встречаемости выбранных для генотипирования локусов.

Корректировка перечня локусов для генотипирования секвенированием у овец российских пород и валидация новой панели у поколения 2022 года рождения. Редактирование набора локусов в составе панели генотипирования секвенированием для джалгинских мериносов затронуло только замены, используемые для оценки достоверности происхождения. Это связано с тем, что полиморфизмы, влияющие на продуктивные качества у овец, изначально встречаются с дисбалансом частоты минорных и главных аллелей. Они используются как маркеры в селекционном процессе и закрепление одного из аллелей с большей частотой встречаемости является целью маркерной селекции. Поэтому в составе нашей панели эти локусы используются именно в маркерных целях и позволяют контролировать наличие полиморфизмов, влияющих на продуктивность, в необходимом количестве для обеспечения эффективной селекционной работы.

Сам процесс редактирования локусов на панели генотипирования заключался в исключении из дальнейшего анализа полиморфизмов, имеющих самую низкую и самую высокую частоты встречаемости гомо- или гетерозиготного генотипа в отдельной породе с возможным приближением оставшихся замен к средней частоте встречаемости около 0,3, являющейся оптимальным уровнем для каждого из вариантов генотипов полиморфизма. В таком случае, каждый вариант генотипа по конкретной замене встречается приблизительно одинаково часто и исключены случаи, когда будет обнаруживаться только один вариант замены, так как тогда генотипирование с целью подтверждения достоверности происхождения по этой замене будет невозможно. В результате проведенного редактирования панели было исключено 116 локусов для генотипирования секвенированием овец породы джалгинский меринос. Для дальнейшей работы использовали 352 замены.

Проверка применения модифицированной панели локусов при генотипировании овец породы джалгинский меринос показала, что средняя частота встречаемости диких гомозиготных вариантов замен составила около 0,3 с разбросом индивидуальных значений от минимума 0,270 до максимума 0,340 (табл. 4).

Таблица 4 – Параметры генотипируемых для подтверждения достоверности происхождения SNP у баранов породы джалгинский меринос 2022 года рождения /

Table 4 – Parameters of genotyped SNP to confirm the authenticity of the origin in rams of the Dzhalginsky Merino breed born in 2022

Показатель / Index	Среднее / Average	Ошибка среднего / The error of the average	Min	Max
Частота встречаемости / Frequency of occurrence:				
диких гомозигот / wild homozygotes	0,305	0,016	0,270	0,340
гетерозигот / heterozygotes	0,372	0,031	0,340	0,440
мутантных гомозигот / mutant homozygotes	0,287	0,024	0,220	0,380
Частота дикого аллеля / The frequency of the wild allele	0,540	0,070	0,440	0,650
Частота мутантного аллеля / The frequency of the mutant allele	0,460	0,030	0,350	0,560

Для такого варианта генотипа это является очень хорошим результатом. Средняя частота встречаемости гетерозиготных генотипов составила 0,372, минимальная частота встречаемости – 0,340, наибольшее значение в выборке – 0,440. Так как частота встречаемости гетерозиготных генотипов была изначально

больше, по сравнению с гомозиготными (данные с ДНК-биочипов), то такой результат следует считать оптимальным для генотипирования. Средняя частота встречаемости мутантных гомозиготных вариантов замен у джалгинского мериноса составила 0,287 при минимумах на уровне 0,220 и максимумах около 0,380.

Подобный показатель мы также считаем очень хорошим, так как все полиморфизмы имеют достаточную частоту встречаемости и для использования при генотипировании следующих поколений джалгинских мериносов.

Анализ показателей генотипирования по полиморфизмам, связанным с показателями

мясной продуктивности у джалгинских мериносов 2022 года рождения, выявил, что средняя частота встречаемости замен с диким гомозиготным генотипом составила около 0,3, что не отличается от показателей генотипирования на предыдущем этапе исследования (табл. 5).

Таблица 5 – Параметры генотипируемых для оценки мясной продуктивности SNP у баранов породы джалгинский меринос 2022 года рождения /
Table 5 – The parameters of the genotyped SNP for assessing meat productivity in sheep of the Dzhalginsky Merino breed born in 2022

Показатель / Index	Среднее / Average	Ошибка среднего / The error of the average	Min	Max
Частота встречаемости / Frequency of occurrence:				
диких гомозигот / wild homozygotes	0,303	0,021	0,171	0,451
гетерозигот / heterozygotes	0,361	0,029	0,189	0,453
мутантных гомозигот / mutant homozygotes	0,388	0,030	0,046	0,672
Частота дикого аллеля / The frequency of the wild allele	0,470	0,060	0,220	0,760
Частота мутантного аллеля / The frequency of the mutant allele	0,530	0,070	0,240	0,880

Средняя частота встречаемости гетерозиготных генотипов по заменам увеличилась с 0,311 до 0,361. Но диапазон между минимальной и максимальной частотой встречаемости стал меньше, снизившись с 0,358 до 0,264. Мутантные гомозиготы встречались практически с той же частотой, что и у животных 2021 года рождения, с небольшим снижением с 0,406 до 0,388. Средняя частота каждого из аллелей почти не изменилась, они встречались почти с одинаковой частотой около 0,5. Минимальные и максимальные показатели частоты аллелей также были похожи на результаты для животных на предыдущем этапе генотипирования.

Использование генотипирования секвенированием в селекционной работе по улучшению продуктивных качеств овец российских пород требует определенного объема исследовательской работы. Нами ранее была подготовлена панель локусов, применимых при генотипировании джалгинских мериносов на основе данных, полученных с помощью ДНК-биочипов высокой плотности. Выбранные полиморфизмы были разделены на две группы. В первую вошли замены, не показавшие достоверной связи с показателями экстерьера животных, но встречающиеся с примерно равной частотой гомозиготных и гетерозиготных генотипов. Они были расположены по всем хромосомам и могли успешно характеризовать генотипы при определении достоверности

происхождения животных. Можно было сравнить их наличие у обоих предков и потомка, на основании чего сделать вывод о возможности формирования генотипа последнего. Вторая группа содержала полиморфизмы, которые имели достоверные связи с показателями продуктивности у овец породы джалгинский меринос. Их мы выявили самостоятельно в ходе предыдущих исследований на основе полногеномного поиска ассоциаций с использованием тех же ДНК-биочипов.

Настоящее исследование было посвящено оценке результатов генотипирования джалгинских мериносов с использованием выбранной панели локусов для оценки изменения их частоты встречаемости, по сравнению с полученными нами ранее данными на ДНК-биочипах. Так как между изучаемыми группами произошла смена нескольких поколений, было важно установить, какие из полиморфизмов обнаруживаются у животных с требуемой для качественного генотипирования частотой встречаемости, а какие утратили необходимую информативность в связи со снижением встречаемости одного из аллелей и дисбалансом частот выявляемых генотипов. Это касалось прежде всего замен из группы, применимой для подтверждения достоверности происхождения, так как у полиморфизмов, ассоциированных с мясной продуктивностью, изначально наблюдали дисбаланс встречаемости различ-

ных генотипов, что является необходимым условием для возможности использования этих SNP при селекционной работе. Для используемых при оценке происхождения полиморфизмов мы ставили несколько меньший, чем рекомендовал Tortereau et al. (2017) порог частоты встречаемости 0,3, приняв это значение приемлемым для среднего показателя частоты встречаемости выбранных замен в выборке животных [16].

Проведенное исследование показало, что большинство полиморфизмов для генотипирования с целью подтверждения достоверности происхождения сохранили свою информативность к 2022 году, когда было генотипировано поколение 2021 года рождения в возрасте 12 месяцев. Часть же полиморфизмов стали встречаться достаточно редко, чтобы использовать их при массовом генотипировании. Их было решено исключить из перечня исследуемых замен. Оставшееся количество полиморфизмов после коррекции составило 352. Это более чем в три раза превышает показатель, считающийся достаточным для достоверной оценки родства [17]. Мы полагаем такое количество полиморфизмов несколько избыточным для использования при массовом генотипировании, однако это позволяет иметь запас полиморфизмов, которые можно будет исключать при снижении их информативности в случае закрепления в породе одного из аллелей.

На втором этапе исследований модифицированная панель локусов показала, что у особей, обследованных в 2023 году, частота выявляемых замен находится в достаточных

пределах для получения достоверных результатов оценки родства у животных.

Оценка частоты встречаемости полиморфизмов, имеющих достоверную связь с показателями мясной продуктивности, между группами 2021 и 2022 года рождения показала, что большинство замен почти не различаются по частоте встречаемости между поколениями. Это связано с тем, что в обследованных хозяйствах пока не используется метод маркер-ассоциированной селекции для улучшения продуктивных качеств и причин для изменения частоты встречаемости полиморфизмов из исследуемой группы не было.

Заключение. Предложенная нами панель локусов, модифицированная после валидации на следующем поколении животных, содержит 352 замены, пригодные для генотипирования секвенированием и 413 полиморфизмов, ассоциированных с мясной продуктивностью животных. Полученные в результате исследований показатели частоты встречаемости замен в группе выбранных животных позволяют сделать заключение, что выбранные нами полиморфизмы находятся в локусах, не подверженных существенным перестройкам в течение нескольких поколений, и могут быть информативны в течение достаточно длительного времени. Использование разработанной нами панели позволит реализовать как официальные требования законодательства по определению достоверности происхождения в племенных хозяйствах, так и быть полезным в практических целях селекционерам при работе по повышению продуктивности породы джалгинский меринос.

References

1. Mrode R. A., Ojango J. M. K., Okeyo A. M., Mwacharo J. Genomic selection and use of molecular tools in breeding programs for indigenous and crossbred cattle in developing countries: current status and future prospects. *Frontiers in Genetics*. 2018;9:694. DOI: <https://doi.org/10.3389/fgene.2018.00694>
2. Braz C. U., Rowan T. N., Schnabel R. D., Decker J. E. Genome-wide association analyses identify genotype-by-environment interactions of growth traits in Simmental cattle. *Scientific report*. 2021;11(1):13335. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-021-92455-x>
3. Gao G., Gao N., Li S., Kuang W., Zhu L., Jiang W., et al. Genome-Wide Association Study of Meat Quality Traits in a Three-Way Crossbred Commercial Pig Population. *Frontiers in Genetics*. 2021;12:614087. DOI: <https://doi.org/10.3389/fgene.2021.614087>
4. Xu S.-S., Gao L., Shen M., Lyu F. Whole-Genome Selective Scans Detect Genes Associated With Important Phenotypic Traits in Sheep (*Ovis aries*). *Frontiers in Genetics*. 2021;12:738879. DOI: <https://doi.org/10.3389/fgene.2021.738879>
5. Al-Atiyat M. R. The power of 28 microsatellite markers for parentage testing in sheep. *Electronic Journal of Biotechnology*. 2015;18(2):116–121. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2015.01.001>
6. De Camargo G. M. F. The role of molecular genetics in livestock production. *Animal Production Science*. 2018;59(2):201–206. DOI: <https://doi.org/10.1071/AN18013>
7. Rahman M. A., Juyena N. S., Shmsuddin M., Bhuiyan M. M. U. Genomic tools and genetic improvement of crossbred Friesian cattle. *Research in Agriculture Livestock and Fisheries*. 2021;8(1):89–107. DOI: <https://doi.org/10.3329/ralf.v8i1.53271>
8. Gebrehiwot N. Z., Strucken E. M., Marshall K., Aliloo H., Gibson J. P. SNP panels for the estimation of dairy breed proportion and parentage assignment in African crossbred dairy cattle. *Genetics Selection Evolution*. 2021;53:21. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12711-021-00615-4>

9. Brito L. F., Clarke S. M., McEwan J. C., Miller S. P., Pickering N. K., Bain W. E., et al. Prediction of genomic breeding values for growth, carcass and meat quality traits in a multi-breed sheep population using a HD SNP chip. BMC Genomic Data. 2017;18:7. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12863-017-0476-8>
10. Clarke S. M., Henry H. M., Dodds K. G., Jowett T. W. D., Manley T. R., Anderson R. M., et al. A high throughput single nucleotide polymorphism multiplex assay for parentage assignment in New Zealand sheep. PLoS ONE. 2014;9(4):e93392. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0093392>
11. Heaton M. P., Leymaster K. A., Kalbfleisch T. S., Kijas J. W., Clarke S. M., McEwan J. C., et al. SNPs for Parentage Testing and Traceability in Globally Diverse Breeds of Sheep. PLoS ONE. 2014;9(4):e94851. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0094851>
12. De Donato M., Peters S. O., Mitchell S. E., Hussain T., Imumorin I. G. Genotyping-by-Sequencing (GBS): A Novel, Efficient and Cost-Effective Genotyping Method for Cattle Using Next-Generation Sequencing. PLoS ONE. 2013;8(5):e62137. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0062137>
13. Ciani E., Mastrangelo S., Da Silva A., Marroni F., Ferenčaković M., Ajmone-Marsan P., et al. On the origin of European sheep as revealed by the diversity of the Balkan breeds and by optimizing population-genetic analysis tools. Genetics Selection Evolution. 2020;52:25. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12711-020-00545-7>
14. Willis R. C. A., Burrell M., Swimley P., Siddavatam R. Modular automation solution for genotyping by sequencing for animal breeding. Proc. W. Cong. Gen. App. Livest. Prod. 2018;11:313.
15. Krivoruchko A., Likhovid A., Kanibolotskaya A., Saprikina T., Kizilova N., Kukharuk M., Yatsyk O. A genome-wide SNPs searching using the Illumina BeadChip in Jalgin Merino sheep breed. Bulgarian Journal of Agricultural Science. 2024;30(1):3–10.
16. Tortereau F., Moreno C. R., Tosser-Klopp G. Development of a SNP panel dedicated to parentage assignment in French sheep populations. BMC genetics. 2017;18:50. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12863-017-0518-2>
17. McClure M. C., McCarthy J., Flynn P., McClure J. C., Dair E., O'Connell D. K., Kearney J. F. SNP Data Quality Control in a National Beef and Dairy Cattle System and Highly Accurate SNP Based Parentage Verification and Identification. Frontiers in Genetics. 2018;9:00084. DOI: <https://doi.org/10.3389/fgene.2018.00084>

Сведения об авторах

Криворучко Александр Юрьевич, доктор биол. наук, главный научный сотрудник лаборатории геномной селекции и репродуктивной криобиологии в животноводстве, Всероссийский научно-исследовательский институт овцеводства и козоводства – филиал ФГБНУ «Северо-Кавказский федеральный научный аграрный центр», д. 15, пер. Зоотехнический, г. Ставрополь, Российская Федерация, 355017, e-mail: vniiok@fnac.center,
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4536-1814>

✉ **Каниболоцкая Анастасия Александровна**, кандидат биол. наук, старший научный сотрудник лаборатории геномной селекции и репродуктивной криобиологии в животноводстве, Всероссийский научно-исследовательский институт овцеводства и козоводства – филиал ФГБНУ «Северо-Кавказский федеральный научный аграрный центр», д. 15, пер. Зоотехнический, г. Ставрополь, Российская Федерация, 355017, e-mail: vniiok@fnac.center,
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3003-4175>, e-mail: dorohin.2012@inbox.ru

Скорых Лариса Николаевна, доктор биол. наук, главный научный сотрудник лаборатории геномной селекции и репродуктивной криобиологии в животноводстве, Всероссийский научно-исследовательский институт овцеводства и козоводства – филиал ФГБНУ «Северо-Кавказский федеральный научный аграрный центр», д. 15, пер. Зоотехнический, г. Ставрополь, Российская Федерация, 355017, e-mail: vniiok@fnac.center,
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6090-4453>

Криворучко Ольга Николаевна, аспирант, Всероссийский научно-исследовательский институт овцеводства и козоводства – филиал ФГБНУ «Северо-Кавказский федеральный научный аграрный центр», д. 15, пер. Зоотехнический, г. Ставрополь, Российская Федерация, 355017, e-mail: vniiok@fnac.center,
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4737-2982>

Information about the authors

Alexander Yu. Krivoruchko, DSc in Biology, chief researcher, the Laboratory of Genomic Breeding and Reproductive Cryobiology in Animal Husbandry, VNIIOK – branch North Caucasus Federal Agricultural Research Centre, 15, lane Zootechnical, Stavropol, Russian Federation, 355017, e-mail: vniiok@fnac.center, **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0003-4536-1814>

✉ **Anastasia A. Kanibolotskaya**, PhD in Biology, senior researcher, the Laboratory of Genomic Breeding and Reproductive Cryobiology in Animal Husbandry, VNIIOK – branch North Caucasus Federal Agricultural Research Centre, 15, lane Zootechnical, Stavropol, Russian Federation, 355017, e-mail: vniiok@fnac.center,
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3003-4175>, e-mail: dorohin.2012@inbox.ru

Larisa N. Skorykh, DSc in Biology, chief researcher, the Laboratory of Genomic Breeding and Reproductive Cryobiology in Animal Husbandry, VNIIOK – branch North Caucasus Federal Agricultural Research Centre, 15, lane Zootechnical, Stavropol, Russian Federation, 355017, e-mail: vniiok@fnac.center, **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0002-6090-4453>

Olga N. Krivoruchko, graduate student, VNIIOK – branch North Caucasus Federal Agricultural Research Centre, 15, lane Zootechnical, Stavropol, Russian Federation, 355017, e-mail: vniiok@fnac.center,
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4737-2982>

✉ – Для контактов / Corresponding author