УДК: 636.082.12:636.32/.38.082.13
DOI: 10.52419/issn2072-2419.2024.4.438

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ТАРГЕТНОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ ДЛЯ ГЕНОТИПИРОВАНИЯ ОВЕЦ ПОРОДЫ МАНЫЧСКИЙ МЕРИНОС

Криворучко А.Ю.[1,2] **–** д-р биол. наук, гл. науч. сотр. (ORCID 0000-0003-4536-1814); **Каниболоцкая А.А.*** **–** канд. биол. наук, ст. науч. сотр. (ORCID 0000-0003-3003-4175); **Скорых Л.Н. –** д-р биол. наук, гл. науч. сотр. (ORCID 0000-0002-6090-4453); **Сафарян Е.Ю.**[1,2] **–** канд. биол. наук, науч. сотр. (ORCID 0000-0002-2049-842X); **Криворучко О.Н. –** аспирант (ORCID 0009-0005-2051-007X).

ФГБНУ «Северо-Кавказский Федеральный научный аграрный центр»,
ФГАОУ ВО «Северо-Кавказский федеральный университет»

*dorohin.2012@inbox.ru

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

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

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

Поступила: 21.10.2024 **Принята к публикации: 02.12.2024**
Опубликована онлайн:16.12.2024

РЕФЕРАТ

Основное применение генетических данных – оценка достоверности происхождения, поскольку ошибки в родословных негативно влияют на темпы генетического прироста. Изначально, оценка родословной племенного поголовья скота осуществлялась с помощью различных ДНК-технологий: от групп крови, затем с использованием микросателлитных маркеров, однако, сейчас все больше изучается возможность использования на практике однонуклеотидных полиморфизмов (SNP), из-за их возможности повысить точность проводимых генетических исследований. Одной из таких систем генотипирования являются панели AgriSeq (технология таргетного секвенирования), которые позволяют анализировать конкретные участки генома (локусы), ассоциированные с множеством признаков у животных. Цель работы: изучить эффективность выявления и распространенности локусов из предложенного набора SNP при обследовании новых поколений овец породы манычский меринос. Материалом для исследования послужили данные таргетного секвенирования геномов овец российских пород по сформированному набору локусов с целью выявления однонуклеотидных полиморфизмов. Объектом исследования являлись бараны 2021 года рождения в возрасте 12 месяцев (отбор образцов ДНК проводился в 2022 году) породы манычский меринос. Предложенная нами панель локусов, модифицированная после валидации на следующем поколении животных, содержит 389 замен, пригодные для генотипирования секвенированием и 242 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. Проведенный анализ позволяет сделать заключение, что после модификации набора локусов панель для генотипирования секвенированием у манычского мериноса показала высокую эффективность выявления всех вариантов генотипов.

ВВЕДЕНИЕ / INTRODUCTION

Обычная оценка достоверности происхождения у многих видов животных, в том числе у крупного и мелкого рогатого скота, лошадей, свиней и даже голубей в настоящее время выполняется с помощью генотипирования по микросателлитным маркерам (короткие тандемные повторы (STR) [1;2;3]. Такой метод тестирования позволяет высокодостоверно определить потомков и родителей, за счет того, что микросателлитные локусы высокополиморфны и очень редко изменяются при передаче наследственной информации. Метод хорошо валидирован практически на всех видах сельскохозяйственных животных, достаточно дешевый при массовом использовании, но имеет свои ограничения, связанные с ограниченным перечнем одновременно оцениваемых локусов [4].

Переход на SNP для проверки и идентификации достоверности происхождения сельскохозяйственных животных вызвал большой интерес [1;5] и осуществляется для многих видов животных. SNP хорошо подходят для использования в качестве генетических маркеров по нескольким причинам. SNP в изобилии встречаются в геноме, как правило, стабильны в процессе эволюции и имеют низкую частоту мутаций [6]. Совершенствование технологий секвенирования нового поколения позволили добиться существенного удешевления стоимости платформ для генотипирования, что способствует роботизированной автоматизации, и может повысить эффективность и точность тестирования без дополнительных затрат. Одним из важных преимуществ генотипирования SNP по сравнению с STR-маркерами является то, что панели для оценки достоверности происхождения можно комбинировать с маркерами генетических аномалий и продуктивных признаков для создания более эффективных и надежных платформ генотипирования [7].

Для генотипирования секвенированием в практическом животноводстве, в том числе у крупного рогатого скота и свиней, имеется ряд геномных панелей и специализированного программного обеспечения для автоматизации пробоподготовки и учета результатов после получения данных по прочтениям геномных библиотек. Одной из таких систем являются панели AgriSeq (технология таргетного секвенирования), которые позволяют анализировать конкретные участки генома (локусы), ассоциированные с хозяйственно ценными признаками, генетическими аномалиями и достоверностью происхождения, без необходимости секвенирования всего генома целиком [8]. Это существенно упрощает выявление маркеров и ускоряет интерпретацию полученных данных. Однако, в овцеводстве такой метод еще не нашел широко распространения за счет того, что необходимо было провести предварительный отбор локусов, пригодных для генотипирования секвенированием, позволяющих проводить одновременную оценку достоверности происхождения и хозяйственно полезных признаков, для дальнейшего использования в селекционной работе. Ранее нами была разработана панель локусов для генотипирования секвенированием овец породы джалгинский меринос на основе данных, полученных при помощи ДНК-биочипов Illumina и проведенного полногеномного поиска ассоциаций. В результате был получен набор из 765 локусов, включающий как наиболее распространенные варианты 352 SNP полиморфиз-

мов для оценки достоверности происхождения, так и 413 SNP, достоверно связанных с параметрами мясной продуктивности. Поиск которых осуществлялся с использованием международных баз геномных данных [9, 10, 11]. Цель настоящего исследования заключается в том, чтобы изучить эффективность выявления и распространенности локусов из предложенного набора SNP при обследовании новых поколений овец породы манычский меринос.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ / MATERIALS AND METHODS Исследования проводились 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 проводился в 2022 году) породы манычский 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 стали годовалые бараны породы манычский меринос 2022 года рождения (отбор образцов ДНК выполнен в 2023 году). Количество образцов составило 55 единиц. Критерии отбора были те же, что и на предыдущем этапе исследования.

Генотипирование секвенированием осуществлялось 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 секвенированием в рамках предложенной панели. Сравнение частоты встречаемости для оценки стабильности выявления отдельных SNP в целях генотипирования животных проводилось с ранее полученными данными, полученными путем генотипирования на чипах Ovine Infinium HD BeadChip 600K (Illumina Inc. CA, США). После этого 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 для генотипирования животных 2022 года рождения, на втором этапе эксперимента. Для выявленных полиморфизмов в образцах ДНК баранов следующего поколения также была проведена оценка частоты встречаемости генотипов и сделан 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 кастомиза-

ции 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 SuiteTM и Ion ReporterTM (Thermo Fisher Scientific, США).

Контроль качества генотипирования. Контроль качества генотипирования проводился с использованием программного обеспечения Torrent SuiteTM и PLINK V.1.07. Длина 97% прямых и обратных ридов находилась в пределах 150-152 п.н. Для 64 % прямых ридов и 58 % обратных ридов было зарегистрировано не менее, чем 36-кратное прочтение. Количество 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 были исключены 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) использовалось значение p=0,00001.

Генетический и статистический анализ. 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 производили 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 проведенным 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. Для изучения биологических функций всех аннотированных генов и связанных с ними признаков мы использовали базы данных NCBI Gene (RRID: SCR_002473), Ensembl release version 110 (RRID: SCR_002344; [11]) и UniProt (RRID: SCR_002380; [12]).

РЕЗУЛЬТАТЫ / RESULTS

Генотипирование секвенированием выполнялось по набору локусов, включающему 242 полиморфизма, влияющих на продуктивные качества у манычского мериноса и 515 замен, используемых для подтверждения достоверности происхождения. Кроме этого, для генотипирования использовались общие для всех пород полиморфизмы.

Результаты генотипирования секвенированием по локусам, используемым для подтверждения достоверности происхождения, показали, что средняя частота встречаемости диких гомозиготных генотипов была близкой к оптимальному значению и составляла 0,275 (таблица 1).

Диапазон значений частоты встречаемости диких гомозигот у манычского мериноса находился в пределах от 0,221 до 0,354. При анализе распределения диких гомозиготных генотипов по количеству в зависимости от частоты встречаемости было обнаружено, что наибольшее количество замен имело частоту около 0,243 (рисунок 1).

Меньше всего полиморфизмов имело частоту встречаемости возле верхней границы диапазона – около 0,35. Гетерозиготные генотипы по изучаемым заменам у манычского мериноса показали среднюю частоту встречаемости на 25 %

Таблица 1 – Параметры генотипируемых для подтверждения достоверности происхождения SNP у баранов породы манычский меринос

Показатель	Среднее	Ошибка среднего	Минимальное значение	Максимальное значение
Частота встречаемости диких гомозигот	0,275	0,034	0,221	0,354
Частота встречаемости гетерозигот	0,382	0,042	0,312	0,465
Частота встречаемости мутантных гомозигот	0,354	0,039	0,261	0,471
Частота дикого аллеля	0,59	0,07	0,28	0,71
Частота мутантого аллеля	0,41	0,06	0,29	0,72

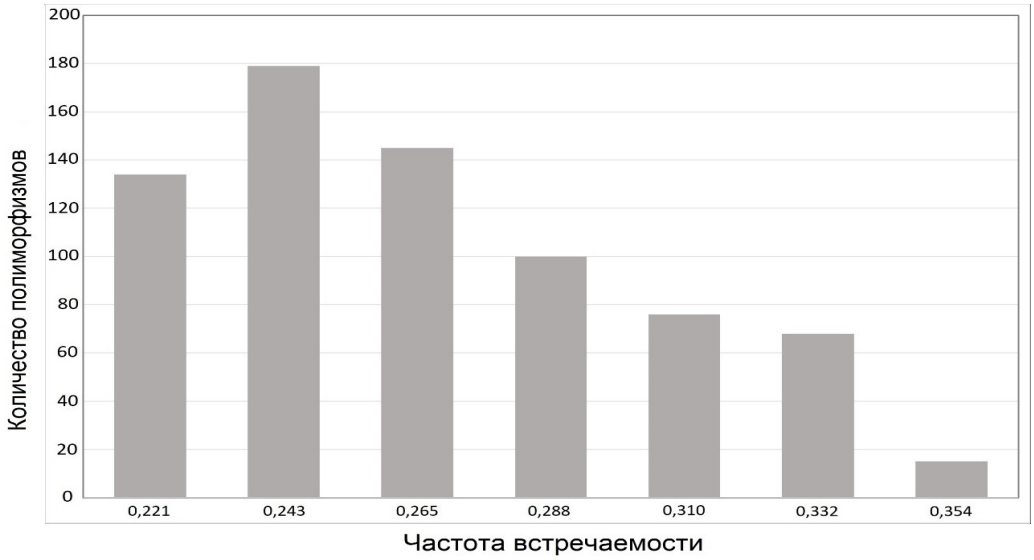

Рисунок 1 – Количество SNP с разной частотой встречаемости у баранов породы манычский меринос. Дикие гомозиготные генотипы.

больше оптимального значения, она составила 0,38. При этом, только замены у нижней границы диапазона частот встречаемости обнаруживали показатели, приближающиеся к оптимуму – около 0,31. Максимальные значения частоты встречаемости были на 50 % больше необходимых, доходя до 0,47. Наибольшее число полиморфизмов в гетерозиготном варианте имели частоту встречаемости около 0,414 (рисунок 2). Меньше всего замен мы выявили у верхней границы диапазона 0,465.

Мутантные гомозиготные варианты полиморфизмов из нашего набора локусов для генотипирования секвенированием имели среднюю частоту встречаемости 0,354. Это не так сильно, как у гетерозиготных вариантов, но все же отличалось от оптимального показателя для генотипирования. Разброс индивидуальных частот встречаемости полиморфизмов был выше, чем у гетерозигот. Минимальный показатель составил 0,26, а максимальный – 0,47. Больше всего замен имели частоту встречаемости мутантных го-

мозиготных генотипов около 0,296 и 0,331 (рисунок 3). Наименьшее число полиморфизмов имело частоту встречаемости в пределах 0,436–0,471.

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 (таблица 1).

При генотипировании секвенированием по локусам, ассоциированным с мясной продуктивностью у манычских мериносов, было обнаружено, что средняя частота встречаемости диких гомозиготных генотипов была близка к оптимальному параметру для генотипирования и составляла 0,331 (таблица 2).

Минимальный показатель частоты встречаемости этих генотипов составлял 0,206, а максимальная зафиксированная частота встречаемости была 0,47. Наибольшее число замен, имеющих дикий гомозиготный генотип, показывали частоту встречаемости около 0,25 (рисунок 4).

Меньше всего полиморфизмов имели частоту встречаемости у верхней границы диапазона в 0,47. Гетерозиготные варианты исследуемых замен показали среднюю частоту встречаемости, близкую к параметрам диких гомозигот. Она составила 0,316 при разбросе показателей для индивидуальных полиморфизмов от 0,197 до 0,411. Анализ распределения замен по количеству в зависимости от частоты встречаемости выявил наибольшее число замен с частотой встречаемости около 0,304, а наименьшее – 0,197 и 0,375 (рисунок 5).

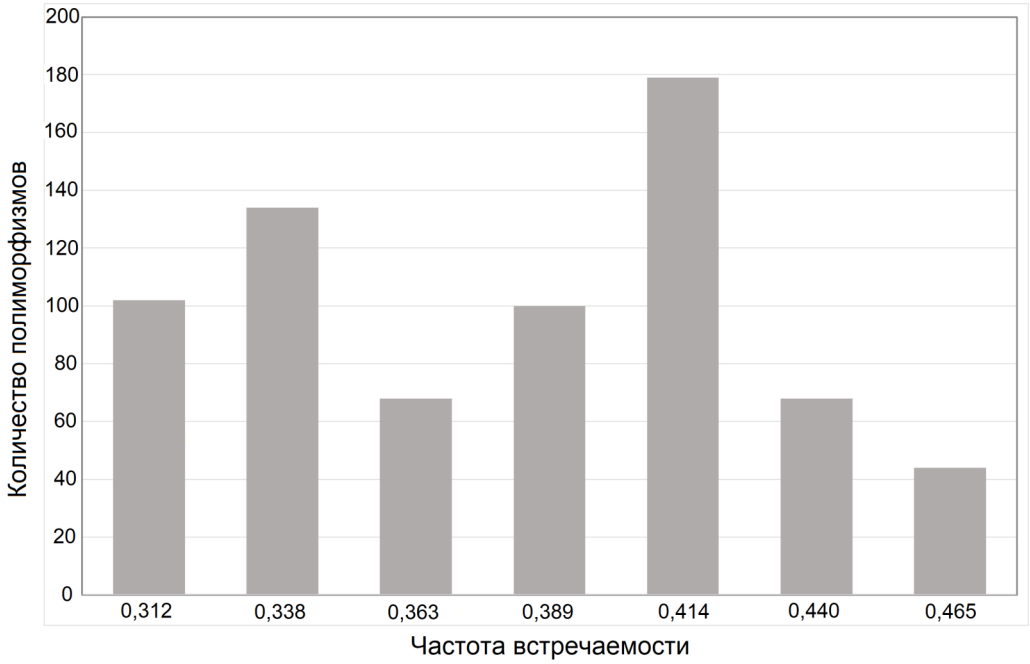

Рисунок 2 – Количество SNP с разной частотой встречаемости у баранов породы манычский меринос. Гетерозиготные генотипы.

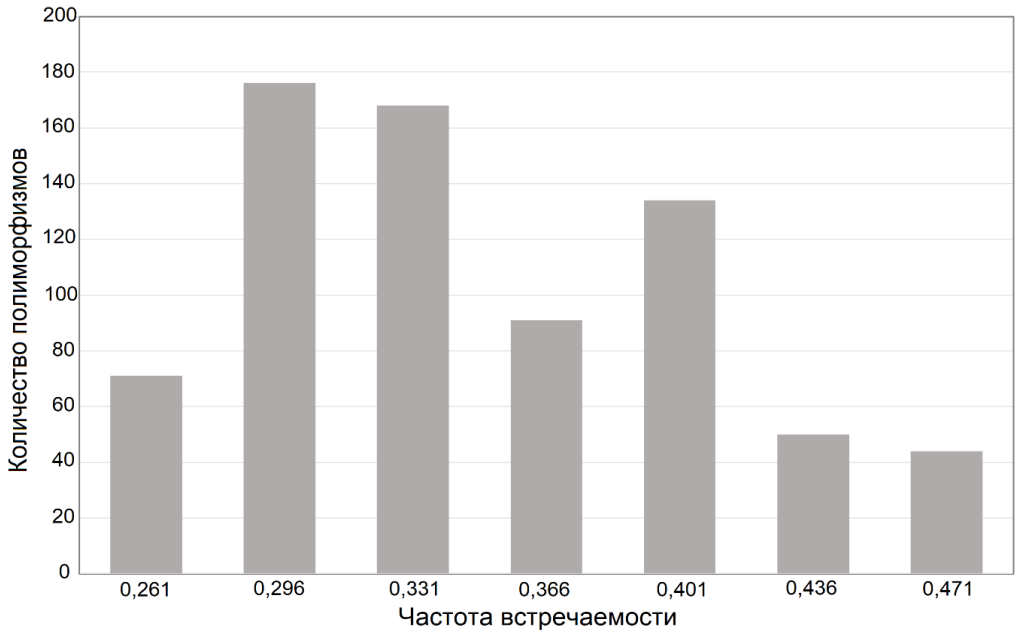

Рисунок 3 – Количество SNP с разной частотой встречаемости у баранов породы манычский меринос. Мутантные гомозиготные генотипы.

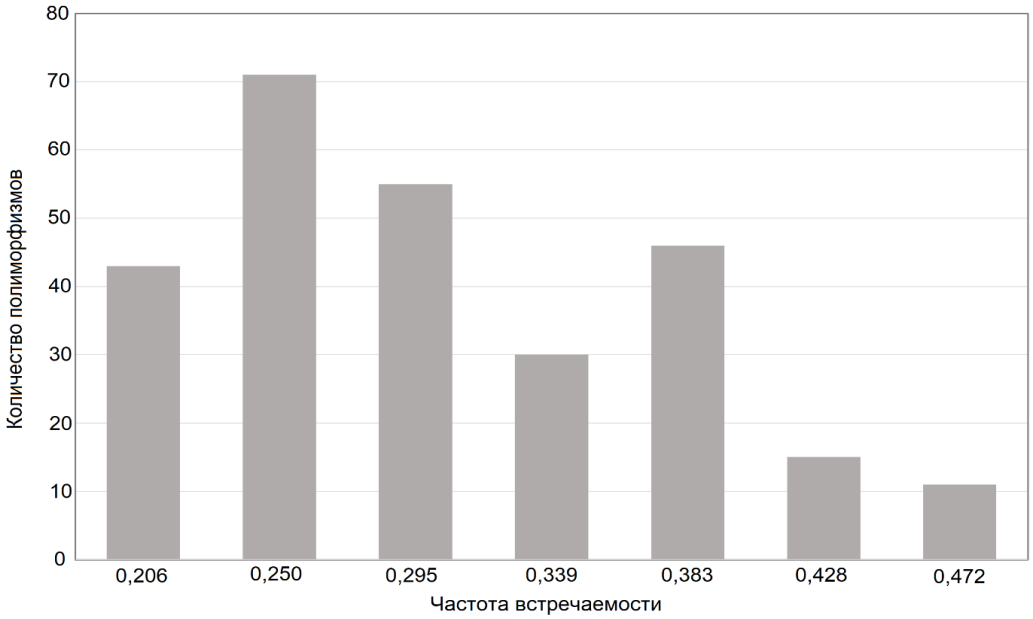

Рисунок 4 – Количество связанных с мясной продуктивностью SNP с разной частотой встречаемости у баранов породы манычский меринос. Дикие гомозиготные генотипы.

Таблица 2 – Параметры генотипируемых для оценки мясной продуктивности SNP у баранов породы манычский меринос

Показатель	Среднее	Ошибка среднего	Минимальное значение	Максимальное значение
Частота встречаемости диких гомозигот	0,331	0,021	0,206	0,472
Частота встречаемости гетерозигот	0,316	0,043	0,197	0,411
Частота встречаемости мутантных гомозигот	0,248	0,051	0,072	0,351
Частота дикого аллеля	0,418	0,07	0,24	0,71
Частота мутантого аллеля	0,582	0,09	0,29	0,76

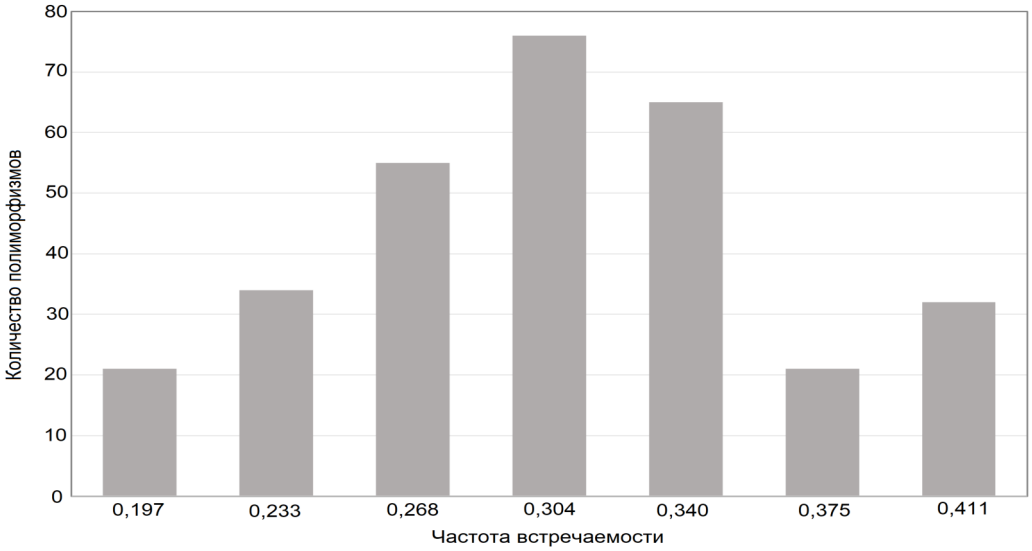

Рисунок 5 – Количество связанных с мясной продуктивностью SNP с разной частотой встречаемости у баранов породы манычский меринос. Гетерозиготные генотипы.

Таблица 3 – Изменение частоты встречаемости SNP у баранов породы манычский меринос по сравнению с данными генотипирования на ДНК-биочипах

Показатель	Среднее	Ошибка среднего	Минимальное значение	Максимальное значение
Изменение частоты встречаемости диких гомозигот, %	9,214	0,62	1,921	21,618
Изменение частоты встречаемости гетерозигот, %	11,433	1,02	0,911	22,149
Изменение частоты встречаемости мутантных гомозигот, %	12,306	1,55	0,381	41,074

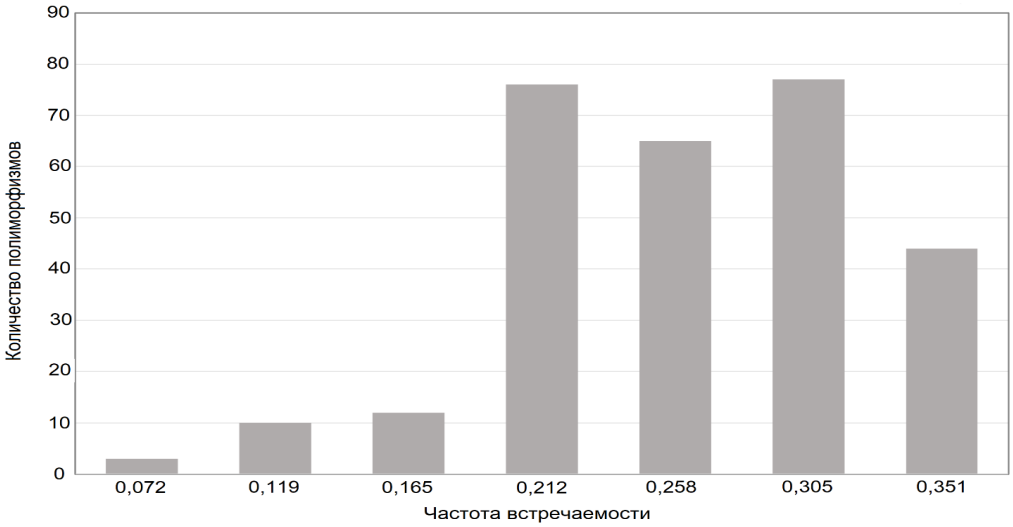

Рисунок 6 – Количество связанных с мясной продуктивностью SNP с разной частотой встречаемости у баранов породы манычский меринос. Мутантные гомозиготные генотипы.

Средняя частота встречаемости мутантных гомозигот в нашем исследовании была относительно низкой и составляла 0,248. При этом был зафиксирован достаточной большой разброс в показателях для отдельных замен. Минимальным значением было 0,072, а максимум находился на уровне 0,35. Больше всего у манычского мериноса мутантных гомозиготных генотипов было обнаружено с частотой встречаемости около 0,212 и 0,305 (рисунок 6). Минимальное количество полиморфизмов выявлялись у нижней границы диапазона с частотой 0,07 и 0,12.

Изучение различий в частоте встречаемости полиморфизмов при генотипировании секвенированием и предшествующим генотипированием с использованием ДНК-биочипов показало, что дикие гомозиготные варианты замен в среднем поменяли частоту встречаемости на 9% (таблица 3).

У отдельных полиморфизмов этот показатель составлял от 1,9 % до 21,6 %. Почти такое же изменение частоты встречаемости в среднем показали и гетерозиготные варианты изучаемых замен. Оно составило в среднем 11,4 % с изменениями от 0,9 % (почти полное отсутствие изменения частоты встречаемости) до 22 % у показавших максимум изменений. Аналогичный порядок изменений частоты встречаемости показали и мутантные гомозиготы. В среднем этот показатель составил 12,3 % и изменялся у отдельных замен от 0,38 % до 41,1 %.

Полученные результаты по изменению частоты встречаемости SNP 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 нами для генотипирования локусов.

Корректировка перечня локусов для генотипирования секвенированием у овец породы манычский меринос и валидация новой панели у поколения 2022 года рождения.

Дальнейшее редактирование набора локусов в составе панели генотипирования секвенированием для манычских мериносов затронуло только замены, используемые для оценки достоверности происхождения. Это связано с рядом причин, во-первых, SNP, ассоциированные с продуктивными признаками у животных

встречаются с дисбалансом частоты минорных и главных аллелей, что допустимо в маркерной селекции, где закрепление одной из аллелей с большой частотой встречаемости является основной целью. Это позволяет использовать разработанную нами панель в селекционно–племенной работе для контроля маркеров продуктивных признаков.

Редактирование локусов для панели генотипирования включается в себя этап отбора полиморфизмов, имеющих наименьшую и наивысшую частоту встречаемости гомо- или гетерозиготного генотипа среди всех образцов и их исключению из дальнейшей работы, для оставшихся замен отобрать все с частотой 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 126 локусов для генотипирования секвенированием овец породы манычский меринос. Для дальнейшей работы использовалось 389 замены.

Изучение результатов генотипирования секвенированием после модификации набора локусов показало, что средние частоты встречаемости всех генотипов были близки к оптимальным значениям для оценки генотипа животных (таблица 4).

Так, дикие гомозиготные варианты замен имели среднюю частоту встречаемости 0,298, то есть практически 0,3 – показатель, являющийся наиболее соответствующим требованиям по частоте встречаемости генотипов. Минимальное и максимальное значение частот встречаемости полиморфизмов с изучаемым вариантом генотипа составило 0,261 и 0,332, что также не сильно отличается от среднего параметра по выборке. Гетерозиготные генотипы имели среднюю частоту встречаемости 0,35 при минимальных значениях на уровне 0,32 и максимуме при 0,398. Эти параметры укладываются в показатели для гетерозиготных генотипов, используемых при выборе замен для генотипирования еще на этапе изучения данных с ДНК-биочипов. Параметры средней частоты встречаемости мутантных гомозиготных вариантов замен у манычских мериносов находились на уровне 0,308 – оптимального уровня для оценки качества генотипирования по набору замен. Минимальная частота встречаемости для замен в этой группе составляла 0,27, а максимальная – 0,37.

Изучение различий в частоте встречаемости полиморфизмов у баранов породы манычский меринос по сравнению с данными генотипирования прошлого поколения показало, что дикие гомозиготные варианты замен в среднем поменяли частоту встречаемости на 7 % (таблица 5).

Таблица 4 – Параметры генотипируемых для подтверждения достоверности происхождения SNP у баранов породы манычский меринос 2022 г.р.

Показатель	Среднее	Ошибка среднего	Минимальное значение	Максимальное значение
Частота встречаемости диких гомозигот	0,298	0,024	0,261	0,332
Частота встречаемости гетерозигот	0,346	0,037	0,318	0,398
Частота встречаемости мутантных гомозигот	0,308	0,024	0,273	0,371
Частота дикого аллеля	0,57	0,08	0,35	0,69
Частота мутантого аллеля	0,43	0,04	0,31	0,65

Таблица 5 – Изменение частоты встречаемости SNP у баранов породы манычский меринос по сравнению с данными генотипирования поколения 2021 г.р.

Показатель	Среднее	Ошибка среднего	Минимальное значение	Максимальное значение
Изменение частоты встречаемости диких гомозигот, %	7,13	0,51	1,154	14,451
Изменение частоты встречаемости гетерозигот, %	8,91	1,13	1,228	19,731
Изменение частоты встречаемости мутантных гомозигот, %	11,94	1,32	0,451	31,349

Таблица 6 – Параметры генотипируемых для оценки мясной продуктивности SNP у баранов породы манычский меринос 2022 г.р.

Показатель	Среднее	Ошибка среднего	Минимальное значение	Максимальное значение
Частота встречаемости диких гомозигот	0,304	0,016	0,239	0,417
Частота встречаемости гетерозигот	0,341	0,032	0,227	0,384
Частота встречаемости мутантных гомозигот	0,287	0,044	0,162	0,369
Частота дикого аллеля	0,43	0,07	0,29	0,68
Частота мутантого аллеля	0,57	0,09	0,32	0,71

У отдельных полиморфизмов этот показатель составлял от 1,1 % до 14,4 %. Изменение частоты встречаемости гетерозигот в среднем составило 8,91 % с изменениями от 1,2 % до 19 % у показавших максимум изменений. Частота встречаемости мутантных гомозигот составила почти 12 % и изменялась от 0,45 до 31 %.

Анализ показателей генотипирования по полиморфизмам, связанным с показателями мясной продуктивности у манычских мериносов 2022 года рождения, показал, что средняя частота встречаемости замен с диким гомозиготным генотипом составила 0,3, что не отличается от показателей генотипирования на предыдущем этапе исследования (табл. 6).

Средняя частота встречаемости гетерозиготных генотипов по заменам увеличилась с 0,316 до 0,341. Диапазон между минимальной и максимальной частотой встречаемости снизился незначительно с 0,214 до 0,207. Мутантные гомозиготы встречались практически с той же частотой, что и у животных 2021 года рождения, с небольшим снижением с 0,279 до 0,207. Средняя частота каждого из аллелей также 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.

Ранее, с использованием данных ДНК-биочипов высокой плотности нами ранее была подготовлена панель локусов, применимых при генотипировании манычских мериносов. Выбранные полиморфизмы разделили на группы: в первую отобрали замены, достоверно не ассоциированные с продуктивными признаками, но встречающиеся с примерно равной частотой гомо- и гетерозиготных генотипов, равномерно распределенные по хромосомам, а во вторую группу полиморфизмы имеющую связь с хозяйственно полезными признаками. Такие генотипы возможно использовать при определении достоверности происхождения животных, так как по их наличию у обоих родителей,

можно сделать вывод о формировании генотипа у потомка. Полиморфизмы второй группы выявили самостоятельно в ходе предыдущих исследований на основе полногеномного поиска ассоциаций с использованием тех же ДНК-биочипов.

Настоящее исследование было посвящено оценке результатов генотипирования манычских мериносов с использованием выбранной панели локусов для оценки изменения их частоты встречаемости, по сравнению с полученными нами ранее данными на ДНК-биочипах. Необходимо было установить, какие из полиморфизмов обнаруживаются у животных следующего поколения с требуемой частотой для качественного генотипирования, 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. Порог средней частоты встречаемости 0,3 в выборке животных был выбран не случайно, что соответствует рекомендациям Tortereau et al. (2017) [12].

Установили, что выявленные в 2021 году полиморфизмы для подтверждения достоверности происхождения свою информативность в 2022 году в большинстве своем не утратили, т.е. после корректировки было убрано всего лишь 24,5 % перечня локусов. Это более, чем в три раза превышает показатель, считающийся достаточным для достоверной оценки родства [13]. Несмотря на то, что такое количество полиморфизмов можно посчитать избыточным при массовом генотипировании, это оставляет некоторый запас для их исключения в следующих поколениях, если информативность перечня локусов продолжит снижаться в случае закрепления аллелей в породе.

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. Проведенный анализ позволяет сделать заключение, что после модификации набора локусов панель для генотипирования секвенированием у манычского мериноса показала высокую эффективность выявления всех вариантов генотипов.

Оценка частоты встречаемости полиморфизмов, имеющих достоверную связь с показателями мясной продуктивности, между группами животных 2021 и 2022 года рождения показала, что большинство замен почти не различаются по частоте встречаемости между поколениями. Объяснить это можно тем, что целенаправленной маркерной селекции в хозяйстве не проводилось, поэтому частота встречаемости остается в практически одинаковых пределах.

ВЫВОДЫ / CONCLUSION

Предложенная нами панель локусов, модифицированная после валидации на следующем поколении животных, содержит 389 замен, пригодные для генотипирования секвенированием и 242 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 не только официальные требования действующего законодательства РФ по определению достоверности происхождения в племенных хозяйствах, так и быть использоваться в селекционно-племенных программах, направленных на увеличение продуктивности породы манычский меринос.

THE USE OF TARGETED SEQUENCING FOR GENOTYPING SHEEP OF THE MANYCH MERINO BREED

Krivoruchko A.Yu. – Doctor of Biological Sciences, Chief Researcher (ORCID 0000-0003-4536-1814); **Kanibolotskaya**

A.A. – PhD, Senior Researcher (ORCID 0000-0003-3003-4175); **Skorykh L.N.** – Doctor of Biological Sciences, Chief Researcher (ORCID 0000-0002-6090-4453); **Safaryan E.Yu.** – Candidate of Biological Sciences, Researcher (ORCID 0000-0002-2049-842X); **Krivoruchko O. N.** – postgraduate student (ORCID 0009-0005-2051-007X).

[1] North Caucasus Federal Scientific Agrarian Center

[2] North Caucasus Federal University

*dorohin.2012@inbox.ru

Acknowledgements: *the work was supported by the Ministry of Education and Science of the Russian Federation under the State Assignment of the FGBNU "North Caucasus Federal Scientific Agrarian Center" (theme No. FNMU-2022-0009).*

ABSTRACT

The main use of genetic data is to assess the reliability of origin, since errors in pedigrees negatively affect the rate of genetic growth. Initially, the assessment of the pedigree of breeding livestock was carried out using various DNA technologies: from blood groups, then using microsatellite markers, however, now the possibility of using single nucleotide polymorphisms (SNP) in practice is being increasingly studied, due to their ability to increase the accuracy of genetic research. One of such genotyping systems is AgriSeq panels (targeted sequencing technology), which allow analyzing specific regions of the genome (loci) associated with a variety of traits in animals. The purpose of the work: 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 Manych 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 object of the study was sheep born in 2021 at the age of 12 months (DNA sampling was carried out in 2022) of the Manych merino breed. The proposed locus panel, modified after validation on the next generation of animals, contains 389 substitutions suitable for genotyping by sequencing and 242 polymorphisms associated with animal meat productivity. The indicators of the frequency of occurrence of substitutions in the group of selected animals obtained as a result of research allow us to conclude that the polymorphisms, we have selected are located in loci that are not subject to significant rearrangements for several generations and can be informative for quite a long time. The analysis allows us to conclude that after modification of the set of loci, the panel for genotyping by sequencing in the Manych merino showed high efficiency in identifying all variants of genotypes.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1.Selection and use of SNP markers for animal identification and paternity analysis in US beef cattle / M.P. Heaton [et al.] // Mammalian genome. – 2002. – Т. 13. – С. 272-281. – DOI: https://doi.org/10.1007/s00335-001-2146-3. Режим доступа: https://link.springer.com/article/10.1007/s00335-001-2146-3

2.Van de Goor, L. H. P. Population studies of 17 equine STR for forensic and phylogenetic analysis / L.H.P. Van de Goor, W.A. Van Haeringen, J.A. Lenstra //Animal genetics. – 2011. – Т. 42. – №. 6. – С. 627-633. – DOI: https://doi.org/10.1111/j.1365-2052.2011.02194.x. Режим доступа: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2052.2011.02194.x

3.de Groot, M. An evaluation of the International Society for Animal Genetics recommended parentage and identification panel for the domestic pigeon (Columba livia domestica) / M. de Groot, W.A. van Haeringen //Animal genetics. – 2017. – Т. 48. – №. 4. – С. 431-435. – DOI: https://doi.org/10.1111/age.12555. Режим доступа: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/age.12555

4.Al-Atiyat, R. M. The power of 28 microsatellite markers for parentage testing in sheep / R.M. Al-Atiyat //Electronic Journal of Biotechnology. – 2015. – Т. 18. – №. 2. –

С. 116-121. – DOI: https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2015.01.001.
5.Wu X. L. et al. Evaluation of genotyping concordance for commercial bovine SNP arrays using quality-assurance samples / X.L. Wu [et al.] //Animal genetics. – 2019. – Т. 50. – №. 4. – С. 367-371. – DOI: https://doi.org/10.1111/age.12800. Режим доступа: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0717345815000184?via%3Dihub
6.Development of a new AgriSeq 4K mid-density SNP genotyping panel and its utility in pearl millet breeding / J. Semalaiyappan [et al.] //Frontiers in plant science. – 2023. – Т. 13. – С. 1068883. – DOI: https://doi.org/10.3389/fpls.2022.1068883
7.Standardization of a SNP panel for parentage verification and identification in the domestic cat (Felis silvestris catus) / M. de Groot [et al.] //Animal genetics. – 2021. – Т. 52. – №. 5. – С. 675-682. – DOI: https://doi.org/10.1111/age.13100 . Режим доступа: https://www.frontiersin.org/journals/plant-science/articles/10.3389/fpls.2022.1068883/full
8.Modular automation solution for genotyping by sequencing for animal breeding / R.C.A. Willis [et al.] //Proc. W. Cong. Gen. App. Livest. Prod. – 2018. – Т. 11. – С. 313. Режим доступа: https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/GSD/Reference-Materials/modular-automation-solution-targeted-genotyping-by-sequencing-animal-breeding-slide-presentation.pdf
9.A genome-wide SNPs searching using the Illumina BeadChip in Jalgin Merino sheep breed / A. Krivoruchko [et al.] // Bulgarian Journal of Agricultural Science. – 2024. – Т. 30. № 1. – С. 3–10.
10.Ensembl 2022 / F. Cunningham [et.al.] // Nucleic acids research. – 2022. – Т. 50. – №. D1. – С. D988-D995. – DOI: https://doi.org/10.1093/nar/gkab1049. Режим доступа: https://academic.oup.com/nar/article/50/D1/D988/6430486
11.UniProt: the universal protein knowledgebase in 2023 / The UniProt Consortium //Nucleic acids research. – 2023. – Т. 51. – №. D1. – С. D523-D531. – DOI: https://doi.org/10.1093/nar/gkac1052. Режим доступа: https://academic.oup.com/nar/article/51/D1/D523/6835362
12.Development of a SNP panel dedicated to parentage assignment in French sheep populations / F. Tortereau [et al.] //BMC genetics. – 2017. – Т. 18. – С. 1-11. – DOI: https://doi.org/10.1186/s12863-017-0518-2. Режим доступа: https://bmcgenomdata.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12863-017-0518-2
13.SNP data quality control in a national beef and dairy cattle system and highly accurate SNP based parentage verification and identification / M.C. McClure [et al.] // Frontiers in Genetics. – 2018. – Т. 9. – С. 84. – DOI: 10.3389/fgene.2018.00084. Режим доступа: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29599798/

REFERENCES

1.Selection and use of SNP markers for animal identification and paternity analysis in US beef cattle / M.P. Heaton [et al.] // Mammalian genome. 2002:13:272-281. – DOI: https://doi.org/10.1007/s00335-001-2146-3. URL: https://link.springer.com/article/10.1007/s00335-001-2146-3
2.Van de Goor, L.H.P. Population studies of 17 equine STR for forensic and phylogenetic analysis / L.H.P. Van de Goor, W.A. Van Haeringen, J.A. Lenstra //Animal genetics. 2011:42(6):627-633. – DOI: https://doi.org/10.1111/j.1365-2052.2011.02194.x. URL: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2052.2011.02194.x
3.de Groot, M. An evaluation of the International Society for Animal Genetics recommended parentage and identification panel for the domestic pigeon (Columba livia domestica) / M. de Groot, W.A. van Haeringen //Animal genetics. 2017:48 (4):431-435. – DOI: https://doi.org/10.1111/age.12555. URL: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/age.12555
4.Al-Atiyat, R.M. The power of 28 microsatellite markers for parentage testing in sheep / R.M. Al-Atiyat //Electronic Journal of Biotechnology. 2015:18(2):116-121. – DOI: https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2015.01.001.
5.Wu, X. L. et al. Evaluation of genotyping

concordance for commercial bovine SNP arrays using quality-assurance samples / X.L. Wu [et al.] //Animal genetics. 2019:50:4:367-371. – DOI: https://doi.org/10.1111/age.12800. URL: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0717345815000184?via%3Dihub

6.Development of a new AgriSeq 4K mid-density SNP genotyping panel and its utility in pearl millet breeding / J. Semalaiyappan [et al.] //Frontiers in plant science.2023:13:1068883. – DOI: https://doi.org/10.3389/fpls.2022.1068883

7.Standardization of a SNP panel for parentage verification and identification in the domestic cat (Felis silvestris catus) / M. de Groot [et al.] //Animal genetics.2021:52 (5):675-682. – DOI: https://doi.org/10.1111/age.13100 . URL: https://www.frontiersin.org/journals/plant-science/articles/10.3389/fpls.2022.1068883/full

8.Modular automation solution for genotyping by sequencing for animal breeding / R.C.A. Willis [et al.] //Proc. W. Cong. Gen. App. Livest. Prod.:2018:11:313. URL: https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/GSD/Reference-Materials/modular-automation-solution-targeted-genotyping-by-sequencing-animal-breeding-slide-presentation.pdf

9.A genome-wide SNPs searching using the Illumina BeadChip in Jalgin Merino sheep breed / A. Krivoruchko [et al.] // Bulgarian Journal of Agricultural Scienceю 2024:30 (1):3–10.

10.Ensembl 2022 / F. Cunningham [et.al.] // Nucleic acids research. 2022:50(D1):D988-D995. – DOI: https://doi.org/10.1093/nar/gkab1049. URL: https://academic.oup.com/nar/article/50/D1/D988/6430486

11.UniProt: the universal protein knowledgebase in 2023 / The UniProt Consortium //Nucleic acids research. 2023:51 (D1):D523-D531. – DOI: https://doi.org/10.1093/nar/gkac1052. URL: https://academic.oup.com/nar/article/51/D1/D523/6835362

12.Development of a SNP panel dedicated to parentage assignment in French sheep populations / F. Tortereau [et al.] //BMC genetics.2017:18:1-11. – DOI: https://doi.org/10.1186/s12863-017-0518-2. URL: https://bmcgenomdata.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12863-017-0518-2

13.SNP data quality control in a national beef and dairy cattle system and highly accurate SNP based parentage verification and identification / M.C. McClure [et al.] // Frontiers in Genetics. 2018:9:84. – DOI: 10.3389/fgene.2018.00084. URL: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29599798/