

ДНК ТЕХНОЛОГИИ ЗА ДЕТЕКЦИЯ НА ЕДИНИЧНИ НУКЛЕОТИДНИ ПОЛИМОРФИЗМИ В ЖИВОТИНСКИЯ ГЕНОМ

ДЕЯНА ХРИСТОВА

Тракийски университет, Аграрен факултет – Стара Загора

През последното десетилетие установяването на полиморфизми на ниво ДНК посредством използването на молекулни маркери, заема все по-голяма част от проучванията в областта на генетиката на животните. Понастоящем, микросателитните ДНК маркери са най-широко използвани при характеризиране на генетичните ресурси в областта на животновъдството поради тяхната висока степен на информативност, предоставена от големия брой алели, които продуцират в даден локус. Все по-широка популярност придобива един нов тип маркери, известни като единични нуклеотидни полиморфизми – *Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs)*, въпреки че са от типа би-алелни маркери системи. В сравнение с останалите маркери те представляват един от най-прецизните подходи при генотипиране на животните поради факта, че се срещат повсеместно в генома на индивидите, освен това са генетично стабилни и податливи на високо производителен анализ. Технологиите за идентифициране на единични полиморфизми се използват за сканиране на нови *SNPs* в прицелни ДНК последователности, както и за определяне на алел(и) по отношение на известни полиморфизми в генома на животните. За откриването на нови *SNPs* се разчита най-вече на директното ДНК секвениране или на високоефективна денатурираща течна хроматография (*dHPLC*). През последните години нараства и броят на различните методи за определяне на генотипа на индивидите на базата на *SNPs* маркери и в момента са разработени редица прецизни методи в тази насока.

Настоящият обзор е един кратък преглед на наличните техники за откриване на единични полиморфизми на ниво ДНК и тяхното приложение по отношение усъвършенстване изследванията в областта на генетиката на животните със стопанско значение.

Единични нуклеотидни полиморфизми (*Single Nucleotide Polymorphisms, SNP*)

Единичните нуклеотидни полиморфизми – *Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs)*, представляват вариации в отделни нуклеотидни последователности в генома на индивидите. По същество това са замени на единични бази (А, Т, Ц и Г) в дадена позиция от секвенцията на ДНК молекулата, изразяващи се в алтернативни последователности от нуклеотиди, респ. алели (**Brookes**, 1999). При проучване на механизма на възникване на нуклеотидните замени е установено преобладаването на транзициите над трансверзиите, най-често пиримидин-пиримидин (Ц↔Т) замени, в резултат на дезаминиране на 5 метилцитозина в тимидин (**Cooper and Krawczak**, 1989; **Wang et al.**, 1998). Според някои автори природата на *SNP* полиморфизмите се свързва и с други механизми, изразяващи се в отпадане (делеции) или вмъкване на допълнителни бази (инсерции) в ДНК молекулата. Прието е тези нуклеотидни изменения да се означават общо като *indels* (**Vignal et al.**, 2002). Въпреки че теоретично всеки *SNP* сайт в даден локус може да продуцира най-много 4 алела, всеки от които съдържа съответно една от 4-те бази, на практика експресията на повечето от тези маркери се ограничава само до един от двата възможни алела, което ги поставя в графата на би-алелните маркерни системи (**Liu and Cordes**, 2004).

В сравнение с микросателитните маркери нивото на информативност на *SNP* полиморфизмите не е толкова високо, но се компенсира от тяхното широко разпространение в генома на отдел-

ните организми. В генома на човека те са представени с честота 1 на всеки 1000 базови двойки (бд) (Landegren et al., 1998; Sachinandam et al., 2001; The international SNP Map Working Group, 2001). Съответно, при говедата са идентифицирани над 2 млн. *SNP* маркери, при птиците – над 1000 (Vignal et al., 2000; Emara et al., 2003; Simianer, 2007).

Единичните нуклеотидни полиморфизми обикновено са локализиращи райони от животинския геном, поради което не оказват директно влияние върху фенотипа на индивидите. В случаите обаче, когато *SNP* полиморфизмите са локализиращи области на ДНК секвенцията, те засягат пряко функцията на гените и техните метаболити, поради което могат да бъдат директно асоциирани с определени признаци с икономическо значение (Heaton, 2000; Stoneking, 2001; White et al., 2001).

SNPs притежават редица предимства над останалите маркерни системи, а именно стабилната унаследяемост, обусловена от ниската честота на мутиране, което убедително аргументира тяхното широко приложение при анализ на генетичните ресурси в областта на животновъдството. От друга страна, някои недостатъци на тези маркери могат да бъдат компенсирани чрез прилагането на съвременни технологии като ДНК чип (*DNA microarray*) технология, свързана с използването на голям брой *SNP* маркери (Lipshutz, 1999; Werner et al., 2002, 2004).

ДНК Технологии за детекция на *SNP* полиморфизми

Обстояен обзор на технологиите за откриване на *SNPs*, както и за генотипиране на базата на този тип маркерни системи, е представен от Kwok and Chen (2003). Описаните методики обхващат две основни направления: скрининг на нови, неизвестни единични полиморфизми и детерминиране на алел(и) от установен полиморфен сайт в прицелни ДНК секвенции, т.е. генотипиране на индивиди по определени *SNP* маркери.

Детекция на нови *SNP* маркери

Понастоящем са описани са редица методи за откриване на нови *SNPs* в генома на даден животински вид (<http://cgil.uoguelph.ca/QTL/SNPs.htm>), от които с най-голяма приложимост са следните:

- Денатурираща градиентна електрофореза (*Denaturing Gradient Gel Electrophoresis, DGGE*)
- Конформационен полиморфизъм на едноверижна ДНК (*Single Strand Conformation Polymorphism, SSCP*)
- Анализ на полиморфизмите по дължина на разрязаните фрагменти (*Cleavage Fragment Length Polymorphism Analysis, CFLPA*)
- Хетеродуплексен анализ (*Heteroduplex Analysis, HA*)
- Денатурираща високоефективна течна хроматография (*Denaturing High Performans Liquid Chromatography, DHPLC*)
- Директно секвениране (*Direct Sequencing*)

Методът Денатурираща градиентна електрофореза, описан за първи път от Fischer and Lerman през 1979, се основава на факта, че двойноверижните ДНК молекули с еднакво молекулно тегло, но съдържащи различия в техните секвенции, дори по отношение само на един нуклеотид, показват различна електрофоретична подвижност в условията на денатуриращ градиентен гел (Fisher and Lerman, 1983; Cariello et al., 1991). Чрез *DGGE* теоретично могат да бъдат открити всички вариации в ДНК фрагменти с дължина от 50 до 1000 бд. В случаите на прикачане на секвенции, съдържащи нуклеотидната двойка Г-Ц към един от праймерите за PCR амплификация, чувствителността на този метод за откриване на точкови мутации (базови или нуклеотидни замени) може да достигне до 100% (Myers et al., 1985). Алтернатива на този метод, отличаваща се с много по-висока възпроизводителност е гел-електрофореза, при която се прилага температурен градиент вместо химичен (*Temperature Gradient Gel Electrophoresis TGGE*) (Henco et al., 1994). В областта на животновъдството *DGGE* се използва предимно в прецизната

диагностика и контрола на някои заболявания. На базата на описаната *SNP* технология, **Belt et al.** (1995) са идентифицирали 5 алелни варианта на PrP гена, кодиращ прион протеина, асоцииран с невро-дегенеративното заболяване скрейпи при овце. По метода на денатурираща градиентна електрофореза **Ioannides et al.** (2009) генотипират овце от породата Хиос по същия ген. Обширно изследване на гена PrP по метода на *DGGE* е проведено и от **Tkáčiková L., Hreško S.** (2008) при редица преживни животни.

Методът Конформационен полиморфизъм на едноверижна ДНК (*Single Strand Conformation Polymorphism, SSCP*) се основава на различната подвижност на едноверижните фрагменти в полиакриламиден гел в зависимост от спецификата в тяхната нуклеотидната последователност (**Hayashi, 1992; Nataraj et al., 1999**) Използват се *PCR* продукти на екзонни последователности на гени от различни генотипове на даден вид с размер 100 – 400 бд. След денатурирането им се изследва тяхната подвижност в полиакриламиден гел, като позицията на всеки от продуктите се визуализира посредством сребърно оцветяване. Промяната в позицията на определен фрагмент е индикация за промяна в нуклеотидната последователност на изследвания ген (**Hecker et al., 1999**). При оптимални условия (фрагменти с размери до 200 бд) могат да бъдат идентифицирани около 80-90% от потенциалните базови замени (**Sheffield et al., 1993**). *SSCP* успешно е използван като метод за проучване на генетичното разнообразие по отношение на гени, кодиращи млечни протеини и растежни хормони при португалски аборигенни породи овце с цел създаване на развъдна програма на базата на маркерна селекция (**Bastos et al., 2001**). Приложението на метода конформационен полиморфизъм на едноверижна ДНК при гръбначни и безгръбначни животни в контекста на еволюционната биология и молекулярната екология е подробно разгледано в изследването на **Sunnuks et al.** (2000).

Разновидност на *SSCP* метода е анализът на полиморфизмите по дължината на разрязаните фрагменти (*Cleavage Fragment Length Polymorphism Analysis, CFLPA*). В този случай се използва специфичен ендонуклеазен ензим (*Cleavage I*), който разпознава и срязва определени едноверижни и двойноверижни области от ДНК, в резултат на което се продуцират множествени фрагменти, с възможност за електрофоретично разделяне (**Rossetti et al., 1997**). Основно предимство на този анализ, в сравнение с *SSCP* метода, е възможността за изследване на по-дълги (до 2 kb) ДНК фрагменти (**Sokurenko et al., 2001**).

Хетеродуплексният анализ (*Heteroduplex Analysis, HA*) е популярна техника за скрининг на единични базови замени в ДНК секвенцията на животните (**Sorrentino et al., 1992**). Същността на този метод се изразява в това, че изследваните ДНК фрагменти с размери от 50 до 400 бд се амплифицират, като по време на *PCR* реакцията се създават условия за хибридизация, не само между комплементарните едноверижни ДНК фрагменти (хомодуплекси), но и между ненапълно комплементарни ДНК вериги (хетеродуплекси между нормална и мутантна ДНК верига). Разделянето на ДНК фрагментите става посредством електрофореза в неденатуриращ полиакриламиден гел, на базата на разликите в тяхната подвижност. Описаната от **Palais et al.** (2005) методика за количествен *HA* анализ посредством високоразделителен подход (*high-resolution melting*) се отличава с възможността за директно идентифициране на продуктите в разтвор, непосредствено след тяхната *PCR* амплификация. В този случай визуализирането се извършва чрез използването на белязани праймери или насищане на ДНК с багрила, които позволяват да се отчете промяната във формата на флуоресцентната крива.

Една от разновидностите на Хетеродуплексния анализ е Денатуриращата високоефективна течна хроматография (*Denaturing High Performans Liquid Chromatography, DHPLC*), при която се използва гел за фрагментен анализ на *PCR* продуктите (**Spiegelman et al., 2000**). Основното приложение на този метод се свързва с откриване на мутации в животинския геном (**Huber et al., 2001**). В генома на овце от няколко китайски аборигенни породи по метода на *DHPLC* **Li et**

al. (2008) откриват мутация в позиция 317 (*T317C*) на гена, кодиращ рецептора на меланоцит-стимулиращия хормон (*MSHR*).

От изброените методи за откриване на нови SNP маркери, най-използван и точен, макар скъпо струващ и продължителен, е методът за директно секвениране (*Direct Sequencing*). Откриването на SNP полиморфизми в този случай се основава на секвениране на определени области от генома на даден индивид и тяхното сравняване с нуклеотидните последователности на същите области, при други представители от същия вид. Секвенирането може да бъде извършено основно чрез два метода – ензимен (секвениране по **Sanger**) и химичен (**Maxam-Gilberd**) (**Sanger and Coulson, 1975; Maxam and Gilbert, 1977**). Първият метод е свързан с разцепване на ДНК молекулата в района на една от базите, като за детекция е необходимо радиоактивно белязване на единия край на фрагмента и неговото предварително пречистване. При втория метод необходимата ДНК се синтезира *in vitro*, като се използва свойството на дидезоксинуклеотидтрифосфатите (*ddNTP*) да прекъсват синтеза на ДНК на мястото на включването им, като по този начин се маркира позицията на определена нуклеотидна база. Основният недостатък на описаните методи е необходимостта от неколккратно секвениране на анализирани проби, за да бъдат избегнати грешки (неправилно поставяне на нуклеотиди от ензима *Taq* полимераза по време на *PCR* амплификацията, грешки в процеса на секвениране и др.), което значително оскъпява процедурата.

Друг алтернативен метод за откриване на единични нуклеотидни полиморфизми чрез автоматично флуоресцентно секвениране е т.нар. „*Orphan peak analysis*” (**Hattori et al., 1993**). Характерно за този подход на секвениране е, че всяка нуклеотидна замяна се идентифицира като отделен специфичен пик, маркиран в съответен цвят. Предимство на метода е възможността за детекция на полиморфизми при по-голям брой анализирани проби от няколко индивида (над 50), което значително оптимизира процеса на секвениране. Като цяло, основният недостатък на методите за секвениране е изискването за високо качество на амплифицираните ДНК проби.

В сравнение с традиционните *Sanger*-базирани методи за секвениране, ДНК секвенирането чрез синтез (*sequencing-by-synthesis – SBS technology*) се очертава да бъде следващо поколение ДНК секвениране (*next generation sequencing*) поради неговата по-висока ефективност, което обуславя значителното му представяне в генетичните изследвания на животинския геном (**Fuller et al., 2009**). Обичайните *SBS* платформи са базирани на използването на ензима ДНК полимераза или лигаза за паралелно синтезиране на ДНК фрагменти чрез белязани нуклеотиди или чрез детекция на продуктите на синтеза (пирофосфати). При това могат да бъдат прилагани две основни стратегии – секвениране само на една (*single molecule-based*) или на множество идентични копия на една ДНК молекула (*ensemble based*). Основни предимства на *next generation sequencing* технологиите (като 454/Roche, Illumina, SOLiD), в сравнение с класическия метод на *Sanger*, е елиминиране на трудоемката процедурата по *in vivo* клонирането и заместването □ с *PCR* амплификация, както и замяна на радиоактивните *ddNTPs* с флуоресцентно белязани такива (**Morozova et al., 2009**). Новите методи за секвениране са доста по-ефективни при идентифициране и проследяването на генетични вариации в рамките на големи популации (**Todorovska et al., 2010**).

През последните години голямо внимание се отделя на създаването на *web* база данни за *Expressed sequence tags (EST)* при различни животински видове. Основна функция на тези източници, базирани на специфични за организмите колекции е предоставяне на обширен преглед на секвенциите за експресиращи се гени в различни тъкани или организми, на различен етап на развитие. Понастоящем *EST* базата данни съдържа повече от 43 млн. секвенции на експресиращи се гени, за над 1300 различни организми (**Hutchison, 2007**). *GoSh база данни* (<http://www.itb.cnr.it/>) съдържа 58 990 *EST* за кози и овце, което разкрива възможностите за установяване на директна връзка на наличните секвенции, респ. алели, с определен мутантен фенотип (**Caprera**

et al., 2007).

Генотипиране чрез SNP маркери

Обширен преглед на традиционните методи за генотипиране чрез *SNP* маркери е направен от **Syvänen** (2001). За разлика от микросателитните маркери, за които се прилага само една стандартна процедура при генотипиране (включваща *PCR* амплификация на определени фрагменти с последващото им разделяне чрез акриамидна електрофореза на базата на техните дължини), то генотипирането на базата на *SNPs* позволява да се прилагат различни техники. По-важните от тях включват:

- *CAPS* техника (*Cleaved Amplified Polymorphic sequence, PCR-RFLP*)
- Алел-специфична олигонуклеотидна хибридизация (*Allele Specific Oligonucleotide, ASO*)
- Пиросеквениране (*Pyrosequencing*)
- Масс спектрофотометрия (*Matrix Assisted Laser Desorption Ionization time of Flight, MALDI-TOF*)
- Количествен *PCR* (*Real-Time u TaqMan PCR*)
- ДНК чип технология (*DNA Microarray*)

С откриването на полимеразната верижна реакция (*Polymerase Chain Reaction*) от д-р Кари Мъллис, известна в литературата още като *PCR* (**Mullis et al.**, 1986), конвенционалният анализ за установяване на полиморфизми по дължината на рестрикционните фрагменти в животинския геном (*Restriction Fragment Length Polymorphism, RFLP*) е изместен от *PCR-RFLP* технологията – *Cleaved Amplified Polymorphic Sequence (CAPS)*. *CAPS* се основава на детекция на полиморфизмите въз основа на размера на рестрикционните фрагменти, след проведена *PCR* амплификация на даден локус. Основните предимства на *CAPS* техниката са необходимост от минимално количество геномна ДНК, както и кратката и нетолкова трудоемка методология, без участието на радиоактивни или флуоресцентни сонди.

CAPS техниката може да бъде използвана за генотипиране на индивиди в случаите, когато единичните нуклеотидни полиморфизми са локализирани в даден рестрикционен сайт, при което след разрязване от съответния ензим ще се генерират специфични фрагменти, чието фракциониране се осъществява най-често електрофоретично (**Vignal et al.**, 2000). На базата на *PCR-RFLP* анализ е характеризирано генетичното разнообразие и са установени генетичните дистанции при различни местни породи овце от Китай (**Xianglong et al.**, 2007), Египет (**Abdel-rahman et al.**, 2010), Индонезия (**Prayitno et al.**, 2011). В България този метод също е намерил приложение по отношение генома на автохтонни породи на вида *Ovis aries* в изследванията на **Hristova** (2011) и **Hristova et al.** (2012), касаещи алфа S1-казеиновия ген (*αS1CN*) и мелатонин-рецепторния ген (*MTNR1A*). Друго българско изследване е това на **Georgieva et al.** (2015), свързано с генотипиране на овце от Синтетична популация българска млечна, по отношение на гените, кодиращи калпастатин (*CAST*) и миостатин (*MSTN*). Освен в овцевъдството описаната технология е намерила приложение също и в изследвания в областта на свиневъдството и говедовъдството в България. По метода *PCR-RFLP* **Stoyanova** (2009) и **Стоянова и съавт.** (2010) са извършили проучване на 3 гена – рианодин рецепторен (ryanodine receptor ген, *RYS*), естроген рецепторен (*ESR*) и фукозилтрансферазен (fucosyltransferase, *FUT1*), при свине от породата Дунавска бяла. В обширно проучване на **Hristov et al.** (2013) са докладвани *SNP* полиморфизми в локусите на гените *αS1-casein*, *kappa-casein* и *lactoglobulin* в популацията на Българското Родопско говедо.

Хибридизацията с алел-специфични олигонуклеотиди (*Allele Specific Oligonucleotide, ASO*) е метод, чрез който може да се установи наличие или липса на специфична мутация (нуклеотидна замяна) в рамките на даден ген, чрез използването на алел специфични олигонуклеотиди (хибридизационни сонди) с дължина 15-19бд (**Napolitano et al.**, 2004). При това маркираната

ДНК сонда с известна последователност (нормална или мутантна) хибридизира само с комплементарната □ последователност от изследвания участък на гена. *ASO* подходът се използва за доказване само на известни вече мутации в определен ген, т.е. позната е както точната им локализация, така и тяхната молекулярна характеристика, определена чрез секвениране. Този метод е особено подходящ за търсене на най-честите мутации за дадена популация животни, в големи серии от проби.

Пиросеквенирането (*Pyrosequencing*) е относително нова и бърза техника за ДНК ре-секвениране, която се базира на формиране на пирофосфати (*PPi*), като продукт на синтезата на ДНК веригата (**Nordstom et al., 2000**). В реакционната смес всеки компонент (*dNTP*) се добавя поотделно, като свързването му към растящата верига е съпроводено с отделяне на молекула пирофосфат, която се трансформира в луминесцентен сигнал, под действие на ензим сулфурилаза. В случай, че *dNTP* не се свърже към растящата верига, той веднага се разгражда и след това се добавя следващият. Редът на тяхното присъединяване се определя в процеса на синтеза на веригата, което означава, че секвенцията “се чете” едновременно със синтеза (**Ronaghi et al., 2006**). Основно предимство на описаната процедура над останалите техники за секвениране е възможността за автоматизиране, позволяващо да се следи кой точно нуклеотид се добавя към растящата верига. В допълнение, процесът на пиросеквениране не изисква електрофореза или каквото и да било друго разделяне на фрагменти, а ДНК матрицата се копира пряко без използване на *ddNTP*. Ограниченията на метода са: нецелесъобразното му приложение при *de novo* секвениране, тъй като се изисква предварителна информация за участъка, който ще се секвенира, както и малката дължина на фрагментите (около 50 бд) за детекция. На базата на анализ на къси нуклеотидни секвенции от митохондриалния 12S rRNA ген, **Balitzki-Korte et al. (2005)** успешно прилагат метода на пиросеквениране при идентификация на индивиди от 11 различни видове животни, преставители на 3 класа – 7 вида бозайници (включително овце, крави, коне, свине, зайци), 3 вида птици и 1 вид риби. При съпоставяне на получените секвенции с наличните от *NCBI* базата данни, авторите установяват висока степен на полиморфизъм, както и множество консервативни участъци в този ген, които могат да бъдат използвани като праймер-свързващи сайтове.

Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time of Flight е една от първите техники за цялостно сканиране на генома за единични нуклеотидни полиморфизми при хора и животни (**Ragoussis et al., 2006**). Представлява количествен, базиран на *PCR* метод за *SNP* генотипиране, който се състои в прецизно измерване масата на йонизираните чрез лазер ДНК или РНК молекули (фрагменти с дължина 3-29 бд), чрез определяне на времето за тяхната йонизация („*time of flight*”, *TOF*) (**Ross et al., 1998**). Методът може да бъде оптимизиран чрез комбинация с мултиплексна *PCR* амплификация, при което не се изисква използване на белязани праймери. Неслучайно *MALDI-TOF* спектрофотометрията е определена „като златен стандарт” в *SNP* генотипирането поради своите предимствата – висока разделителна способност и аналитична точност, опростен дизайн и бързина на анализа, грешки, сведени до минимум (**Storm et al., 2003**). *MALDI-TOF* методът намира приложение основно в клиничната практика, за молекулярна диагностика на генетични маркери, свързани с редица заболявания при хора и животни, включително чувствителност към лекарствени средства. Той е еднакво подходящ както за идентификация на животински патогени, откриване на ново- възникнали мутирани щамове микроорганизми, така и за установяване на генетична идентичност и картиране на локуси, свързани с количествени признаци (т.нар. *QTL*) при селскостопанските породи животни **Tost and Gut (2005)**.

Количественият *PCR*, известен още като *Real-Time (RT-PCR)*, количествен *PCR (qPCR)* или кинетичен *PCR (kPCR)* е въведен от **Higuchi et al., 1993** като иновативна техника за *SNP* генотипиране посредством едновременно количествено определяне и амплификация на дадена ДНК

молекула. *RT-PCR* принципно не се отличава от класическата *PCR* технология, но има преимуществото да отчита количествено амплифицирания *PCR* продукт по време на реакцията след всеки цикъл, в реално време. В допълнение, този метод не изисква прилагане на последващи *PCR* процедури (електрофоретично разделяне на ДНК фрагментите), а резултатите лесно могат да бъдат интерпретирани. Понастоящем, от гледна точка на химическите принципи на *qPCR* методологията, се прилагат четири основни подхода: *TaqMan*, *Molecular Beacons*, *Scorpions* и *SYBR Green*. Подробно описание и приложение на посочените процедури е направено от **Ma et al.**, (2006). Като цяло, всички тези техники се основават на детекция на *PCR* продукти чрез генериране на различни флуоресцентни сигнали. Използването на *SYBR Green* метода се базира на възможността за свързване на това багрило само с двойноверижната ДНК, при което се отделя флуоресцентен сигнал. Отчитайки интензивността на флуоресценцията, може да се добие представа за количеството на синтезираната ДНК. Това е един сравнително опростен в процедурно отношение и евтин, но неточен метод, поради възможността за получаване на неспецифични *PCR* продукти. При *TaqMan*, *Molecular Beacons* и *Scorpions* резултатите зависят от *Förster* резонансен трансфер на енергия (*FRET*) за генериране на флуоресцентния сигнал, който се получава при свързването на специфични, едноверижни ДНК секвенции с олигонуклеотидни сонди съдържащи съответното флуоресцентно багрило. По време на амплификацията, когато ензимът полимераза синтезира матричната ДНК, свързана със специфичната сонда, тя бива разрушавана от ензима, в резултат на което се отделя флуоресцентен сигнал. Флуоресценцията нараства при всеки цикъл, пропорционално на количеството разцепени сонди, от което се съди за количеството на синтезирания *PCR* продукт. Наред с обширните области на приложение на *qRT-PCR*, като неинвазивната пренатална и преимплантационна клинична диагностика, епидемиология, гена експресия в клетки или тъкани, лекарствен дизайн и терапия, детекция на нарушения („повреди“) в структурата на ДНК, този метод успешно се прилага и за *SNP* генотипиране на животни по определени локуси. По метода *RT-PCR*, **Capoferri et al.** (2006) са определили честотите на алелите и съответните генотипове при редица италиански породи говеда, на базата на 32 високо информативни единични нуклеотидни полиморфизми, локализиращи в различни хромозоми.

Ефективна и нова процедура за генотипиране на базата на *SNPs* е т. нар. ДНК чип технологията (*DNA Microarray*), при която могат да бъдат скринирани едновременно над 40 000 секвенции в даден геном (**Lipshutz et al.**, 1999). Тази техника, първоначално известна като *GeneChip*, е въведена и описана през 1993 г. от Stephen Fodor (www.dnalc.org/view/15919-GeneChip-.html). В обширен мащаб *DNA Microarray* техниката е приложена от **Wang et al.** (1998) за *SNP* генотипиране на човешкия геном посредством чип технологията *GeneChip HuSNP Mapping Array*, на основата на 1494 единични полиморфизми. Основните предимства на приложената техника са възможност за *PCR* амплификация в мултиплекс, при използването на минимални количества геномна ДНК (около 120 ng), както и пълната автоматизация на процедурата.

Понастоящем широко приложение намират комерсиалните *SNP* чипове на фирма *Illumina* за генотипиране и асоциативно картиране при овце и говеда, които включват около 50 000 *SNP* маркери. Тази платформа е приложена за генотипиране на животни от 21 породи говеда посредством *BovineSNP50* чип (**Matukumalli et al.**, 2009). Чрез същата платформа на *Illumina* **Boichard et al.** (2012) генотипират животни от популации говеда, специализирани в млечното и месно направление, посредством *BovineLD BeadChip*, обединяващ около 7000 *SNPs* маркери. Чрез *ovine SNP50 Beadchip*, включващ около 50 000 *SNP* маркери, **Kijas et al.** (2012) генотипират около 3000 овце от 74 породи, специализирани в различни направления. Получените в това изследване резултати разкриват *SNP* полиморфизъм в над 90% от изследваните локуси, което е индикация за високо ниво на генетично разнообразие при тези породи овце. ДНК чип технологията за генотипиране

е използвана също и при вида *Capra hircus* (Dong et al., 2013; Tosser-Klopp et al., 2014).

Всички описани техники за SNP генотипиране се открояват със своите предимства и въпреки някои техни ограничения, успешно се прилагат за характеризиране на генетичните ресурси в областта на животновъдството, като от съществено изискване е предварителната информация за секвенцията на съответните полиморфни сайтове.

ЛИТЕРАТУРА

1. **Стоянова, С., В. Дрбохлав, С. Методиев, Димитров С.,** 2010. Генотипи по ESR и FUT1 локуси и показатели на семенната течност на нерези от породата Дунавска Бяла. Животновъдни науки, 4, 52-57.
2. **Abdel-Rahman S. M., El-Nahas A. F., Hameda S. A., El-Fiky S. A., Nasr S. M.,** 2010. Genetic Variability among Four Egyptian Sheep Breeds Using Random Amplified Polymorphic Dna (RAPD) and PCR-RFLP Techniques Journal of Applied Sciences Research, 6, 1, 1-5.
3. **Balitzki-Korte, B., Anslinger K., Bartsch C., Rolf B.,** 2005. Species identification by means of pyrosequencing the mitochondrial 12s rRNA gene. Int J Legal Med., 119, 291-294.
4. **Bastos, E., Cravador A., Azevedo J., Guedes-Pinto H.,** 2001. Single strand conformation polymorphism (SSCP) detection in six genes in Portuguese indigenous sheep breed "Churra da Terra Quente" Biotechnol. Agron. Soc. Environ., 5, 1, 7-15.
5. **Belt, P. B., Muileman I. H., Schreuder B. E., Bos-de Ruijter J., Gielkens A. L., Smits M. A.,** 1995. Identification of five allelic variants of the sheep PrP gene and their association with natural scrapie. J. Gen. Virol., 76, 3, 509-517.
6. **Boichard, D., Chung H., Dasonneville R., David X., Eggen A., Sébastien F., Kimberly J. G., Hayes B. J., Lawley C. T., Sonstegard T. S., Van Tassell C. P., VanRaden P. M., Viaud-Martinez K. A., Wiggans G. R., for the Bovine LD Consortium,** 2012. Design of a Bovine LD SNP Array Optimized for Imputation. PLoS ONE, 7, 3, e34130, doi:10.1371.
7. **Brookes, A. J.,** 1999. The essence of SNPs. Gene, 234, 177-186.
8. **Capoferri, R., Bongioni G., Galli A. and Aleandri R.,** 2006. Genetic control of conventional labeling through the bovine meat production chain by single nucleotide polymorphisms using real-time PCR. Journal of Food Protection, 69, 8, 1971-1977.
9. **Caprera, A., Lazzari B., Stella A., Merelli I., Caetano A. R. and Mariani P.,** 2007. GoSh: a web-based database for goat and sheep EST sequences, 23, 8, 1043-1045.
10. **Cariello, N. F., Swenberg, J. A., De Bellis, A. and Skopek, T. R.,** 1991. Analysis of mutations using PCR and denaturing gradient gel electrophoresis. Environ. Mol. Mutagen., 18, 249-254, doi: 10.1002/em.2850180408.
11. **Cooper, D. N., Krawczak M.,** 1989. Cytosine methylation and the fate of CpG dinucleotides in vertebrate genomes. Human Genetics, 83, 181-188.
12. **Dong, Y., Xie M., Jiang Y., Xiao N., Du X., Zhang W., Tosser-Klopp G., Wang J., Yang S., Liang J., Chen W., Chen J., Zeng P., Hou Y., Bian C., Pan S., Li Y., Liu X., Wang W., Servin B., Sayre B., Zhu B., Sweeney D., Moore R., Nie W., Shen Y., Zhao R., Zhang G., Li J., Faraut T., Womack J., Zhang Y., Kijas J., Cockett N., Xu X., Zhao S., Wang J., Wang W.,** 2013. A reference genome of the domestic goat (*Capra hircus*) generated by Illumina sequencing and whole genome mapping. Nature Biotechnology, 31, 135-141.
13. **Emara, M. G. and Kim H.,** 2003. Genetic Markers and their Application in Poultry Breeding. Poultry Science, 82, 952-957.

14. **Fischer, S. G. and Lerman, L. S.**, 1983. DNA fragments differing by single base-pair substitutions are separated in denaturing gradient gels: correspondence with melting theory. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80, 1579-1583.

15. **Fuller, C. W., Middendorf L. R., Benner S. A., Church G. M., Harris T., Huang X., Jovanovich S. B., Nelson J. R., Schloss J. A., Schwartz D. C. and D. V. Vezenov**, 2009. The challenges of sequencing by synthesis. *Nature biotechnology*, 27, 1013-1023.

16. **Georgieva S. J., Hristova D. G., Dimitrova I. V., Stancheva N. G., Bozhilova-Sakova M. G.**, 2015. Molecular analysis of ovine calpastatin (CAST) and myostatin (MSTN) genes in Synthetic Population Bulgarian Milk sheep using PCR-RFLP. *J. BioSci. Biotechnol.*, 4, 1, 95-99.

17. **Hattori, M., Shibata A., Yoshioka K., Sakaki Y.**, 1993. Orphan peak analysis: a novel method for detection of point mutations using an automated fluorescence DNA sequencer. *Genomics*, 15, 2, 415-417.

18. **Hayashi, K.**, 1992. PCR-SSCP: a method for detection of mutations. *Genet. Anal. Tech. Appl.*, 9, 73-79.

19. **Heaton, M. P.** 2000. SNP frequency and haplotype diversity in beef cattle cytokine genes. *Plant and Animal Genome. VIII Conf.*, January 9-12, San Diego, CA.

20. **Hecker, K. H., Taylor, P. D., Gjerde, D. T.**, 1999. Mutation detection by denaturing DNA chromatography using fluorescently labeled polymerase chain reaction products. *Anal. Biochem.*, 272, 156-164.

21. **Henco, K., Harders, J., Wiese, U., and Riesner, D.**, 1994. Temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) for the detection of polymorphic DNA and RNA. *Methods Mol. Biol.*, 31, 211-228.

22. **Higuchi R, Fockler C, Dollinger G, Watson R.**, 1993. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology (N Y)*. Sep;11(9):1026-30.

23. **Hristov, P., Teofanova D., Mehandzhiyski I., Zagorchev L., Radoslavov G.**, 2013. Significance of Milk protein genes polymorphism for Bulgarian Rhodopean cattle: comparative studies. *Biotechnol. and Biotechnol. Eq.*, 27, 2, 3659-3664.

24. **Hristova, D.**, 2011. Genetic polymorphism of alpha S1- casein gene in Bulgarian sheep breeds. *Agricultural Science and Technology*, 3, 1, 8-12.

25. **Hristova, D., Georgieva S., Yablanski Ts., Tanchev S., Slavov R. and Bonev G.**, 2012. Genetic polymorphism of the melatonin receptor MT1 gene in four Bulgarian sheep breeds. *Agricultural Science and Technology*, 4, 3, 187-192.

26. **Huber, C. G., Premstaller A., Xiao W., Oberacher H., Bonn G. K., and Oefner P. J.**, 2001. Mutation detection by capillary denaturing high-performance liquid chromatography using monolithic columns. *J. Biochem. Biophys. Methods.*, 47, 5-19.

27. **Hutchison, M. L. and Gibler D. M.**, 2007. Political Tolerance and Territorial Threat: A Cross-National Study. *Journal of Politics*, 69, 128-142.

28. **Ioannides, I. M., Mavrogenis A. P. and Papachristoforou C.**, 2009. Analysis of PrP genotypes in relation to reproductive and production traits in Chios sheep. *Livestock Science* 122, 296-301.

29. **Kijas, J. W., Lenstra J. A., Hayes B., Boitard S., Porto Neto L. R.**, 2012. Genome-Wide Analysis of the World's Sheep Breeds Reveals High Levels of Historic Mixture and Strong Recent Selection. *PLoS Biology*, 10, 2, e1001258.

30. **Kwok, P. Y. and X. Chen**, 2003. Detection of Single Nucleotide Polymorphisms. *Current Issues in Molecular Biology*, 5, 43-60.

31. **Landegren, U., Nilsson M. and P. Y. Kwok**, 1998. Reading bits of genetic information: Methods for single nucleotide polymorphism analysis. *Genome Research*, 8, 769-776.

32. **Li Q., Li Li-Yan, Sheng-Wen H., Li L., Xiao-Wei C., Wan-Jun Z., Xiang-Min X.**, 2008. Rapid genotyping of known mutations and polymorphisms in β -globin gene based on the DHPLC profile patterns of homoduplexes and heteroduplexes. *Clinical Biochemistry*, 41, 9, 681-687.

33. **Lipshutz, R. J., Fodor, S. P. A., Gingeras, T. R. and Lockhart D. J.,** 1999. High density synthetic oligonucleotide arrays. *Nature Genetics*, 21 (supp. 1), 20-24.
34. **Liu, Z. J. and J. F. Cordes,** 2004. DNA marker technologies and their applications in aquaculture genetics. *Aquaculture*, 238, 1-37.
35. **Ma, H., Shieh K. J., Chen L., Qiao T., Chuang M. Y.,** 2006. Application of real-time polymerase chain reaction (RT-PCR). *J. Am. Sci.*, 2, 3, 1-5.
36. **Matukumalli, L. K., Lawley C. T., Schnabel R. D., Taylor J. F., Allan M. F., Heaton M. P., O'Connell J., Moore S. S., Smith T. P., Sonstegard T. S., Van Tassell C. P.,** 2009. Development and characterization of a high density SNP genotyping assay for cattle. *PLoS One* 4, e5350.
37. **Maxam, A. M., Gilbert W.,** 1977. A new method for sequencing DNA. *National Academy of Sciences of the United States of America*, 74, 2, 560-564.
38. **Morozova, O., Hirst M., Marra M. A.,** 2009. Applications of new sequencing technologies for transcriptome analysis. *Annu. Rev. Genomics. Hum. Genet.*, 10, 135-151.
39. **Mullis, K., Facoma F., Scharf S., Snikl R., Horn G., Erlich H.,** 1986. Specific amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symposium Quantitative Biology*, 51, 260.
40. **Myers, R. M., Fischer S. G., Lerman L. S. and Maniatis T.,** 1985. Nearly all single base substitutions in DNA fragments joined to a GC-clamp can be detected by denaturing gradient gel electrophoresis. *Nucleic. Acids. Res.*, 13, 3131-3145.
41. **Napolitano, N. M., Rohlf E. M. and Heim R. A.,** 2004. Simultaneous Detection of Multiple Point Mutations Using Allele-Specific Oligonucleotides. *Current Protocols in Human Genetics*, 9.4.1–9.4.10, doi: 10.1002/0471142905.hg0904s41.
42. **Nataraj, A. J., Olivos-Glander I., Kusukawa N., Highsmith W. E.,** 1999. Single-strand conformation polymorphism and heteroduplex analysis for gel-based mutation detection. *Electrophoresis*, 20, 1177-1185.
43. **Nordstrom, T., Nourizad K., Ronaghi M., and Nyren, P.,** 2000. Method enabling pyrosequencing on doublestranded DNA. *Anal. Biochem.*, 282, 186-193.
44. **Palais, R. A., Liew M. A., Wittwer C. T.,** 2005. Quantitative heteroduplex analysis for single nucleotide polymorphism genotyping. *Analytical Biochemistry*, 1-9.
45. **Prayitno, T. H., Pratiwi R., and W. T. Artama.,** 2011. RFLP Marker Variation of Cytocrome b Gene and Genetic Relationship among Batur, Merino and Local Sheep Breeds. *Animal Production*, 13, 3, 156-165.
46. **Ragoussis, J., Elvidge G. P., Kaur K., Colella S.,** 2006. Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation, Time-of-Flight Mass Spectrometry in Genomics Research. Fisher EMC, ed. *PLoS Genetics*, 2, 7, e100. doi:10.1371/journal.pgen.0020100.
47. **Ronaghi, M., Shokralla S., and Gharizadeh B.,** 2006. Pyrosequencing for discovery and analysis of DNA sequence variations. *Pharmacogenomics*, 8, 10, 1437-1441.
48. **Ross, P., Hall L., Smirnov I., Haff L.,** 1998. High level multiplex genotyping by MALDI-TOF mass spectrometry. *Nat. Biotechnol. Dec.*, 16, 13, 1347-1351.
49. **Rossetti, S., Englisch S., Bresin E., Pignatti P.F., and Turco A. E.,** 1997. Detection of mutations in human genes by a new rapid method: cleavage fragment length polymorphism analysis (CFLPA). *Mol. Cell. Probes.*, 11, 155-160.
50. **Sachidanandam, R., Weissman D., Schmidt S. C., Kakol J. M., Stein L. D., Marth G., Sherry S., Mullikin J. C., Mortimore B. J., Willey D. L., Hunt S. E., Cole C. G., Coggill P. C., Rice C. M., Ning Z., Rogers J., Bentley D. R., Kwok P. Y., Mardis E. R., Yeh R. T., Schultz B., Cook L., Davenport R., Dante M., Fulton L., Hillier L., Waterston R. H., McPherson J. D., Gilman B., Schaffner S., Van Etten W. J., Reich D., Higgins J., Daly M. J., Blumenstiel B., Baldwin J.,**

Stange-Thomann N., Zody M. C., Linton L., Lander E. S. and Altshuler D., International SNP Map Working Group, 2001. A map of human genome sequence variation containing 1.42 million single nucleotide polymorphisms. *Nature*, 409, 928-933.

51. Sanger, F. and Coulson A. R., 1975. A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *J Mol Biol.*, 25, 94, 3, 441-448.

52. Sheffield, V., Beck J., Kwitek A., Sandstrom D. and Stone E., 1993. The sensitivity of single-strand conformation polymorphism analysis for the detection of single base substitutions. *Genomics*, 16, 325-332.

53. Simianer, H., 2007. Report of the ISAG/FAO advisory group on animal genetic diversity, 1-6.

54. Sokurenko, E. V., Tchesnokova V., Yeung A. T., Oleykowski C. A., Trintchina E., Hughes K. T., Rebecca A., Rashid J. Brint M., Steve L., Moseley L. S., 2001. Detection of simple mutations and polymorphisms in large genomic regions. *Nucleic. Acids. Research.*, 29, 22, e111.

55. Sorrentino, R., Potolicchio I., Ferrara G. B., Tosi R., 1992. A new approach to HLA-DPB1 typing combining DNA heteroduplex analysis with allele-specific amplification and enzyme restriction. *Immunogenetics*, 36, 248-254.

56. Spiegelman, J. I., Mindrinos, M. N., and Oefner P. J., 2000. High-accuracy DNA sequence variation screening by DHPLC. *Biotechniques*, 29, 1084-1092.

57. Stoneking, M., 2001. Single nucleotide polymorphisms: From the evolutionary past. *Nature*, 409, 821-822.

58. Storm, N., Darnhofer-Patel B., van den Boom D., Rodi C.P., 2003. MALDI-TOF mass spectrometry-based SNP genotyping. *Methods Mol. Biol.*, 212, 241-262.

59. Stoyanova, S., 2009. Performance test traits in Danube White pigs with different RYR, ESR and FUT1 genotypes. *Agricultural Science and Technology*, 1, 4, 113-116.

60. Sunnucks, P., Wilson A. C. C., Beheregaray L. B., Zenger K., French J. and A. C. Taylor., 2000. SSCP is not so difficult: the application and utility of single-stranded conformation polymorphism in evolutionary biology and molecular ecology *Molecular Ecology*, 9, 1699-1710.

61. Syvänen, A. C., 2001. Accessing genetic variation genotyping single nucleotide polymorphisms. *Nature Reviews Genetics*, 2, 930-941.

62. The International SNP Map Working Group, 2001. A map of human genome sequence variation containing 1.4 million SNPs. *Nature*, 409, 928-933.

63. Tkáčiková, L., Hreško S., 2008 Genotypization of the prp gene of the ruminants. *Journal of Agrobiology*, 25, 109-111.

64. Todorovska, E., Atanassov A., and D. Vassilev., 2010. From genetics to genomics in plants and animals. *Genetika*, 42, 1, 177-194.

65. Tosser-Klopp, G., Bardou P., Bouchez O., Cabau C., Crooijmans R., Yang D., Donnadieu-Tonon C., Eggen A., Henri C. M., Heuven S. J., Abdullah J. J., Klopp C., Lawley T. C., McEwan J., Patrice M., Moreno C. R., Mulsant P., Nabihoudine I., Pailhoux E., Palhière I., Rupp R., Sarry J., Sayre B. L., Tircazes A., Wang J., Wang W., Zhang W. and the International Goat Genome Consortium, 2014 Design and Characterization of a 52K SNP Chip for Goats. *PLoS ONE*, 9, 1, e86227. doi:10.1371/journal.pone.0086227.

66. Tost, J. and Gut I. G., 2005. Genotyping single nucleotide polymorphisms by MALDI mass spectrometry in clinical applications. *Clin Biochem.*, 38, 4, 335-350.

67. Vignal, A., Milan D., Sancristobal M., Eggen A., 2002. A review on SNP and other types of molecular markers and their use in animal genetics *Genet. Sel. Evol.*, 34, 275-305.

68. Vignal, A., Monbrun C., Thomson P., Barre-Dirie A., Burke T., Groenen M., Hillel J., Maki-Tanila A., Tixier-Boichard M., Wimmers K., Weigend S., 2000. Estimation of SNP frequencies in European chicken populations, in: *Conference Abstract Book of the 27th International Conference on Animal Genetics*, Minneapolis, July 22-26, 71, 2, 30-47.

69. Wang, D. G., Fan J. B., Siao C. J., Berno A., Young P., Sapolsky R., Ghandour G., Perkins N., Winchester E., Spencer J., Kruglyak L., Stein L., Hsie L., Topaloglou T., Hubbell E., Robinson E., Mittmann M., Morris M. S., Shen N., Kilburn D., Rioux J., Nusbaum C., Rozen S., Hudson T. J., Lander E.S., 1998. Large scale identification, mapping, and genotyping of single nucleotide polymorphisms in the human genome. *Science*, 280, 1077-1082.

70. Werner, F.A.O., Durstewitz G., Thaller G., Barkemeyer H., Irps U. 2002. Standardized presentation of SNP genotypes for paternity testing, individual identification and genetic distance analysis. I.S.A.G.

71. Werner, F. A. O., Durtsewitz G., Habermann F. A., Thaller G., Krämer W., 2004. Detection and characterization of SNPs useful for identity control and parentage testing in major European dairy breeds. *Animal Genetics*, 35, 44-49.

72. White, P. S., Kwok P., Oefner P., Brookes A. J., 2001. 3rd Int. Meeting on Single Nucleotide Polymorphism and Complex Genome Analysis: SNP's: 'Some Notable Progress'. *Eur. J. Hum. Gen.*, 9, 316-318.

73. Xianglong Li., Zengli Z., Yuanfang G., Zhengzhu L., 2007. mtDNA D-loop of Chinese main indigenous sheep breeds using PCR-RFLP. *J. Front. Agric. China*, 1, 3, 352-356.

DNA TECHNOLOGIES FOR DETECTION OF SINGLE NUCLEOTIDE POLYMORPHISMS IN ANIMAL GENOME

D. Hristova

Thrakia University, Faculty of Agriculture - Stara Zagora

SUMMARY

During the last decade, the use of molecular markers, revealing polymorphisms at the DNA level, has been playing an increasing part in animal genetics studies. At present, the microsatellites DNA markers have been the most widely used in the characterization of livestock genetic resources, due to their high degree of information provided by large number of alleles per locus. Despite this, Single Nucleotide Polymorphism (SNP) as a new marker type, is now in the focus and have gained high popularity, even though it is only a bi-allelic type of marker. In comparison with other markers they represent one of the more precise approaches in the genotyping, because they are abundant in the animal genome, genetically stable and amenable to high-throughput analysis. The technologies for detection of SNP are used to scan for new polymorphisms and to determine the allele(s) of a known polymorphism in target DNA sequences of the animal genome. SNP discovery relies mostly on direct DNA sequencing or on denaturing high performance liquid chromatography (dHPLC). In recent years, the number of SNPs genotyping methods has exploded and currently are available many accurate methods.

The present review is a brief account of various techniques for detection of single polymorphisms at the DNA level and their applications in animal genetics improvements.

Key words: *single nucleotide polymorphisms, DNA technologies, animal genome*

e-mail: dhristova@uni-sz.bg

ЗАДЪЛЖИТЕЛНИ ИЗИСКВАНИЯ КЪМ АВТОРИТЕ

1. Авторът представя статията за рецензиране от Редакционната колегия на списанието, придружена с протокол от научната секция, или с рецензия, напълно комплектувана и записана на електронен носител (диск, флаш памет), ако не е изпратена по електронна поща.

2. Авторът носи лична отговорност за автентичността на представеното изследване, както и за точността на използваната научна терминология. Езиковото и стиловото оформление на материалите са задължение и отговорност на авторите.

3. Заглавието на статията трябва да бъде написано кратко, точно и без езикови съкращения и да отразява конкретния обект на изследването. Името и фамилията на автора трябва да са изписани изцяло, както и точното наименование на научния институт, или др., където работи, посочва се и адрес за кореспонденция или e-mail.

4. Статията задължително трябва да съдържа резюме (на български и на английски език – с необходимите данни, посочени в т. 3), с обем, не по-повече от 160 думи. В резюмето трябва да са отразени предметът, методът, основните резултати и изводите от представеното изследване; посочват се и ключови думи.

5. Текстът задължително трябва да бъде с шрифт Times New Roman или Arial и във формат за Word for Windows. Графики, фигури – XLS (създадени с MS Excel). Снимки и други илюстрации – TIFF (с резолюция минимум 200 dpi (dot per inch), JPEG (със степен на компресия не по-ниска от 9).

6. Графики, фигури, снимки и други илюстрации се представят задължително с чернобяло изображение, с изключение в случаите, когато отпечатването ще бъде цветно. Авторът заплаща печата на цветните изображения, заявени по негово желание след предварителна калкулация.

7. Таблицы и фигури заедно със заглавията към тях се представят отделно от текста на статията. Заглавията на таблиците и фигурите трябва да бъдат изписани на български и на английски език.

8. Фигурите трябва да бъдат максимално изчистени от текст и с размер до 18,2 на 23,6 cm, където е възможно, и не по-голям от формат A4 за карти и схеми. Всички необходими означения се изнасят под основното заглавие на фигурата, написани също на български и английски език.

9. За обозначаване на измерителните единици се използва Международната система за измерителни единици – **SI**.

10. Прегледът на литературата трябва да отразява съвременното равнище на разглеждания въпрос, като авторите могат да се позовават само на оригинални трудове. При цитиране на литература в текста се посочва само автор – година, а когато броят на цитираните автори е повече от двама се посочва само първият от тях, последвано от „и др.“ – година. Ако се цитират изследванията на различни автори по един и същи въпрос, подреждането им се прави в хронологичен ред.

11. Библиографията трябва да посочва имената на авторите и литературните източници без грешки и по азбучен ред – първо на кирилица (български автори; руски автори), а след това – на латиница. Посочва се само литературата, която е цитирана в текста. При цитиране задължително се посочват: на периодични издания: автор, година, заглавие на статията, наименование на изданието, том, №, стр. (от-до); на книги: автор, година, заглавие, издателството, град, стр. (от-до); на дисертации, автореферати и хабилитационни трудове: автор, година, заглавие, институт, град, стр.; на материали от конгреси и симпозиуми: автор, година, тема, заглавие, дата и място на провеждане.

12. Научни трудове, които не отговарят на посочените по-горе изисквания, се връщат на авторите за корекция.

13. Не се приемат за публикуване статии, които са част от вече защитени дисертации, както и материали, които са под печат или са отпечатани в други издания.

14. Редакционната колегия на списанието, съгласно определените й правомощия, взема окончателното решение конкретно за всеки рецензиран и докладван материал въз основа на становището на определения от нея рецензент.

15. Коректури се преглеждат от авторите за не по-късно от 2 дни след известие от редакцията. За коректури, които не са изчетени от автора, отговаря зам.-отг. редактор на списанието.

16. Всеки автор има право да получи на .pdf формат броя от съответната книжка, в която е отпечатана статията му.

17. Всички материали от проведени тематични научни конференции, както и статии на автори от научни организации извън системата на Селскостопанската академия, одобрени от редакционната колегия за публикуване в списанието, се заплащат преди отпечатването по единна тарифа за научните издания на ССА (на база стандартна страница – 1800 знака).

Забележка. При неспазване на посочените изисквания не се дава ход на материалите. Ръкописи не се връщат. Редакцията не носи отговорност за непотърсени до 6 (шест) месеца статии.