

ПРИЛОЖЕНИЕ НА МИКРОСАТЕЛИТНИ МАРКЕРИ В ОВЦЕВЪДСТВОТО I. СЪОБЩЕНИЕ

КАТЯ ЦОЧЕВА,
РАДОСТИНА СТОЙКОВА-ГРИГОРОВА,
МАРИЯ МИХАЙЛОВА-ТОНЕВА
Институт по животновъдни науки – Костинброд

През последното десетилетие в контекста на препоръките на FAO и ISAG (Международно общество по генетика на животните) стартират многобройни изследвания, с оглед характеристика на генетичната структура и оценка на вътре- и между- породното разнообразие в редица популации овце (Arranz et al., 2001; Rendo et al., 2004; Alvarez et al., 2004; Peter et al., 2005; Uzun et al., 2006; Pedrosa et al., 2007; Dalvit et al., 2008; Cinkulov et al., 2008; Santos-Silva et al., 2008; Озеров и др., 2008; Gizaw et al., 2008; Ligda et al., 2009; Kusza et al., 2009; Chen et al., 2009 и др.).

Настоящото ниво в развитието на молекулярната генетика, техническите и научните постижения в тази област, обусловиха използването на микросателитните и митохондриални ДНК-последователности като рутинни методи за оценка на генетичната структура и разнообразието в различни популации преживни животни (Alvarez et al., 2004; Uzun et al., 2006; Peter et al., 2007; Pedroza et al., 2008; Dalvit et al., 2008; Li et al., 2008 и др.).

Микросателитните маркери са известни още като „малки нуклеотидни последователности“ (Simple sequence repeats - SSRs) или „къси тандемни повтори“ (Short tandem repeats) и представляват ДНК-участъци, които се демонстрират като високоповтарящи се фрагменти от нуклеотидни последователности (Li et al., 2008; Озеров и др., 2008). Микросателитите, като високоповтарящи се участъци на ДНК последователности, имат дължина от 1 до 4 нуклеотиди, понякога и 6 нуклеотиди, и в организма на човека и домашните животни, представляват 10% от целия геном (Озеров и др., 2008). Сред молекулните маркери микросателитите са високо оценявани и широко използвани за изучаване генома на животните (Ceccobelli, 2009).

Приложението на микросателитните маркери е неоспоримо при доказване на бащинство и на записи от педигретата, с цел проследяване на алелите в популациите и е научно обосновано както за оценка на генетичното разнообразие, генетичните дистанции, така и за инбридинга в различни популации селскостопански животни. Микросателитните маркери са най-добрите генетични маркери поради тяхната локусна идентичност, високо ниво на полиморфизъм, случайно разпределение върху целия геном, кодоминантно наследяване, неутралност относно селекцията, възпроизводима и лесна автоматизация на аналитичните процедури при генотипиране на овце от различни породи (Peter et al., 2007; Santos-Silva et al., 2008; Li et al., 2008; Ligda et al., 2009; Kusza et al., 2009 и др.). Използването на общоприет панел микросателитни маркери в проучванията относно генетичното разнообразие на видовете селскостопански животни е желателно както от гледна точка на изясняване родствените взаимовръзки между породите, така и с оглед съпоставимост на информацията от различни изследвания (Dalvit et al., 2008). Peter et al., (2007) подчертават, че прилагането на микросателитите е станало стандартен метод за оценка на генетичното разнообразие при домашните животни (както това е посочено в обзора на Baumung et al., 2004), но трябва да се отбележи, че този тип маркери имат и някои несъвършенства като нулеви алели и комплицираност при интерпретацията.

В табл. 1 са представени микросателитните маркери, използвани в изследванията от Arranz et al.

Таблица 1. Списък на микросателитните маркери за генетичен анализ в популации овце

Маркер	Хромозома	Алели	Праймери
BM8125 (149)	17	10	CTCTATCTGTGGAAAAGGTGGG GGGGGTAGACTTCAACATACG
MAF65 (52)	15	4	AAAGGCCAGAGTATGCAATTAGGAG CСACTCCTCTGAGAATATAACATG
BM1824 (14)	1	8	GAGCAAGGTGTTTTCCAATC CATTCTCСAACTGCTTCCTTG
ILSTS011 (517)	9	15	GCTTGCTACATGGAAAAGTGC CTAAAATGCAGAGCCCTACC
BM1329 (62)	6	5	TTGTTTAGGCAAGTCCAAAGTC AACACCGCAGCTTCATCC
HUJ616 (492)	13	17	TTCAAACТАCACATTGACAGGG GGACCTTTGGCAATGGAAGG
CP34 (1902)	3	8	GCTGAACAATGTGATATGTCAGG GGGACAATACTGTCTTAGATGCTGC
FCB128 (115)	2	13	ATTAAGCATCTTCTCTTATTTCCTCGC CAGCTGAGCAACTAAGACATACATGCG
HH47 (1262)	18	17	TTTATTGACAACTCTCTTCTAАCTCCACC GTAGTTATTTAAAAAATATCATACTCTTAAGG
VH72 (1644)	25	5	GGCCTCTCAAGGGGCAAGAGCAGG CTCTAGAGGATCTGGAATGCAAAGCTC
FCB20 (265)	2	11	AAATGTGTTTAAAGATTCCATACAGTG GGAAAACCCCATATATACCTATAC
JMP58 (1904)	26	16	GAAGTCATTGAGGGGTCGCTAACC CTTCATGTTACAGGACTTTCTCTG
FCB193 (118)	11	4	TTCATCTCAGACTGGGATTCAGAAAGGC GCTTGGAATAACCCTCCTGCATCCC
MAF70 (53)	4	13	CACGGAGTCACAAAGAGTCAGACC GCAGGACTCTACGGGGCCTTTC
FCB304 (116)	19	3	CCSTAGGAGCTTCAATAAAGAATCGG CGCTGCTGTCAACTGGGTCAGGG
MAF33 (45)	9	6	GATCTTTGTTCAATCTATTCCAATTTC GATCATCTGAGTGTGAGTATATACAG
FCB226 (449)	2	7	CTATATGTTGCCTTCCCTCCTGC GTGAGTCCCATAGAGCATAAGCTC
BMS1948 (1139)	21	5	AACACAGGGAAGTGTGTTTTAA GACAGTTTGTGGTGTGGAGAC
FASMC2 (711)	22	7	GAAGATGGGCCCTATAGCTG AAATGCCACACATTCAAACTC
BM2504 (242)	8	8	CAGCTTCCATCCCCTTTC CTCCCATCCCAAACACAGAC
BMS1290 (1028)	8	5	TTGGCACTTACTACCTCATATGTT TTTTCTGGATGTTGAGCCTATT
BM3413 (180)	18	14	TCCCTGGTAACCAATGAATTC CAATGGATTTGACCCTCCC
BMS522 (1183)	5	3	CTTGCTTACTGCTTGCTATGAA CCCAACAAAATTTCTGATTCTC
MB023 (521)	25	6	CACCTTCTATGCTTCCACTCTAG GCTTTAGGTAATCATCAGATAGC
CSSM043 (494)	26	9	AAAACCTGGGAACCTGAAAACТА GTTACAAAATTTAAGAGACAGAGTT
BMS975 (1266)	10	7	TGGAGCTAAATCAATGCGTG CCCAATGGCCAATTAAGTACC
CSSM031 (652)	23	8	CCAAGTTTAGTACTTGTAAGTAGA GACTCTTAGCACTTTATCTGTGT
MB056 (514)	7	8	GGAAGCAATGAAATCTATAGCC TGTTCTGTGAGTTGTAAGC

(2001); **Uzun et al.**, (2006); **Dalvit et al.**, (2008); **Cinkulov et al.**, (2008); **Santos-Silva et al.**, (2008); **Ligda et al.**, (2009) и др. Препоръчаните от FAO и ISAG маркери за овце са 27, публикувани в the Secondary Guidelines for Development of National Animal Genetic Resources Management Plans: Measurement of Domestic Animal Diversity (MoDAD): Recommended Microsatellite Markers. Информацията за маркерите е на база данните, публикувани в www.marc.usda.gov.

През последните 10 години се провеждат редица изследвания с цел определяне генетичната структура и диференциация между различни породи овце посредством микросателитни маркери (**Farid et al.**, 2000 – изследват 10 породи овце в Канада; **Li et al.**, 2008 - изследват 6 местни породи овце в Китай; **Gladyr et al.**, 2005 – изследват руски породи овце; **Glowatzki – Mullis et al.**, 2009 – изследват швейцарски породи овце по **Kusza et al.**, 2009).

Интензивни научни изследвания на генетичното разнообразие в различни популации испански овце посредством микросателитните локуси се провеждат от **Arranz et al.** (2001); **Rendo et al.** (2004); **Alvarez et al.** (2004) и др.

В изследването на **Arranz et al.** (2001) е анализирано генетичното разнообразие в шест местни испански породи овце посредством 18 микросателитни локуси. Генетичното разнообразие е оценено чрез параметъра ефективен брой алели и са намерени породно специфични алели с по-голяма честота в породата Merino и с по-малка в породата Churra. **Rendo et al.** (2004) посочват, че класификацията на испански породи овце само на база морфологични признаци невинаги се съгласува с исторически и генетични данни. В този аспект те анализират генетичното разнообразие и диференциацията между шест местни породи овце от северната част на Иберийския полуостров посредством 11 микросателитни маркери. Направена е допълнителна оценка на вътре популационното разнообразие на породата Latxa на база морфологично установените клонове и типове. Резултатите от проучването доказват наличие на популационна структура в породата Latxa и в тази връзка предполагат нова класификация на субпопулациите в тази порода. Проведените мултивариантни анализи правят безспорна клоновата диференциация сред три от породите (Latxa, Carranzana и Sasi Ardi), принадлежащи към Churra клона, другите три породи са класифицирани към Enterfino групата. На база изследваните 11 микросателитни маркери е установено по-голямо генетично разнообразие в Churra клона, в сравнение с по-хомогенните Enterfino породи. Получените генетични данни съвместно с историческите и морфологични данни дават основание на **Rendo et al.** (2004) да предположат независим произход на двете породни групи, като резултат от различни миграционни събития, последван от голяма диференциация на Churra и Enterfino клоновете във връзка с тяхната демографска и репродуктивна история.

Alvarez et al. (2004) посочват, че редица публикации са посветени на анализ на генетичното разнообразие и диференциацията във видове селскостопански животни, но въпросът за взаимовръзките между близки популации остава открит. Според авторите генетичните взаимовръзки сред местни породи овце на Иберийския полуостров са недостатъчно проучени. Така например на база морфологични признаци (в частност наличие на дълга, груба вълна) на овцете и тяхното използване за мляко повечето северноиберийски породи са включени в т. н. Churra група. Тези породи вероятно са създадени от внесени овце майки от Централна Европа. Липсва обаче консенсус относно определянето на някои породи към т.н. Latxa група. Тази породна група е изучавана като единична популация посредством микросателитни маркери. Но фенотипната диференциация между две от породите в Latxa групата, вероятно се дължи не само на цветните петна, а и на обстоятелствата, че развъдните цели са били различни, развъдните схеми и оценката на генетичните параметри за продуктивните признаци са провеждани отделно, в резултат на което са били характеризирани като различни породи. Като се позовават на редица изследвания, **Alvarez et al.** (2004) посочват, че са разработени методологии за оценка на хетерогенността на популационно ниво, позволяващи оценяване на степента на миграция, приблизително за последните 4 N_e генерации.

В тази връзка **Alvarez et al.** (2004) оценяват степента на подразделяне в популации овце и определят относителното участие на всяка порода като прилагат съвременна методология за анализ. Анализирани са 238 несвързани индивиди от 6 породи овце в Северна Испания по 14 микросателитни маркери. Три от породите се приемат за застрашени. Изследваните породи се предполага, че са включени в прародителската Iberian churra група овце. Използвани са редица статистически анализи за обработка на

данните от изследваните микросателитни локуси. Така например програмата Structure е използвана за анализ на генетичната структура на популациите. Степента на отдалечена и настояща миграция сред анализирани популации е оценена посредством програмите ADMIX 2.0 и Bayes Ass⁺ (по **Alvarez et al.**, 2004). Програмата ADMIX 2.0 използва молекулярната информация от всяка родителска популация, за да се изчисли коефициентът на смесване (m_i). Програмата Bayes Ass⁺, оценява настоящите размери на миграция сред популациите, като се използва информация за мултилокусни генотипове. Тази програма предполага генотиповете да са в равновесие по Hardy – Weinberg вътре в популациите, и изчислява вероятното разпределение на алелните честоти за всички локуси, степента на миграция сред популациите (m_{ij}) и отделните коефициенти на инбридинг за всяка популация (F_i), като се оценява относителното значение на специфичната популационна динамика. Използвана е също така и програмата GENEPOP v1.2 за изчисляване отклонението по Hardy – Weinberg на ниво локус и порода, вътрепородната хетерозиготност и между породния хетерозиготен дефицит, дължащ се на подразделянето на популациите, посредством F_{st} – статистиката **Alvarez et al.** (2004).

В дискусиата е посочено, че резултатите от това проучване не могат да бъдат сравнявани с тези от предходни изследвания, защото са използвани различни групи микросателитни маркери. Авторите обсъждат критично използването на F – статистиката за оценка на генетичната диференциация между породите. Резултатите получени от програмата STRUCTURE показват, че в изследваните популации има големи и неясни структури и е трудно да се оценят алелните честоти на „оригиналните“ популации когато има преминаване на индивиди от една в друга популация. Наличната генетична структура е обяснена като последица от приемане на индивиди от други популации, така и в резултат на репродуктивна изолация, водеща до „bottlenecks“ ефекта (или т. н. „ефект на основателя“ **Alvarez et al.**, 2004).

В заключение **Alvarez et al.** (2004) отбелязват, че идентификацията на генетичното родство и моделите за генния поток между селскостопанските популации са важни от гледна точка на развъждането и съхранението на породите. Авторите потвърждават хипотезата, че идентифицираните от тях породи Black-faced Latxa и Churra са представители на две генетично различни стада и вероятно имат различен прародителски произход.

Популационната структура и генетичното разнообразие на 57 маргинални и космополитни породи овце, произхождащи от 12 Европейски държави и 3 от Средния Изток, са анализирани посредством микросателитни маркери (**Peter et al.**, 2007). Овцете са първите доместицирани животни (около 9 000 г. пр. н. е.) и като селскостопански животни са разпространени от Средния Изток през Югоизточна Европа към Европейския континент по време на неолита и в последствие са създадени многобройни породи. Според **Peter et al.** (2007) това е резултат както на провежданата от човека селекция, така и на факта, че овцете се адаптират добре към различни хранителни източници и климатични условия в Европа. Тези фактори са благоприятствали създаването на 771 регистрирани от FAO Европейски породи овце, които представляват 48% от породите овце в света. Но 20% от породите са изчезнали, 18% са застрашени от изчезване, което е резултат от протекцията на ограничен брой модерни породи, съответстващи на поставените изисквания за висока печалба и лоша селскостопанска политика (FAO 1998 по **Peter et al.**, 2007).

Относителната липса на чистопородни овце и наличието само на няколко племенни книги, вероятно обуславят по-големия генен поток между породите от Югоизточна Европа и Средния Изток. Развъждането на база племенни книги и интензивен мениджмънт има за резултат генна изолация и редуциране на ефективния размер на популациите в повечето северни и северозападни Европейски породи овце (**Peter et al.**, 2007). Авторите посочват, че през последните години са публикувани няколко изследвания относно генетичното разнообразие в Европейски породи овце. Но тези проучвания в повечето случаи обсъждат относително малки групи от породи, и предимно са фокусирани в Европейски страни като Испания (**Arromz et al.**, 1998, 2001; **Diez-Tascon et al.**, 2000; **Rendo et al.**, 2004; **Alvarez et al.**, 2004), Италия (**Pariset et al.**, 2003), Швейцария (**Stahleberger-Saitbekova et al.**, 2001) и Финландия (**Tapio et al.**, 2003, 2005 a, 2005 b по **Peter et al.**, 2007). В този аспект **Peter et al.** (2007) провеждат изследване, част от Европейския ECONOGENE проект, с цел анализ на генетичното разнообразие и субразделянето в маргинални селскостопански породи овце от 12 Европейски държави

и 3 от Средния Изток страни (Египет, Саудитска Арабия и Турция). Анализирани са 1748 индивида от 57 породи, като повечето породи са местни (автохтонни) от маргинални стопанства и космополитни са няколко Merino породи от Германия, Полша, Унгария, Румъния и Испания. Пробите за микросателитния анализ са събирани от неродствени животни (от 17 до 32) в оригиналния ареал на породата, където са установени племенните стада. Изследвани са 31 микросателитни маркери (за говеда, овце и кози), всички локализиращи върху автозомните хромозоми, с изключение на 4 маркера.

Молекулярните данни са изчислени и анализирани със следните статистически анализи (**Peter et al.**, 2007):

Посредством софтуера GENEPOP 3.1 са изчислени алелните честоти за микросателитните локуси, и са направени екзактните тестове за определяне отклоненията от равновесието по Hardy – Weinberg.

Като се прилага софтуерът GENETIX vs.4.05.2, вътрепородното генетично разнообразие е оценено на база наблюдавана хетерозиготност и неизместени средни оценки поради това, че наблюдаваният брой алели силно зависи от размера на извадката е регистрирано алелното вариране за всяка порода посредством F STAT програмата.

Популационното субразделяне е анализирано чрез индекса по Wright, като се приема нулевата хипотеза, че оценките не се различават достоверно от нула и нивото на достоверност ($P < 0.001$) е било адаптирано чрез корекцията на Bonferroni.

Три статистически метода са приложени, с оглед анализ на генетичната диференциация между породите:

Първият метод е на база изчислените генетични дистанции по Reynold, които са най-подходящите измерени генетични дистанции за породи с кратка разлика във времето, и подложени на генетичен дрейф каквито са Европейските породи овце. Тези генетични дистанции са използвани за конструиране на дървото на най-близките съседи (Neighbour-Joining Tree), посредством софтуера PHYLIP.

Вторият метод, известен като Анализ на главните компоненти (Principal component analysis - PCA) е на база ковариансна матрица, чрез програмата SPSS v.10.0.7. Този анализ се прилага поради това, че при генетичните дистанции не се отчита ефектът на структурата между клоновете.

Третият метод се прилага, за да се определи най-вероятно сходното деление в базата данни, независимо от породната принадлежност, посредством софтуера STRUCTURE 2.0.

Peter et al. (2007) са установили общо 564 алели в изследваните 31 локуси (от 6 до 41 алела за локус) и всички маркери са били полиморфни за 37 от изследваните породи. Общо 65 породно специфични алели са открити в 24 локуси, но никой от тези алели не е притежавал честота $> 5\%$.

Общо 323 от 1767 сравнения локуси/популации са показали достоверно ($P < 0.05$) отклонение от равновесието по Hardy-Weinberg. За три локуса е установено наличие на нулеви алели, поради което тези маркери са изключени от анализите.

Генетичното разнообразие вътре- и между породите, оценено посредством параметъра средна алелна ценност (allelic richness - r) е 6.42 за порода (от 5.00 до 7.52 съответно за немската порода Grauegehorute heidschnucke и Румънския цигай).

Показателят за инбридинг, потвърден от последователни положителни f оценки за всички породи варира от 0.007 до 0.149 (съответно за полската порода Kamieniec и италианската Altamirana). Наблюдаваният за всички локуси дефицит на хетерозиготи е достоверен ($P < 0.001$). Стойностите за инбридинга за всички изследвани породи са указание за наличие на инбридинг или за ефекта на Wahlund (така известния ефект за наличие на генетична субструктура в породата).

Средната генетична диференциация между всички породи (F_{st}) е била 5.7% (достоверна при $P < 0.001$).

Проучваните породи показват генетично вариране в широки граници. Югоизточните Европейски породи овце, както и тези от Средния изток са достоверно по-вариабилни, отколкото тези от Северозападните и Западните Европейски породи овце.

Peter et al. (2007) подчертават, че когато се използват оценките за алелните честоти с оглед анализ на породната диференциация, то генетичният дрейф в породите обуславя в голяма степен генетичната диференциация между породите. Ето защо и най-малко вариращите породи са обикновено най-различни (каквато е случаят с анализирания немска порода Grauegehorute heidschnucke).

Изследваните за пръв път Югоизточни Европейски и Средноизточни породи овце са показали удивително високи нива на генетично разнообразие (Peter et al., 2007). Получените резултати по метода на PCR са показали, че породите от Средния Изток, Турция, Гърция, Албания и Румъния имат достоверно по-високо генетично разнообразие, отколкото Северозападните Европейски породи.

Устойчива географска тенденция в групиране на породите в дървото на най-близките съседи (Neighbour-Joining Tree) е намерена. Достоверността на групиране на породите в дървото на най-близките съседи е оценена, с така известните „bootstrap” стойности, която е най-висока (61%) за тлъстоопашатите Азиатски породи, но повечето други „bootstrap” стойности са били ниски, което заедно с относително високите стойности на генетичните дистанции са указание за липса на структура в дървото (Peter et al., 2007). Анализът на главните компоненти и модела на групиране (по Bayesian) са показали последователност в степента на разликите от Югоизточните към Северозападните породи. Също така са установени различни групи, както в Средно-източните тлъстоопашати овце, така и в Югоизточните, Северозападните и Западните Европейски породи овце. Намерено е, че повечето Турски и Югоизточни породи овце са различни от другите Европейски овце. В групата на Западно Европейските овце са установени два по-малко различаващи се кластъра, включващи породи тип Merino и Алпийски овце.

Според Peter et al. (2007), за да се обяснят тенденциите в групиране на породите трябва да се вземат под внимание и следните обстоятелства. Първото е, че domestикацията е започнала от Средния изток и разпространението на овцете в Европа се осъществява в две направления, така известни като Дунавски път – от Мала Азия към Дунавската равнина и Средиземноморски път – през Средиземно море и Атлантическите брегове на Европа до западните части на Британските острови. Това разпространение вероятно води до „ефекта на основателя” в тези популации овце още от времето на неолита, и следователно генетичният дрейф може да променя алелните честоти. Подобна тенденция е установена и при говеда. Авторите допускат възможността и за кръстосване между диви и домашни овце. Второто обстоятелство е политическото разделяне по време на „Студената война” (1950-1990), когато се възпрепятства миграцията и генният поток между Западните и Югоизточните Европейски породи, в резултат на което се увеличава генетичният дрейф. И третото е турското влияние върху повечето Югоизточни Европейски породи по време на турската окупация до 1923 година, което може да обясни групирането на Турските и Югоизточни Европейски породи.

В заключение Peter et al. (2007) подчертават, че стойностите на генетично вариране са указание, че породите овце от Югоизточна Европа и Средния Изток са съхранени като отделен заслужаващ внимание резервоар на генетично разнообразие. На база получените резултати авторите правят извода, че характеристиката на породите често е резултат на политически граници, история на развъждане, ефектен фенотип и генетична специфичност.

Оценка на генетичното разнообразие и родство сред Турски породи овце въз основа на вариране на нуклеарна ДНК посредством микросателитни маркери се съобщава от Uzun et al. (2006). Изследвани са 225 животни от 5 турски породи овце, по 30 микросателитни маркери. Авторите посочват, че информация за изследваните породи овце може да се намери в „A world dictionary of livestock breeds, types and varieties” (1996, Mason I. L.). Две от изследваните породи (Akkağaman и Morkağaman), принадлежащи към тлъстоопашатите овце имат най-многобройни популации, и заедно представляват 70% от овцете в Турция. Тези породи имат съществени отличителни характеристики. Така например местната турска порода Akkağaman е най-многобройна и представлява половината от всички отглеждани овце в Турция, животните са бели, развъждани основно за месо. Червено-кафявите Morkağaman овце са добре адаптирани към тежките средови условия и се развъждат заради грубата им вълна (Uzun et al., 2006). Както посочват авторите, молекулярните данни от микросателитните маркери не са винаги в пълно съответствие с морфологичната класификация. В този аспект микросателитите се приемат като селективно неутрални маркери и се очаква да отразят по-точно еволюционите взаимовръзки между породите.

Получените молекулярни данни за изследваните породи и локуси се анализират с подходящи статистически методи и програми. Посредством програмата GENETIX 4.03 са оценени алелните честоти и генното разнообразие, и е проведен факториален анализ за съответствие (Factoria corre-

spondence analysis) на база индивидуални многолокусни генотипове.

Генетичните дистанции, осигуряващи информация за филогенетичното родство между популациите и породите са изчислени с програмата POPULATIONS 1.2.29. Изчислени са стандартната генетична дистанция по Nei ($D_{s_{Nei}}$) и генетична дистанция по Reynolds (D_{Rey}). Стандартната генетична дистанция по Nei се избира за сравнителна цел, защото тя се явява най-много използвана в животновъдството. Но като най-подходящи за краткосрочни еволюционни изследвания се препоръчват генетичните дистанции по Reynolds, за които се очаква отклоненията да се дължат предимно на генетичния дрейф (Uzun et al., 2006). Въз основа на генетичните дистанции по Reynolds е построена дендограмата, демонстрираща генетичните взаимовръзки между изследваните породи овце по 30^{те} микросателитни локуси.

Uzun et al. (2006) посочват, че вътрепородното разнообразие по изследваните 30 микросателита в 5^{те} турски породи е било високо. Средният брой алели за локус е 7.8 (от 9.3 до 10.4). Генетичното разнообразие варира в тесни граници (от 0.694 до 0.738). Не са установени постоянни отклонения от равновесието по Hardy-Weinberg между популациите, по който и да е от изследваните локуси. Оценките на генетичните дистанции по Nei и Reynolds са в добро съответствие. Филогенетичният анализ показва, че три от изследваните породи (Morkaraman, Akkaraman и Tuğ) имат най-близко генетично родство, и обособяват ясна група на дендограмата. Тази тенденция е напълно потвърдена от получените резултати посредством факториалните анализи за съответствие.

Дискутирайки резултатите от настоящото проучване, Uzun et al. (2006) посочват, че разделянето на тлъстоопашатите от нетлъстоопашатите овце е отражение на разлики на геномно ниво.

Uzun et al. (2006), като сравняват резултатите от настоящото проучване с тези, получени през 2005 г. при изследване на митохондриална ДНК (mt ДНК) за същите породи, подчертават, че информацията е твърде различна и същевременно допълваща се. Най-важните изводи от анализите на mt ДНК е идентификацията на три различни майчини произхода (mt ДНК тип А, тип В и редкия тип С, който в някои от изследваните породи е срещан много често). Uzun et al. (2006) посочват, че в изследване на Hiendleder et al., (2002) се съобщават само два митохондриални типа (mt ДНК тип А и тип В) в Европейски и Азиатски породи овце. Uzun et al. (2006) отбелязват, че съвместният анализ на данните от микросателитите (нуклеарна ДНК) и mt ДНК дава полезна информация за произхода и генетичните взаимовръзки на съвременните породи. Така например породите Morkaraman и Akkaraman, които са доказано много близки по микросателитните маркери, се различават по mt ДНК типове. Akkaraman овцете, като местна турска порода, показват висока честота на mt ДНК тип С, докато Morkaraman породата има ясно доминиране на mt ДНК тип А (известен като Азиатски тип), и е разпространена в източна Турция и западен Иран. Вероятно тези две породи се различават по техния майчин произход, а близкото сходство, установено посредством микросателитните маркери, вероятно произхожда по мъжка линия. От друга страна овцете от породите Tuğ и Hemsin демонстрират съществени разлики по изследваните микросателитните локуси, но не показват такива разлики по mt ДНК тип В, който има превъзходство при тези две породи (Uzun et al., 2006). Авторите като се позовават на друго изследване (Bruford et al., 2003) посочват, че mt ДНК се наследява изключително по майчина линия и се явява информативна когато се анализират процесите на доместикация, но е по-малко значима при изследване процесите на интрогресия, които най-вероятно трябва да се свързват с генния поток, реализиран чрез мъжките индивиди. Uzun et al. (2006) в заключение посочват, че приложението на микросателитните маркери е по-адекватно при анализ на съвременните еволюционни процеси, обусловени в по-голяма степен от мъжкия генен поток, и са най-подходящи за представяне на цялостното геномно разнообразие. Авторите правят извода, че данните получени в това изследване допълват тези от изследването на mt ДНК, и тези резултати заедно имат съществен принос за анализите на еволюционните процеси и генетичните взаимовръзки сред турските породи овце, за които е публикувана малко информация, свързана с техния произход.

Генетичното разнообразие в девет Алпийски породи овце, и една кросбредна популация, отглеждани в Италия, Германия и Словения, е оценено посредством приложението на микросателитни маркери от Dalvit et al., (2008). Авторите посочват, че настоящото проучване е част от проект, разработван от 15 партньори от Италия, Австрия, Германия и Словения в съвместна програма на ЕС (известна като

Interreg III B Alpine Space).

Според **Dalvit et al.**, (2008) понастоящем в Алпийската област има 60 различни породи овце, значителен брой от които са в програми за съхранение, а неопределен брой вече са изчезнали. Като обсъждат значимостта на развъждането на овце в маргиналните области и повсеместната застрашеност от изчезване на локални популации, **Dalvit et al.**, (2008) отбелязват, че развъжданите овце и кози в Алпийската област постоянно намаляват за последните 50 години независимо, че те представляват съществен икономически, средови и социален продукт. В този аспект по-задълбочени изследвания относно генетичната изменчивост и разнообразие ще позволят да се оцени тяхната вероятна степен на застрашеност и да се предложат постижими решения за тяхното съхранение. В тази връзка са изследвани общо 370 индивиди от 5 породи и една кросbredна популация от Италия, 2 породи от Германия и две от Словения по 19 микросателитни локуси. Анализираният индивиди могат да се приемат като репрезентативна извадка от породите, защото са събирани от различни стада и се прави опит да се избегнат близко родствени индивиди. Броят на стопанствата, от които са взети пробите, варира от 4 до 17 с изключение на една порода, от която пробите са взети само от 2 стада поради малкия размер на популацията.

Броят на алелите за всеки локус, алелните честоти, наблюдаваната и очакваната хетерозиготност са изчислени със софтуера GENETIX 4.05.2. Отклонението от равновесието по Hardy-Weinberg е определено чрез тестове посредством програмата GENEPOP 3.4. Тази програма е използвана и за тестове на популационната диференциация за всеки локус, за да се провери дали разпределението на алелите е различно между двойките породи. F_{sat} v. 2.9.3 софтуерът е приложен, за да се изчисли алелната ценност (**Dalvit et al.**, 2007). Генният поток между породите е изчислен посредством софтуера Molkin. Този софтуер е приложен за анализ на генетичната диференциация между породите, като са изчислени генетичните дистанции по Reynold. Те са най-подходящи за относително близкородствени популации подобно на породите в Европа, при краткосрочна дивергенция и в този случай мутациите са пренебрежими и главния фактор, обуславящ генетичната изменчивост е случайния дрейф (**Dalvit et al.**, 2007). Въз основа на тези генетични дистанции е конструирано Дървото на най-близките съседи (Neighbour-Joining Tree) посредством програмата PHYLIP, а дендограмата е визуализирана със софтуерния пакет Tree View 1.6.6. Приложен е и втори метод за анализ на генетичната диференциация между породите, за да се открие най-вероятния брой кластери в група данни, посредством програмата STRUCTURE 2.0 (**Dalvit et al.**, 2008).

Установени са общо 361 алели в изследваните 19 микросателитни локуси, като всички маркери са били полиморфни в анализираният популации. Намерени са 113 породно специфични алели (31%) в породите, но честотата на тези алели е по-скоро ниска (>10%) (**Dalvit et al.**, 2008). Във всяка от изследваните популации е аргументирано високо достоверно ($P < 0.001$) отклонение от равновесието по Hardy-Weinberg във всички локуси, обусловено от дефицита на хетерозиготи. Кое то според **Dalvit et al.** (2008) вероятно се дължи на две причини, на популационна субструктура (или така известния Wahlund ефект) или на високо ниво на инбрединг, указание за което са положителните F_{is} оценки. Авторите приемат, че мениджмънта на стадата е основната причина за високото ниво на инбрединг, който е опасен, защото води до генетични болести и нещо повече - силно намалява приспособимостта (fitness) на животните. Този проблем може да се контролира чрез обмяна на кочове между стадата от една и съща порода, толкова дълго, колкото мъжките индивиди осигуряват различен генофонд.

Генетичната диференциация между изследваните породи е била по-скоро ниска ($F_{st} = 0.057$ или 5.7%), но достоверна. Клъстърният анализ доказва наличие на осем клъстърта. Така например, четирите италиански породи овце се групират по две в две групи, което е доказателство за голямо сходство при тяхното сформирание. Оценките за генетичните дистанции по Reynold потвърждават близкото генетично родство между двойки породи. Нещо повече, три от породите (две от Словения и една от Германия) са показали в известна степен сходство, което може да се очаква в зависимост от района от който произхождат и от техни общи прародители. Молекулярните данни от това изследване показват, че изучаваните популации произхождат от различни прародителски популации (**Dalvit et al.**, 2008). Авторите посочват, че Италианските породи показват малко по-високо ниво на генетично разнообразие в сравнение със Словенските и Немските породи овце. Повечето от анализираният в това проучване

породи не са били характеризирани по-рано, ето защо настоящите резултати не могат да бъдат сравнявани. Една от породите, обект на настоящото проучване на **Dalvit et al. (2008)** е изследвана от **Baumung et al., (2006)** по **Dalvit et al., (2008)** и резултатите се различават. Това според **Dalvit et al. (2008)** се дължи на различния мениджмънт на породите в зависимост от страната, от която произхождат съответно Италия и Австрия. **Dalvit et al. (2008)** правят извода, че в тяхното проучване е доказано близко родство между породите овце от Алпийската област. Много ниските генетични дистанции между двойките Италиански породи би трябвало да се изследват по-обстойно, за да се разбере каква е степента на смесване между тях. На база получените молекулярни данни е направен извода, че ситуацията в анализираниите породи е рискова, защото тяхното генетично разнообразие е компрометирано от високото ниво на инбридинг и налична популационна субструктура. В тази връзка някои от породите са вече класифицирани като застрашени от изчезване. Обменът на кочове, притежаващи различен генофонд между стопанствата, отглеждащи една и съща порода е препоръчителен, с цел увеличаване на генетичната варианса на породата. Микросателитните маркери могат да се използват като метод за анализиране на генетичната разлика между кочовете, както с цел организиране на съешавания, така и за мониторинг с оглед потенциалното намаление на генния поток между породите.

Популационната структура и генетичното разнообразие в местни Португалски породи овце, включително импортна Израелска порода (Assaf), са оценени от **Santos-Silva et al. (2008)**. Използвана е Израелска порода (Assaf), защото е най-важна от внесените в Португалия през последните години. Тази порода е тлъстоопашата, с висока млечност и груба вълна, която се дължи на участие на овце от Churra клона (**Santos-Silva et al., 2008**). Според авторите в Португалия са налични 13 местни породи овце, но поради интензификацията на земеделието, започнала през втората половина на 20 век силно намалява броят на овците в Португалия, и болшинството от местните породи овце понастоящем са застрашени от изчезване. Овците в Португалия са класифицирани според типа на вълната в 3 основни клона: Merino (финна вълна), Bosdaleiro (средна вълна) и Churra (груба вълна). Клонът Churra включва група породи грубовълнести овце, често използвани за мляко, разположени предимно в планинските райони в Северната част на страната. Понастоящем в Португалия са признати 6 местни породи овце от Churra клона, като броят на регистрираните овце – майки е относително нисък (от 2300 до 7000), с изключение на две породи (от 10000 до 27000), и устойчиво намалява през последните години. Било поради това, че продукцията от овците е в изобилие или защото те са изместени от импортни породи и техните кръстоски. Именно поради тези тенденции от близкото минало трябва да бъдат предприети мерки за съхранение, за да се избегнат бъдещите загуби и генната ерозия на разнообразието, представявано от местните породи (**Santos-Silva et al., 2008**). Авторите подчертават, че необходимостта от поддържане и подобряване на местните генетични ресурси са признати както на Европейско, така и на национално равнище и мерки за поддържане на породите в риск са дефинирани. Независимо от това поддържането на генетичното разнообразие във видовете домашни животни изисква адекватно реализиране на приоритети за съхранение и устойчиви програми за мениджмънт, които трябва да се базират на изчерпателна информация, относно структурата на популациите, включително източниците на генетично разнообразие между и вътре в породите (**Santos-Silva et al., 2008**). В този аспект авторите са изследвали 210 регистрирани животни от 6 местни грубовълнести породи и импортната Израелска порода (Assaf) по 25 микросателитни маркери. Алелните честоти, средният брой алели за локус, наблюдаваната (H_o) и очакваната (H_e) хетерозиготност в популациите, както и F статистиките по Райт (F_{it} , F_{is} и F_{st}) са изчислени със софтуера GENETIX 4.04. Информационното полиморфно съдържание (PIC) и вероятността за изключване на бащинство, когато и двата родители са известни са изчислени за локус посредством софтуера Cervus 2.0 (**Santos-Silva et al., 2008**). Отклонението от равновесие по Hardy-Weinberg е тествано посредством статистическия пакет GENEPOP 3.4.

Стандартните генетични дистанции по Nei са изчислени между породите и е конструирано филогенетичното дърво по методологията на „най-близките съседи“, посредством софтуера Population 1.2.28. Визуализацията на индивидуалните и популационни дендограми е реализирана със софтуера Tree View (**Santos-Silva et al., 2008**).

Генетичното родство между проучваните популации е изследвано посредством мултивариантния метод за анализ на съответствията чрез софтуера Genetix 4.04 (**Santos-Silva et al., 2008**).

Установени са общо 325 алели в изследваните 25 микросателитни локуси. Средният брой алели за местните португалски овце от Churva клона е 8 алели/локус, а за израелската порода 6.4 алели/локус. В десет от изследваните 25 локуси са намерени 17 уникални алели в проучваните популации. Като уникални алели се приемат тези алели, които присъстват само в една популация, с честотата не по-малка от 5%. Два локуса показват най-голям брой уникални алели – 7 в израелската и 4 в местната порода Algaria (Santos-Silva et al., 2008). Въз основа на изчислените стойности на PIC (за всеки локус) е намерено, че болшинството от маркерите са полиморфни.

Във всички изследвани породи са установени локуси, като не се подчиняват на равновесието по Hardy-Weinberg, което несъответствие най-общо се дължи на дефицита на хетерозиготи, с положителни оценки за F_{is} – статистиката, достоверна във всички породи (Santos-Silva et al., 2008). Авторите посочват, че оценките на F_{is} – статистиката са особено високи в две от изследваните местни породи, което най-вероятно отразява акумулирания инбрединг в тях. Изчислените оценки за F_{st} – статистиката са указание за ниско ниво на генетична диференциация между четирте местни португалски породи овце, когато от анализите се изключат импортна израелска и местната порода Algaria. Съответно най-големи генетични дистанции са установени между израелската порода и местните португалски овце от Churva клона, а най-близко генетично родство е установено между две двойки местни породи овце. Тези резултати авторите потвърждават и с дендограмата на филогенетичното дърво, като метод за визуализиране на генетичното родство между популациите.

Обсъждайки получените резултати в това изследване Santos-Silva et al. (2008) правят извода, че генетичното разнообразие, количествено оценено посредством изследваните 25 микросателитни маркери, показва малка диференциация между изследваните португалски Churra породи овце. Авторите подчертават, че главен принос за междупородното разнообразие има импортната израелска порода. Но като се изключи от анализите местната южна порода Algaria, и се анализират само 4-те местни северни Churra породи, то нивото на породна диференциация между тях е екстремно ниско. Това близко генетично родство между тези популации вероятно е резултат от смесването между тях, географската близост, вероятен общ произход и развъждане предимно по морфологични признаци, съобразно стандарта на породата (Santos-Silva et al., 2008). Анализите на генетичните дистанции между породите, потвърдени от филогенетичната дендограма на породите, анализите за съответствие, както и наличието на 7 уникални алели са доказателство, че импортната израелска е най-дистанцирана от местните португалски овце. Този резултат е очакван и поради това, че израелската порода е внесена в последните години в Португалия и се предполага, че няма родство с местните породи овце (Santos-Silva et al., 2008).

В заключение изследователите посочват, че местните португалски породи овце представляват важен източник на генетично разнообразие, независимо от това, че нивото на диференциация сред близко разположените северни породи показва тенденция да бъде по-скоро ниско. За някои от анализиранияте породи равнището на наблюдавания понастоящем инбрединг поражда определени опасения, и се препоръчва подходящите стратегии за съхранение да включват компоненти, които имат за цел минимизиране на инбридинга, за да се избегнат загуби на генетично разнообразие в бъдеще.

ЛИТЕРАТУРА

1. Озеров, М. Ю., Н. С. Марзанов, М. Тапио, А. А. Бурабаев, Л. К. Марзанова, Х. А. Амерханов, Ю. Кантанен, 2008. Генетическите особености пород овец Казахстана по микросателитам. Доклады Российской академии сельскохозяйственных наук, №1, 40-43.
2. Alvarez, I., L. J. Royo, I. Fernandez, J. P. Gutierrez, E. Gomez, F. Goyache, 2004. Genetic relationships and admixture among sheep breeds from Northern Spain assessed using microsatellites. Journal of animal science, vol. 82, № 8, 2246-2252.
3. Arranz, J. J., Y. Bayon, F. San Primitivo, 2001. Genetic variation at microsatellite loci in Spanish sheep. Small Ruminant Research, vol. 39, issue 1, 3-10.

4. **Ceccobelli, S., E. Lasagna, V. Landi, A. M. Martinez, F. M. Sarti**, 2009. Genetic diversity and relationships among Italian Merion derived breeds assessed by microsatellites. *Ital. J. Anim. Sci.*, vol. 8, 83-85.
5. **Chen, R. J., Z. P. Yang, D. J. Ji, D. Y. Qu, Y. L. Li, Y. J. Mao, D. L. Huang**, 2009. Analysis of genetic polymorphism in six meat sheep breeds and genetic distances between them. *Czech. J. Anim. Sci.*, 54, 461-467.
6. **Cinkulov, M., M. Tapio, M. Ozerov, T. Kiselyova, N. Marzanov, I. Pihler, I. Olsaker, M. Vegara, J. Kantanen**, 2008. Genetic differentiation between the Old and New types of Serbian Tsigai sheep. *Genet. Sel. Evol.*, 40, 321-331.
7. **Dalvit, C., E. Sacca, M. Cassandro, M. Gervaso, E. Pastore, E. Piasentier**, 2008. Genetic diversity and variability in Alpine sheep breeds. *Small Ruminant Research*, voi. 80, issue 1-3, 45-51.
8. **Gizaw, S., H. Komen, J. J. Windig, O. Hanotte, J. A. M. van Arendonk**, 2008. Conservation priorities for Ethiopian sheep breeds combining threat status, breed merits and contributions to genetic diversity. *Genet. Sel. Evol.*, 40, 433-447.
9. **Kusza, S., E. Gyarmathy, J. Dubravaska, I. Nagy, A. Javor, S. Kukovics**, 2009. Study of genetic differences among Slovak Tsigai populations using microsatellite markers. *Czech. J. Anim. Sci.*, 54, 468-474.
10. **Li, J. Y., H. Chen, X. Y. Lan, X. J. Kong, L. J. Min**, 2008. Genetic diversity of five Chinese goat breeds assessed by microsatellite markers. *Czech. J. Anim. Sci.*, 53, 315-319.
11. **Ligda Ch., J Altarayrah, A. Georgoudis, the ECONOGENE Consortium**, 2009. Genetic analysis of Greek sheep breeds using microsatellite markers for setting conservation priorities. *Small Ruminant Research*, voi. 83, 42-48.
12. **Pedrosa, S., J-J Arranz, N. Brito, A. Molina, F. San Primitivo and Y. Bayon**. 2007. Mitochondrial diversity and the origin of Iberian Sheep. *Genet. Sel. Evol.*, 39; 91-103.
13. **Peter, C., G. Erhardt, G. Hewitt, S. Dalamitra, M. Bruford, T. Perez and the ECONOGENE Consortium**, 2005. Microsatellite markers reveal differentiation of Southeastern and Western European sheep breeds. *The role of Biotechnology. Villa Gualino, Turin, Italy – 5-7 March*.
14. **Peter, C., M. Bruford, T. Perez, S. Dalamitra, G. Hewitt, G. Erhardt and the ECONOGENE Consortium**, 2007. Genetic diversity and subdivision of 57 European and Middle-Eastern sheep breeds. *The role of Biotechnology. Villa Gualino, Turin, Italy – 5-7 March. Animal Genetics*, 38, 37-44.
15. **Rendo, F., M. Iriondo, B. M. Jugo, L. I. Mazon, A. Aguirre, A. Vicario, A. Estonba**, 2004. Tracking diversity and differentiation in six sheep breeds from the North Iberian Peninsula through DNA variation. *Small Ruminant Research*, voi. 52, issues 3, 195-202.
16. **Santos-Silva, F., R. S. Ivo, M. C. O. Sousa, M. I. Carolino, C. Ginja, L. T. Gama**, 2008. Assessing genetic diversity and differentiation in Portuguese coarse-wool sheep breeds with microsatellite markers. *Small Ruminant Research*, voi. 78, issues 1-3, 32-40.
17. **Uzun, M., B. Gutierrez-Gil, J. Arranz, F. San Primitivo, M. Saatci, M. Kaya, Y. Bayon**, 2006. Genetic relationships among Turkish sheep. *Genet. Sel. Evol.*, 38, 513-524.