ОБЗОРИ

ДНК МАРКЕРИ И ТЯХНОТО ПРИЛОЖЕНИЕ В ЖИВОТНОВЪДСТВОТО

ДЕЯНА ХРИСТОВА, ЦАНКО ЯБЛАНСКИ, *ЕЛЕНА ТОДОРОВСКА
Тракийски университет, Аграрен Факултет- Стара Загора
*АгроБиоИнститут- София

Традиционното генетично усъвършенстване на популациите селскостопански животни се базира основно на селекция по фенотипната проява на техните продуктивни признаци. В исторически аспект то е довело до създаване на консолидирани породи и популации, които понастоящем представляват основния генофонд в областта на животновъдството.

Съвременното развитие на молекулярната биология и биотехнологиите, заедно с биоинформатиката дадоха възможност за разкриване на нова генетична информация и използването й в методите на селекция. Секвенирането и картирането на генома при домашните животни позволява идентифициране на голям брой полиморфизми на ниво ДНК секвенции. Молекулните маркери са важен инструмент не само за определяне на идентичността на отделните индивиди, но и за характеризиране и рационално (ефективно) използване на генетичните ресурси, генетичното разнообразие и генофонда в популациите селскостопански животни както в глобален, така и в регионален мащаб.

Целта на този обзор е да илюстрира как учените и специалистите в областта на животновъдството могат да използват постиженията на функционалната геномика за осъвременяване на методите на селекция.

I. СЪЩНОСТ, КЛАСИФИКАЦИЯ И МЕТОДИ ЗА ИДЕНТИФИЦИРАНЕ НА ДНК ПОЛИМОРФИЗМИ И ИЗПОЛЗВАНЕТО ИМ КАТО МАРКЕРИ

ДНК маркерите представляват области от генома на даден вид, в чиято нуклеотидна последователност се наблюдава полиморфизъм. От гледна точка на молекулния механизъм, полиморфизмите на ДНК ниво включват: замяна на нуклеотиди или т.нар. единични нуклеотидни полиморфизми (*Single Nucleotide Polymorphisms - SNPs*), инсерции или делеции на нуклеотиди с дължина от 1 до няколко хиляди базови двойки *(indels)* вътре в даден локус, инверсии на ДНК сегмент и прегрупиране *(rearrangement)* на ДНК участък в съответния локус, включително тандемни повтори (*Variable Number of Tandem Repeats - VNTRs*) (**Liu and Cordes,** 2004). Съществуващите полиморфизми в генома на организмите позволяват те да бъдат използвани като маркери за идентификация и разграничаване на представителите на един и същ вид, а също и за породна и междувидова диференциация. Маркерите, свързани/скачени с конкретен признак могат да бъдат използвани за ранната му диагностика, а на базата на локализацията им върху определени

хромозоми да се построяват генетични карти. ДНК маркерите позволяват също да се изследват различията в експресията на отделните признаци в дадена фамилия (**Stein et al.,** 1996).

O'Brien (1991) групира молекулните маркери в 2 основни категории: маркери, получени на основата на полиморфизъм/и в гени с известни функции и маркери, произхождащи от геномни сегменти с неизвестна функция. Според тази класификация, към първата категория маркери се отнасят полиморфизъм по дължината на рестрикционните фрагменти (*Restriction Fragment Length Polymorphisms - RFLPs*). Маркерите от 2-ри тип могат да се групират, съответно в 2 класа: маркери, базирани на клониране/секвениране (*Clone/Sequence Based - CSB*) и маркери, основани на т.нар. генетичен отпечатък (*fingerprint - FP*). *CSB* маркерите изискват изолиране на амплифициран ДНК фрагмент и в повечето случаи точно определяне на неговата секвенция. Този клас маркери включват: *RFLPs*, микросателитни маркери или *SSRs* (*Simple Sequence Repeats* - прости повторени последователности), *STS* (*Sequence Tagged Sites* - къси ДНК секвенции). За разлика от тях, *FP* маркерите не изискват познаване на секвенцията на полиморфния ДНК участък или неговото амплифициране и изолиране. Към този клас маркери се отнасят: *RAPDs* (*Random Amplified Polymorphic DNAs* - случайно амплифицирани полиморфни ДНК фрагменти), Минисателити (*VNTRs - Variable Number of Tanden Repeats* – тандемни повтори с вариращ брой), *AFLPs* (*Amplified Fragment Length Polymorphisms* - полиморфизъм по дължината на амплифицираните фрагменти).

От гледна точка на информацията, която предоставят за даден локус ДНК маркерите могат да се групират в 3 основни категории: биалелни доминантни, като *RAPDs*, *AFLPs*; биалелни кодоминантни, например *RFLPs* и мултиалелни кодоминантни, каквито са *SSRs* (**Vignal,** 2002).

В еволюционен аспект според произхода, локализацията и механизма на предаване на генетичната информация в поколенията на животните **Sunnucks** (2000) диференцира молекулните маркери на: ядрени и митохондриални (мтДНК). Маркерите в ядрената ДНК представляват полиморфизми в нуклеотидната последователност в хомоложни места. В методологичен аспект те включват няколко основни групи.

1. *RFLP* маркери (Restriction Fragment Length Polymorphism - полиморфизмъм по дължината на рестрикционните фрагменти)

RFLP полиморфизмите представляват вариации в дължината и броя на рестрикционните фрагменти, дължащи се на унаследени изменения в ДНК нуклеотидните последователности, които създават или унищожават рестрикционното място (сайт) за определен ензим. *RFLP* полиморфизмите между организмите се дължат на еволюционни процеси: точкови мутации в областта на разпознаване на съответната рестриктаза, инсерции или делеции (*indels*) във вътрешността на участъка, ограничен от две рестриктазни области на разпознаване, неравен кросинговър и др. (**Dodgson et al.,** 1997). Основните предимства на тези маркерни системи е техният кодоминантен тип на унаследяване, позволяващ разграничаване на хетерозиготно от хомозиготно състояние на изследваната последователност в генома на диплоидния организъм. Други предимства на *RFLP* маркерите са стабилност в генома и възпроизводимост, което дава възможност за получаване на постоянни резултати, без оглед на времето и локализацията, както и тяхната селективна неутралност, обусловена от факта, че тези полиморфизми остават незасегнати от естествения и провеждащия се изкуствен отбор (**Mburu and Hanotte,** 2005).

Садърн блот-хибридизацията (т.н.*„Southern blotting"*) е стандартен метод за идентифициране на *RFLP* полиморфизмите и включва електрофоретично разделяне по молекулно тегло (дължина) на получените при рестрикцията фрагменти, последвано от пренасянето им върху нитроцелулоз-

на или найлонова мембрана. Идентифицирането на специфичните ДНК последователности се извършва посредством тяхното хибридизиране с радиоактивни или флуоресцентни сонди, представляващи комплементарен геномен или кДНК клон, а визуализацията им се отчита по метода на авторадиографията (**Southern,** 1979). Тази процедура позволява установяване единствено на два алела в даден локус и е изключително трудоемка за анализ на дългия и сложен геном на бозайниците, който е представен от около $3x10^9$ нуклеотида. От друга страна, близкородственото съешаване (инбридинг) при селскостопанските породи животни значително редуцира изследвания вариабилитет/полиморфизъм, което прави много от *RFLP* сайтовете неинформативни (**Montaldo and Meza-Herrera,** 1998). Основните недостатъци на описаната техниката са дългата и трудоемка методология и необходимостта от използване на голямо количество ДНК (5-10 μg) с високо качество, което отнема значителни средства и време. С откриването на полимеразната верижна реакция (*Polymerase Chain Reaction*, *PCR*) от д-р Кари Мъллис (**Mullis et al.,** 1986), конвенционалният *RFLP* анализ е изместен от *PCR-RFLP* технологията, известна още като *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. В случай на присъствие на разпознатия сайт, след разрязване със съответния ензим ще се генерират електрофоретично различен брой фрагменти със съответна дължина (**Beuzen et al.,** 2000). Основните предимства на алтернативната *CAPS* техника са изискване за минимално количество геномна ДНК и кратка, нетолкова трудоемка методология, без участие на ДНК сонди за хибридизация.

Въпреки по-ниското ниво на полиморфизъм в сравнение с други ДНК маркерни системи (*SSR и AFLP*) и гореспоменатите ограничения в методологичен аспект, *RFLP* маркерите успешно се прилагат за изследване на генетичните ресурси в животновъдството. След първоначалното им използване за картиране на човешкия геном (**Botstein et al.,** 1980) те са успешно приложени при различни животински видове, включително овце (**Montgomery et al.,** 1988), птици (**Bumstead and Palyga,** 1992) и др.

2. *AFLP* маркери (Amplified Fragment Length Polymorphisms - полиморфизъм по дължината на амплифицираните фрагменти)

AFLPs са доминантни, биалелни маркери от типа *"fingerprinting"*, позволяващи провеждане на по-обстоен геномен скриниг на ДНК полиморфизми (**Vos et al.,** 1995). В методологичен аспект това е една сравнително нова техника, която успешно съчетава използването на *PCR* и *RFLP* методите (**Savelkoul et al.,** 1999). За целта изследваната ДНК се рестрицира с два ензима, от които единият разпознава рядко срещащи се рестрикционни места (напр. *Eco*RI, *Pst*I, *Hind*III или *Apa*I) в генома, а другият – такива, с висока честота (напр. *Mse*I или *Taq*I). За животинските геноми при провеждане на *AFLP* анализ най-подходящи са ензимите *Eco*RI и *Taq*I, а броят на получените фрагменти обикновено варира от 50 до 100 за реакция. Към получените след рестрикция ДНК фрагменти с лепливи краища, се лигират съответни двуверижни олигонуклеотидни адаптори (линкери), след което се провежда двустъпков *PCR* (преселективна и селективна амплификация) със специфични праймери, чийто дизайн кореспондира на част от нуклеотидите в рестрикционното място и адаптора. Разделянето на *PCR* продуктите по молекулно тегло (дължина) се осъществява на 4-6% полиакриламиден гел, а получените ивици се визуализират чрез авторадиография или сребърно оцветяване. В по-съвременните варианти на методиката се използват флуоресцентно белязани праймери, като визуализирането се осъществява посредством детекция на автоматичен секвенатор.

Основното предимство на този тип маркерни системи е възможността за детекция на голям брой полиморфизми (над 100 в 1 *PCR* реакция), едновременно в различни геномни области, без да се изисква предварителна информация за тях. Въпреки високата информативност при *AFLP* метода съществува потенциален проблем, свързан с т.нар. *„fragment-size homoplasy"*, изразяващ се във факта, че различни локуси с еднаква дължина могат да продуцират фрагменти с идентични дължини, вследствие на което биха се получили отклонения в стойностите на алелните честоти. Последното е от особено значение при изследване на вътревидовото и междувидовото генетично разнообразие (**Caballero et al.,** 2008). Според **Gort et al.** (2006) този недостатък може да бъде разрешен чрез редуциране на броя на изследваните локуси или чрез оптимален подбор на праймерните комбинации за PCR.

Поради доминантния тип на унаследяване *AFLP* маркерите не са особено подходящи за проучване на вътрепородното разнообразие, но са високо информативни по отношение на изследване на връзките между различни породи на даден вид (**Ajmone-Marsan et al.,** 2002), както и на тези между близкородствени видове (**Buntjer et al.,** 2002). Въпреки някои недостатъци *AFLP* маркерите са широко използвани за генотипиране и картиране при редица породи селскостопански животни: говеда (**Negrini et al.,** 2007), свине (**SanCristobal et al.,** 2006), овце (**Fei et al.,** 2009), кози (**Ajmone-Marsan et al.,** 2001) и др.

3. *AAD* маркери (Arbitrary Amplified DNA - случайно амплифицирана ДНК)

Arbitrary Amplified DNA полиморфизмите представляват участъци от ДНК, които могат да бъдат амплифицирани без да е известна тяхната нуклеотидна последователност, поради което се отнасят към групата на *FP* маркерите. В литературата са описани 3 основни техники за амплифициране и детекция на *AAD*: *Random Amplified Polymorphic DNAs (RAPD)* (**Williams et al.,** 1990), *Arbitrary Primed PCR (AP-PCR)* (**Welsh and McClelland,** 1990) и *DNA Amplification Fingerprinting (DAF)* (**Caetano-Anolles et al.,** 1991). При *RAPD* метода се използват единични, къси по отношение на дължината праймери (8-10 нуклеотида) и сдвояването им с ДНК матрицата се извършва обикновено при ниски температури (37-40°C), което осигурява намножаване на голям брой локуси (над 20) едновременно в една *PCR* реакция. Амплифицираните продукти се разделят в агарозен гел, като се визуализират посредством оцветяване с етидиев бромид. Разработената за първи път при мишки *(Mus musculus) AP-PCR* технология използва праймери с голямо вариране в дължината (10-50 нуклеотида), а детекцията на фрагментите е осъществена с авторадиография. *DAF* техниката използва също единични праймери, с по-малка дължина (5-8 нуклеотида), но с висока концентрация. Разделянето на продуктите се извършва в полиакриламидни гелове, съчетани със сребърно оцветяване. Чрез прилагане на *DAF* протокол, при една *PCR* реакция могат да се продуцират около 40 маркера, поради което тази техника се счита за много по-рентабилна, в сравнение с *RAPD* (**Bentley and Bassam,** 1996).

Поради биалелната природа на *AAD* маркерите, отчитането на полиморфизмите, дължащи се на нуклеотидни замени се извършва в зависимост от наличие или отсъствие на фрагменти с определена дължина. При различия между ДНК-ите на анализираните индивиди по отношение на нуклеотидната последователност в областта на хибридизация на праймера с ДНК матрицата, в едни случаи ще протече *PCR*, а в други няма да се синтезират продукти. В случаи на инсерции или делеции (*indels)* е възможна поява на различия в дължината на амплифицираните фрагменти, което до голяма известна степен усложнява интерпретацията на резултатите. Наличието на къси инсерции или делеции в конкретен локус, продуциращи един и същ фрагмент но с различна дължина при два вида/породи позволяват идентифициране и на кодоминантни *AAD* маркери. Честотата им на срещаемост обаче е много по-ниска от тази на доминантните *AAD* маркери.

Предимство на *AAD* маркерите е, че не се изисква предварителна информация за нуклеотидната последователност на намножаваните ДНК области, но са критикувани по отношение на голямата чувствителност към условията на провеждането на PCR амплификацията и ниското ниво на възпроизводимост на резултатите. Поради доминантния тип на унаследяване на *AAD* полиморфизмите, в процеса на генотипиране не могат да бъдат разграничени хетерозиготните от хомозиготните по доминантния алел индивиди, което ограничава приложението на този вид маркерни системи.

От описаните *AAD* технологии, най-голямо приложение по отношение на изследване на на животинските геноми намират *Random Amplified Polymorphic DNA* маркерите. *RAPDs* са използвани интензивно за идентификация, картиране и анализ на генетичното разнообразие, включително и определяне на дистанции при редица селскостопански породи животни като говеда (**Yu et al.,** 2004), кози (**Li et al.,** 2006), овце (**Hentati et al.,** 2012).

4. Микросателитни маркери или *SSRs* (Simple Sequence Repeats – прости повторени последователности)

Открити през 1989 г. от Weber May, микросателитите известни още като *Short Tandem Repeats (STRs)* или *Simple Sequence Length Polymorphisms (SSLPs)* в последните години са най-популярните маркери за генетични изследвания в областта на животновъдството (**Civanova et al.,** 2006). Те представляват тандемни повторения на мотиви от 1 до 6 базови двойки (бд), повсеместно срещащи се в генома на висшите организми. Заедно с минисателитните последователности (повторения от мономери с дължина 11-60 бд.), *SSRs* се отнасят към категорията на т.нар. *Variable Number Tandem Repeats (VNTR)* или т.нар. *Hypervariable regions (HVR)*. Тандемните повторения могат да бъдат моно-, ди-, три-, тетрануклеотиди, но най-често са динуклеотиди, с повтарящ се около 10 пъти основен мотив (**Beaumont and Buford,** 1999). През последните години, редица изследвания показват скаченост на някои микросателитни локуси с кандидат гени за количествени признаци или т.нар. *Quantitative Trait Loci (QTLs)*. Така например, микросателитните маркери *BM1329* и *OarAE101,* които са тясно скачени с гена *Fecundity (FecB)*, локализиран на хромозома 6 в генома на овцете и с адитивен ефект върху плодовитостта, са използвани за индиректната му идентификация при различни породи овце (**Weimann et al.,** 2001).

Микросателитните маркери могат да бъдат идентифицирани по начин, подобен на *RFLP* метода, като за целта в качеството на хибридизационни сонди се използват олигонуклеотидни проби, представляващи повторени последователности (**Mburu and Hanotte,** 2005). По-често обаче се използват *Sequence Tagged Microsatellite Site (STMS)* маркери (**Beckmann et al.,** 1990). В този случай дизайнът на праймерите за *PCR* анализ се осъществява въз основа на нуклеотидната последователност на граничните области на повторението чрез секвениране на геномни или *Expressed Sequence Tags (EST)* клонове, съдържащи микросателитни повторени последователности. Отчитането на полиморфизма се основава на разликите в дължината на получените *PCR* продукти, което е резултат от различния брой повтори в съответния микросателитен локус. Разделянето на *PCR* продуктите най-често се извършва в денатуриращи полиакриламидни гелове с последващо сребърно оцветяване или чрез неденатуриращa полиакриламидна електрофореза, съчетана с оцветяване на гела с етидиев бромид. За постигане на по-висока разделителна способност и автоматизиране на процеса на детекция на микросателитните алели, се използва автоматичен секвенатор, по принципа на капилярна електрофореза. В този случай има възможност за осъществяване на мултиплексен *PCR*, с използване на няколко различни по цвят флуоресцентни багрила, а детекцията на микросателитните алели се постига без последваща обработка на гела. Въпреки оскъпената процедура, методът позволява едновременно анализиране на няколко ло-

куса, при използване на минимално количество ДНК проба (10-100 ng) за анализ, а алелните дължини могат да бъдат определени с висока степен на точност.

Редица автори посочват предимствата на *SSRs* пред останалите маркерните системи (**Erhardt and Weimann,** 2007). Тяхната висока степен на полиморфизъм, обусловена от способността да продуцират минимум 2 алела на локус (мултиалелност) е основното им предимство. При животните е констатирана седем пъти по-висока степен на полиморфизъм в *SSR* локусите, в сравнение с тези по дължината на рестрикционните фрагменти (*RFLPs*), което осигурява високо ниво на информативност. Други важни предимства са доброто покритие на автозомите и на половите хромозоми със *SSRs* и техния кодоминантен тип на унаследяване. Тъй като повечето микросателити са локализирани в некодиращите райони на гените, тези маркери се смятат за селективно неутрални, от което следва, че вариациите в тези локуси няма да бъдат повлияни от естествения или настоящия изкуствен отбор. По този начин микросателитните локуси предоставят безспорно информация за нивото на генетичното разнообразие в генома (**Jobling et al.,** 2004).

Все още скъпата понастоящем технология за детекция на полиморфизмите в микросателитните локуси е един от недостатъците на този тип маркерни системи (**Braun et al.,** 1997). Друг съществен недостатък на *SSR* маркерите е вероятността за детекция на т.нар. нулеви алели *(null-alleles),* дължащи се на мутации (нуклеотидни замени или къси инсерции/делеции) в ДНК последователността, съответстваща на един от праймерите за *PCR* амплификация, в резултат на което хетерозиготният генотип ще бъде идентифициран като хомозиготен, поради липса на амплификация на алел в единия родител (**Gallen et al.,** 1993). Не са изключени и дълги инсерции в микросателитния локус, които да доведат до амплификация на много по-дълги алели (>500-600 бд), чието отчитане на обикновените и автоматичните гелни и капилярни секвенатори е невъзможно. Въпреки посочените недостатъци, използването на микросателитните маркери се препоръчва от редица водещи организации като *Food and Agricultutal Organization* (**FAO,** 2005)*, International Society for Animal Genetics (ISAG)* и др. През последните години за генотипиране на селскостопанските животни се прилагат комерсиални търговски китове. Такива китове са налице за говеда и коне, което значително улеснява анализите по генотипиране. Въз основа на депозираните ДНК секвенции в базата данни е установена висока степен на консервативност между близкородствени видове бозайници, като говеда и овце, по отношение на динуклеотидните микросателитни повтори и ограничаващите ги ДНК участъци, което позволява използване на конструираните за един вид праймери в *SSR* анализи при друг вид (**Moore et al.,** 1991).

Микросателитите намират широко приложение в качеството на ДНК маркери в генетичните изследвани с оглед определяне на генетичната структура на популациите и оценка на генетичното разнообразие в рамките на и между породите, при редица селскостопански животни: говеда (**Hanotte et al.,** 2002; **Trung et al.,** 2007; **Kugonza et al.,** 2012; **Delgado et al.,** 2012), коне (**Botha,** 2001; **Giacomoni et al.,** 2008; **Conant et al.,** 2012), кози (**Chenyambuga,** 2002), овце (**Handley et al.,** 2007; **Altarayrah et al.,** 2007; **Hoda et al.,** 2009; **Kusza et al.,** 2010; **Tolone et al.,** 2012), свине (**Manea et al.,** 2009) и др. *SSR* маркерите се прилагат във животновъдството също за идентификация и доказване на произход *(„paternity testing"- тест за бащинство)* на животни, както и за установяване на филогенетични връзки и процеси, свързани с опитомяване и миграция на редица породи животни (**Ritz et al.,** 2000). Този тип маркерни системи успешно се прилагат и за построяване на генетични карти и *QTL* картиране (**Hiendleder et al.,** 2003). При овце са картирани над 1000 микросателитни маркера, а при говеда след първоначалното им откритие през 1990 до 2000 година са описани и картирани повече от 2000 такива (**Radko and Dunec,** 2002).

6. *SNP* маркери (Single Nucleotide Polymorphisms - единични нуклеотидни полиморфизми)

Single Nucleotide Polymorphisms (единични нуклеотидни полиморфизми) са вариации в отделни нуклеотиди, които не променят като цяло дължината на ДНК секвенцията в даден участък. Представляват единични нуклеотидни замени в дадена позиция от ДНК секвенцията, водещи до поява на различни алтернативни последователности от нуклеотиди (алели). Теоретично, всеки *SNP* сайт в даден локус може да продуцира най-много 4 алела, всеки от които съдържа съответно една от 4-те бази (А, Т, Ц и Г), но на практика експресията на повечето от тези маркери се ограничава само до един, от двата възможни алела (съответно съдържащи най-често една от двете пуринови А/Г или пиримидинови Ц/Т бази), което ги поставя в графата на биалелните маркери (**Liu and Cordes,** 2004). Една от причините за това при бозайници е ниската честота на нуклеотидните замени в оригиналните сайтове, която варира от 1×10^{-9} до 5×10^{-9} за нуклеотид/година. Очевидно е, че нивото на информативност (полиморфно информацинно съдържание - *PIC*) на *SNP* полиморфизмите не е толкова високо колкото това на микросателитните маркери, но то се компенсира от широкото им разпространение в генома на отделните организми. В генома на човека, те са представени с честота 1 на всеки 1000 бд. (**The International SNP Map Working Group,** 2001). Над 2 млн. (честота 1 на 2500) *SNP* маркери са идентифицирани при говеда (**Simianer,** 2007), а при птици - над 1000 (**Emara et al.,** 2003).

Голяма част от *SNP* маркерите са локализирани в некодиращи райони и по този начин не оказват директно влияние върху фенотипа на индивидите. Някои мутации в експресиращите се секвенции или райони, повлияващи генната експресия (промотори, енхансери) могат да индуцират промени в структурата на протеините. По този начин, *SNP* полиморфизмите, локализирани в кодиращи области на ДНК секвенцията пряко засягат функцията на гените и техните продукти – протеините, в резултат на което те могат да бъдат директно асоциирани с различна фенотипна проява по отношение на икономически важни признаци (**Stoneking,** 2001). Въпреки че много от *SNP* маркерите са локализирани в некодиращите райони без да повлияват клетъчните функции, в някои случаи те могат да са свързани с предиспозиция към дадено заболяване или да повлияят чувствителността към лекарствени средства, което определя приложението им във функционалната геномика (**White et al.,** 2001). Стабилната унаследяемост на единичните нуклеотидни замени в генома, обусловена от по-ниската честота на мутиране в сравнение със сателитната ДНК, позволява приложението им в дългосрочните селекционни програми в животновъдството. Освен това, някои недостатъци на тези маркери могат да бъдат компенсирани с прилагане на *SNP* чип технология (подобно на *DNA microarray* технологията, известна още като ДНК чип), включваща голям брой SNP маркери (**Werner et al.,** 2004). Понастоящем използваните комерсиални *SNP* чипове на фирма Illumina за генотипиране и асоциативно картиране при овце и говеда включват около 50 000 *SNP* маркери. Illumina платформата за генотипиране е използвана от консорциумите по секвениране на говеждия и овнешкия геном (Bovine and Sheep genome consortia) с цел събиране на данни за генотипните характеристики на различните породи говеда и овце на глобално ниво. Високоефективната платформа на Illumina е приложена за генотипиране на 576 животни от 21 породи говеда посредством *BovineSNP50* чип (**Matukumalli et al**., 2009). На основата на *OvineSNP50 Beadchip*, включващ около 50 000 *SNP* маркери, **Kijas et al**. (2012) генотипират 2 819 овце специализирани в различни направления, принадлежащи към 74 породи от различни континенти (Азия, Африка, Северна и Южна Америка, Европа и Австралия). Получените в това изследване резултати разкриват *SNP* полиморфизъм в над 90% от изследваните локуси, което е индикация за високо ниво на

генетично разнообразие в изследваните извадки, в сравнение с други породи животни, като кучета и говеда.

II. ПРИЛОЖЕНИЕ НА ДНК МАРКЕРИТЕ ЗА ОЦЕНКА И ХАРАКТЕРИЗИРАНЕ НА ГЕНЕТИЧНИТЕ РЕСУРСИ В ОБЛАСТТА НА ЖИВОТНОВЪДСТВОТО

В сравнение с останалите маркерни системи - морфологични, хромозомни и биохимични, ДНК маркерите притежават уникални генетични свойства и преимущества в методологичен аспект, което ги прави изключително полезни за молекулярно - генетичен анализ на животинския геном. Те имат добро геномно покритие и предимно кодоминантен тип на унаследяване. Мултиалелната им природа позволява детекция на над 70% хетерозиготност и като неповлияващи се от факторите на околната среда те не оказват плейотропен ефект върху признаците с икономически ефект (*QTL*). ДНК маркерите са атрактивни и от гледна точка на техните предимства в методологичен аспект: възможност на изолиране на геномна ДНК от различни биологични източници (кръв, тъкани, космени фоликули и др.) и дългосрочно съхраняване; провеждане на ДНК анализ на най-ранен етап, дори на ембрионален, без оглед на пола; възможност за автоматизация и колаборация между отделните лаборатории и др. (**Mitra et al.,** 1999). На базата на посочените свойства и предимства, ДНК маркерите намират приложение както във фундаменталните генетични изследвания, така и в изследвания с практическа насоченост чрез конвенционалните и трансгенни развъдни стратегии (**Erhardt and Weimann,** 2007).

Стойкова-Григорова и Цочева (2009) условно обобщават приложението на ДНК маркерите в 2 основни направления. Първото направление се отнася до анализиране и оценка на генетичното разнообразие между и в породите селскостопански животни, с цел съхранение на генетичните ресурси. Второто направление включва анализ на локуси на количествени признаци (*QTL*), с оглед идентифициране на кандидат гени чиято експресия е свързана с признаци за продуктивност и здравния статус на селскостопанските животни.

В обзора на **Gibson** (2003) са дискутирани възможностите за прилагане на интегрирана стратегия, включваща базираната на молекулните маркери информация за съхранение и използване на генетичните ресурси в животновъдството. В този аспект е разработена концепция, която се основава на първоначално използване на молекулярно-генетичната информация за определяне на генетичните дистанции между отделните породи, на базата на които да бъдат предприети мерки за съхранение на най-отдалечените в генетично отношение породи, притежаващи желаните генетични характеристики. В по-късните етапи на предложената стратегия са посочени възможностите за използване на ДНК маркерите за идентификация и картиране на локуси, асоциирани с количествени признаци и последващото им прилагане за ускорена селекция (*Marker Assisted Selection - MAS*).

ДНК маркерите успешно намират приложение и при съставяне на генетични карти- физични (хромозомни) и скачени *(„linkage")*. Генетичните карти на скачване се съставят на базата на популации, в които се проследява сегрегацията на определени гени/маркери, чиято точна локализация върху съответните хромозоми се определя въз основа на честотата на рекомбинация между гените от хомоложните хромозоми, протичаща по време на мейотичния кросинговър (**Bishop et al.,** 1995). Конструирането на генетични карти на скачване изисква идентифициране на полиморфни локуси, които притежават потенциал за сегрегиране в дадена популация и чиито най-често срещани алели обикновено са с честота по-малка от 0.95. За тази цел, първоначално са били използвани *RFLP* маркерите, но поради тяхното ниско ниво на полиморфизъм скоро са изместени от високополиморфните микросателитни маркери (**Botstein et al.,** 1980). *SSRs* са използвани първоначално за построяване на генетични карти при мишки (**Copeland et al.,** 1993) и човек (**Weber and May,** 1989). На базата на *SSR*

и *RFLP* маркери са съставени и докладвани генетични карти на скачване при някои породи домашни животни - свине (**Ellegren et al.,** 1994) и говеда (**Bishop et al.,** 1994). Първата генетична карта при овцете е построена на базата на 10 *RFLP* и *SSR* маркери, разпределени съответно в 4 скачени групи (**Crawford et al.,** 1992). По-обширна генетична карта при овцете е конструирана от *AgResearch International Mapping Flock (IMF)* Тя съдържа 246 маркера от всички 26 автозоми и покрива 2070 cM, т.е. приблизително 75% от техния геном (**Crawford et al.,** 1995). Към момента, на базата на високоинформативните ДНК маркери, генетичните карти са усъвършенствани и допълнени с нови маркери, като по този начин са създадени „второ и трето поколение" генетични карти с много по-широко геномно покритие (**Cockett et al**., 2001). В обзора на **Madox and Cockett** (2007) е представена осъвременена информация за генетичните карти при овце и кози *(Capra hircus)*. По отношение на актуалната 4.6 версия на генетичната карта при овце, авторите посочват, че само 44% от маркерите произхождат от генома на *Ovis aries*, останалите 52% са с произход *Bos taurus* и съответно една малка част- 4% принадлежат на вида *Capra hircus.* Авторите подчертават, че поради високата степен на консервативност при тези три вида, генетичните ресурси на *Bos taurus* предоставят изключително полезна информация при съставяне на скачените карти при овце и кози. В допълнение, голяма част от картираните микросателитни маркери за овце (51.4%) и кози (57%) произхождат от генома на *Bos taurus*. Въпреки идентичния хромозомен набор при кози и говеда, е установена по-висока степен на хомоложност между овце и кози, най-вече относно морфологията на Х хромозомата и големите автозоми - *OAR9/CH14*. Освен това, в сравнение с тези при говедата, нуклеотидните секвенции, съответстващи на кодиращите райони при овце и кози показват с 2% по-висока степен на консервативност, в резултат на което общите докладвани локуси, картирани на съответните хромозоми за двата вида са 218. За разлика от завършената геномна карта на овцете, докладваната генетична карта при козите е информативна само за 307 локуса, с геномно покритие 2737 cM, при това пълна информация е налице само за хромозома 27.

Съществен момент от концепцията за управление на генетичните ресурси, с цел тяхното опазване и рационално използване е оценката на генетичното разнообразие на базата на ДНК маркерите. Първоначалните изследвания на разнообразието при селскостопанските породи животни са основани на използването главно на биохимични маркери. След 2000 г. за характеризиране на породите, както и за определяне принадлежността на индивидите към определена порода, са използвани интензивно микросателитните ДНК вариации в техните геноми, поради което *SSR* анализът се посочва като стандартен метод за изследване на генетичното разнообразие в животновъдството (**Baumung et al.,** 2004). До момента на публикацията, в проучването на генетичното разнообразието при редица селскостопански породи животни, на базата на генетичните дистанции са взели участие 93 страни от цял свят с разработването на 87 изследователски проекта.

Подробен обзор върху приложението на ДНК маркерите като средство за проучване на разнообразието на генетичните ресурсите в областта на животновъдството е представен в част 4 от доклада на **FAO** (2007). В нея се обръща внимание на факта, че в резултат на усъвършенстване на технологиите за откриване на нови нуклеотидни полиморфизми и въвеждането на високоефективните методи за генопитиране на базата на *SNPs*, тези маркерни системи придобиват все-по-широко приложение като средство за проучване на генетичното разнообразие. На базата на 27 *SNP* маркери **Pariset et al.** (2011) са проучили генетичното разнообразие при 18 породи овце от различни страни в региона на Средиземноморския залив (Албания, Гърция и Италия), при което са установени значителни дистанции, в съответствие с географската изолация на отделните породи. В това изследване оценката на ДНК варирането е извършена както на ядрено така и на митохондриално ниво.

Информацията за генетичното разнообразие е от съществено значение за оптимизиране на

стратегиите за съхранение и рационалното използване на генетичните ресурси в България. Към настоящия момент в нашата страна са проведени изследвания, свързани с анализ на генетичното разнообразие само по отношение на 3 вида животни със стопанско значение. При оценка на генетичното вариране и определяне на популационната структура в извадка от 35 животни от породата Българско сиво говедо **Teneva et al.** (2005), на базата на идентифицираните общо 83 алела установяват високо ниво на генетична изменчивост по отношение на изследваните 11 микросателитни локуса. В следващо изследване **Teneva et al.** (2007) установяват високо ниво на вътрепородно вариране в анализираните *SSR* локуси при друга порода от вида *Bos taurus* - Родопско късорого говедо. При същата порода **Златарев и др.** (2008) са използвали 5 високополиморфни микросателитни маркера с цел генотипиране и идентификация на животните. В това проучване е акцентирано върху възможността на базата на получената молекулярно-генетична информация да бъде разработена селекционна програма за съставяне на случаен план и подбор на родителски двойки по най-отдалечените в генетично отношение животни, с цел избягване на инбридинг. *SSR* маркерите са успешно използвани за проучване на генетичното разнообразие и популационната структура на 7 местни (аборигенни) породи овце в България (**Hristova et al.,** 2012, in press). Изследванията в тази насока са първите съобщения за такъв род проучвания на българските генетични ресурси овце и имат за цел да спомогнат разработването на ефективна консервационна и развъдна стратегия. На базата на набор от 12 комерсиално налични микросателитни маркери са определени генетичните дистанции и при някои чистокръвни породи коне, отглеждани в България (**Barzev et al.,** 2010).

Макар и с по-ограничено приложение, *RFLP* маркерите също служат като важен инструмент за оценка на вътре и междупородното генетичното разнообразие. До 1995 г. са идентифицирани *RFLP* маркери, съответстващи на общо 86 локуса в генома на овце, като 54 от тях са картирани на 16 различни хромозоми (**Montgomery et al.,** 1995). На базата на 22 полиморфни маркера по дължина на рестрикционните ДНК фрагменти е проучено генетичното разнообразие при овце от породата Австралийско мерино (**Parsons et al.,** 1996). Комбинираното използване на 6 микросателитни и 2 *RFLP* маркера (асоциирани с локусите пролактин и β-лактоглобулин) е послужило като основа за проучване равнището на генетично вариране при 3 аборигенни породи овце от Чехия и Словакия **(Jandurovà et al.,** 2005).

По метода на рестрикционния анализ за откриване на единични нуклеотидни полиморфизми **Hristova** (2011) установява *SNPs* в алфа S1-казеиновия ген (*αS1CN*) при 90 животни от три местни породи овце – Каракачанска, Местна Карнобатска и Медно- червена шуменска. Основен акцент в изследването е поставен върху възможността полиморфизмът в този ген да бъде приложен като генетичен маркер в селекцията на животни с по-добри показатели по отношение на технологичните свойства и състава на овчето мляко. Потенциалната възможност за прилагане на мелатонин-рецепторния ген (*MTNR1A*) в маркерната селекция при овце, по отношение на извънсезонната заплодяемост е проучена от **Hristova et al.** (2012) при общо 204 животни от 4 местни породи овце - Софийска, Брезнишка, Местна старозагорска и Местна карнобатска. Генетичният профил на животните в този локус е определен с метода *PCR-RFLP.*

Към момента в нашата страна проучванията в областта на свиневъдството на базата на ДНК маркерите е извършено по отношение на 3 гена: рианодин рецепторен (ryanodine receptor ген, *RYR*), естроген рецепторен (*ESR*) и фукозилтрансферазен (fucosyltransferase*, FUT1*), с оглед повишаване ефективността на селекцията в това направление (**Стоянова и съавт.,** 2010; **Stoyanova,** 2009).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Последните няколко десетилетия са белязани от разработването на богата палитра от генетични маркери на основата на непрекъснато усъвършенстващите се технологични платформи за откриване на ДНК полиморфизми в геномите на различни видове организми, в това число и на селскостопанските животни. Непрекъснато разширяващите се познания относно връзката на молекулните маркери със специфични гени и фенотипа, който те определят е отправна точка за идентифициране на функционални маркери с потенциал за приложение в селекцията, основаваща се на маркери и повишаване на ефективността на развъдните програми в продуктивното животновъдство.

Понастоящем, въпреки широкото използване на ДНК маркерите в селекционните програми при селскостопанските животни в световен мащаб с оглед непрекъснато повишаване ефективността на развъдните програми – определяне на произход, детерминиране на вътре- и междупородни различия, картиране на гени, селекция, основана на маркери и др. В България все още този род изследвания са ограничени и изискват значителни човешки и материални ресурси. Създаването на интегрирана фенотипна, генетична и молекулярна бази данни за съществуващите породи селскостопански животни в национален мащаб ще позволи разработването на ефективна консервационна и развъдна стратегия за опазване и ефективно развитие на генетичните ресурси, представляващи изключително ценно национално богатство. Базираната на геномни маркери селекция е и основа за създаване на стратегия за устойчиво развитие на животновъдството в България и нейното ефективно включване в Европейските програми по опазване на генетичните ресурси, тяхното разнообразие и повишаване качеството на продуктите в животновъдството.

ЛИТЕРАТУРА

1. Златарев, С., Е. Тодоровска, А. Тенева, Ц. Оджакова, К. Митева., П. Христов и И. Механджийски, 2008. Приложение на генноспецифични молекулярни маркери при генотипирането и идентификацията на Родопското Късорого говедо. Животновъдни науки, XLV, 1, 25-29.

2. Стойкова-Григорова, Р. и К. Цочева, 2009. Приложение на някои молекулни маркери с оглед съхранението на генетичните ресурси при селскостопанските животни. Животновъдни науки, XLVI, 2, 73-81.

3. Стоянова, С., В. Дрбохлав, С. Методиев, С. Димитров, 2010. Генотипи по ESR и FUT1 локуси и показатели на семенната течност на нерези от породата Дунавска Бяла. Животновъдни науки, 4, 52-57.

4. Ajmone-Marsan, P., R. Negrini, P. Crepaldi, E. Milanesi, C. Gorni, A. Valentini, M. Cicogna, 2001. Assessing genetic diversity in Italian goat populations using AFLP markers. Animal Genetics, 32(5), 281-288.

5. Ajmone-Marsan, P., R. Negrini, E. Milanesi, R. Bozzi, I. J. Nijman, J. B. Buntjer, A. Valentini and J. A. Lenstra, 2002. Genetic distances within and across cattle breeds as indicated by biallelic AFLP markers. Animal Genetics, 33, 280–286.

6. Barzev, G., E. Zhelyazkov, V. Barzeva, D. Hristova, Zh. Sabev, 2010. Genetic diversity in Bulgarian Thoroughbred using microsatellite DNA markers. Agricultural Science and Technology, 2, 3, 116- 120.

7. Beaumont, M. A. and M. W. Bruford, 1999. Microsatellites in conservation genetics. In "Microsatellites: Evolution and Application", D.B. Goldstein and C. Schlotterer (eds.). Oxford University Press, New York, 165-183.

8. Beckmann, J. S. and M. Soller, 1990. Toward a unified approach to genetic mapping of eukaryotes based on sequence tagged microsatellite sites. Biotechnology (NY), 8(10), 930-932.
9. Bentleyp, S. and Bassam B. J, 1996. A robust DNA amplification fingerprinting system applied to analysis of genetic variation within *Fusarium oxysporum fsp cubense*. Journal of Phytopathology, 144, 207–213.
10. Bishop, M. D., G. A. Hawkins and C. L. Keefer, 1995. Use of DNA mabkersin animal selection. Theriogenology, 43, 61-70.
11. Bishop, M. D., S. M. Kappes, J. W. Keele, R. T. Stone, S. L. Sunde et al.,1994. A genetic linkage map for cattle. Genetics, 136, 619-639.
12. Botha, K., 2001. The genetic relationship of seven horse breeds in South Africa using DNA markers. MSc thesis, Department of Plant Sciences and Genetics, University of the Free State, Bloemfontein, South Africa.
13. Botstein, D., L.W. Raymond, M. Skolnick and W. D. Ronald, 1980. Construction of a Genetic Linkage Map in Man Using Restriction Fragment Length Polymorphisms. American Journal of Human Genetics, 32, 314-331.
14. Braun, A., D. P. Little, D. Reuter, B. Müller-mysok and H. Köster, 1997. Improved analysis of microsatellites using mass spectrometry. Genomics, 46, 18–23.
15. Buchanan, F.C., L. J. Adams, J. F. Littlejohn, J. F. Maddox and A. M. Crawford, 1994. Determination of evolutionary relationships among sheep breeds using microsatellites. Genomics, 22, 297-403.
16. Bumstead, N. and J. Palyga, 1992. A preliminary linkage map of the chicken genome. Genomics, 13, 690-697.
17. Buntjer, J. B., M. Otsen, I. J. Nijman, M. T. Kuiper and J. A. Lenstra, 2002. Phylogeny of bovine species based on AFLP fingerprinting. Heredity, 88, 46–51.
18. Caballero, A., H. Quesada and E. Rolàn-Alvarez, 2008. Impact of AFLP fragment size homoplasy on the estimation of population genetic diversity and the detection of selective loci. Genetics, 179, 539-554.
19. Caetano-Anolles, G., B. J. Bassam and P. M. Gresshoff, 1991. DNA amplification fingerprinting using very short arbitrary oligonucleotide primers. Biotechnology (NY), 9(6), 553–557.
20. Callen, D. F., D. A. Thompson, Y. Shen, H. A. Phillips, R. 1. Richards, J. C. Mulley and G. R. Sutherland, 1993. Incidence and Origin of "Null" Alleles in the (AC)n Microsatellite Markers. American Journal of Human Genetics, 52, 922-927.
21. Chenyambuga, S.W., 2002. Genetic characterization of indigenous goat populations of sub-Saharan Africa using microsatellite DNA markers. PhD Thesis, Department of Animal Science and Production, Sokoine University of Agriculture, Sokoine, Tanzania.
22. Civáňová, K., L. Putnová and J. Dvořák, 2006. Analysis of microsatellite set for biodiversity studies in horses. Acta Fytotechnica et zootechnica, 39-40.
23. Cockett, N. E., T. L. Shay and M. Smit, 2001.Analysis of the sheep genome. Physiological Genomics, 7, 69–78.
24. Copeland, N. G., N. A. Jenkinsd, D. J. Gilbert, T. Eppig, L. J. Maltias et al., 1993. A genetic linkage map of the mouse: current applications and future prospects. Science, 262, 57-66.
25. Crawforad, A. M ., G. W. Montgomery, T. M. Brown, P. A, Swakbrick, J. M. Penty et al., 1992. Linkage mapping of microsatellite loci on the ovine genome. Animal Genetics, 23 (Suppl.), 95.

26. Crawford, A. M., K. G. Dodds, C. A. Pierson, A. J. Ede, G. W. Montgomery, H. G. Garmonsway, A. E. Beattie, K. Davies, J. F. Maddox, S. W. Kappes, R. T. Stone, T. C. Nguyen, J. M.Penty, E. A Lord, J. E. Broom, J. Buitkamp, W. Schwaiger, J. T. Epplen, P. Matthew, M. E. Matthews, D. J., Hulme, K. J. Beh, R. A. McGraw and C. W. Beattie, 1995. An autosomal genetic linkage map of the sheep genome. Genetics, 140, 703–724.

27. Dodgson, J., H. Cheng and R. Okimoto, 1997. DNA Marker Technology: A Revolution in Animal Genetics Poultry Science, 76, 1108-1114.

28. Ellegren, H. 2004. Microsatellites: simple sequences with complex evolution. Nature Reviews Genetics, 5, 435-445.

29. Emara, M. G. and Kim H. 2003. Genetic Markers and their Application in Poultry Breeding. Poultry Science, 82, 952–957.

30. Erhardt, G. and C. Weimann. 2007. Use of molecular markers for evaluation of genetic diversity and in animal production. Arch.Latinoam.Prod.Anim, 15 (Supl.1), 63-66.

31. FAO, 2007. Molecular markers- a tool for exploring genetic diversity. Part 4: The state of the art in the management of animal genetic resources.The state of the world's animal genetic resources for food and agriculture, Rischkowsky, B. and D. Pilling (eds.), Rome, 359-379.

32. Fei, X., F. Yong, S. Ting and W. Jin-fu, 2009. Six Local Sheep Breeds AFLP Analysis of Genetic Diversity in Xinjiang. China Animal Husbandry and Veterinary Medicine,10 (abstract).

33. Gibson, J. P., 2003. Strategies for utilizing molecular markers for livestock genetic improvement in the developing world. In: Procceeding of international workshop on Marker Assisted Selection: A fast track to increase genetic gain in plant and animal breeding? 17-18 October, Turin, Italy,

34. Gort, G., W. J. Koopman and A. Stein, 2006. Fragment length distribution and collision probabilitirs for AFLP markers. Biometrics, 62, 1107-1115.

35. Hanotte, O., D. G. Bradley, J. W Ochieng, H. E. W. Verjee. and J. E. O. Rege, 2002. African Pastoralism: Genetic Imprints of Origins and Migrations. Science, 296, 336-339.

36. Hentati, H. E., M. B. Hamouda1 and A. Chriki, 2012. Genetic diversity of two Tunisian sheep breeds using random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis. African Journal of Biotechnology, 11(17), 4109-4115.

37. Hiendleder, S., H. Thomsen, N. Reinsch, J. Bennewitz, B. Leyhe-Horn, C. Looft, N. Xu, I. Medjugorac, I. Russ, C. Kühn, G.A. Brockmann, J. Blümel, B. Brenig, F. Reinhardt, R. Reents, G. Averdunk, M. Schwerin, M. Förster, E. Kalm and G. Erhardt, 2003. Mapping of QTL for body conformation and behaviour in cattle. J. Of Heredity, 94, 496-506

38. Jobling, M. A., M. E. Hurles, and C. Tyler-Smith 2004. Human Evolutionary Genetics: origins, peoples and disease. London/New York: Garland Science Publishing, 523.

39. Li, L., J. Zhang, J. Q. Zhu, S. Gu, Q. Sun, G. M. Zhou, C. X. Fu, Q. Li, L. Y. Chen, D. X. Li, S. J. Liu and Z. R. Yang, 2006. Genetic diversity of nine populations of the black goat (*Capra hircus*) in Sichuan, PR China. Zoological Science, 23, 229-234.

40. Liu, Z. J. and J. F. Cordes, 2004. DNA marker technologies and their applications in aquaculture genetics. Aquaculture, 238, 1 –37.

41. MacHugh, D. E., R. T. Loftus, D. G. Bradley, P. M Sharp and P. Gunningham, 1994. Microsatellite DNA variation within and among European cattle breeds. Proceeding of Royal Society, 256, 25-31.

42. Maddox, J. F., N. E. Cockett., 2007. An update on sheep and goat linkage maps and other genomic resources Small Ruminant Research, 70, 4–20.

43. Mburu, D. and Hanotte O., 2005. A practical approach to microsatellite genotyping with special reference to livestock population genetics. ILRI Biodiversity project A manual prepared for the IAEA/ ILRI training course on molecular characterisation of small ruminant genetic resources of Asia, October- December, ILRI, Nairobi, Kenya.
44. Mitra, A., B. R. Yadav Nazir, A. Ganai and C. R. Balakrishnan, 1999. Molecular markers and their applications in livestock improvement. Contents, 77, 8-15.
45. Montaldo, H. H. and C. A. Meza-Herrera, 1998. Use of molecular markers and major genes in the genetic improvement of livestock. Electronic Journal of Biotechnology, 1(2), ISSN: 0717-3458.
46. Montgomery, G. W., G. Hughes and D. F. Hill, 1988. Proceeding of New Zealand Society of Animal Production, 48, 171.
47. Moore, S.S., L. L. Sargeant, T. J. King, J. S. Mattick, M. Georges, and G. J. Hetzel, 1991. The conservation of dinucleotide microsatellites among mammalian genomes allows the use of heterologous PCR primer pairs in closely related species. Genomics, 10, 654–660.
48. Mullis, K., F. Facoma, S. Scharf, R. Snikl, G. Horn and H. Erlish, 1986. Specific amplification of DNA in vitro: the poymerase chain reaction. Cold Sping Harbor Symposium Quantitative Biology,51, 260.
49. Negrini, R., I. J. Nijman, E. Milanesi, K. Moazami-Goudarzi, J. L. Williams, S. Dunner, C. Rodellar, A. Valentini, D. G. Bradley, I. Olsaker, J. Kantanen, Ajmone-Marsan, J. A. Lenstra and European Cattle Genetic Diversity Consortium, 2007. Differentiation of European cattle by AFLP fingerprinting. Animal Genetics, 38, 60-66.
50. O'Brien, S. J., 1991. Molecular genome mapping: lessons and prospects. Current Opinion in Genetics and Development, 1, 105–111.
51. Pariset L., M. Mariotti, M. Gargani, S. Joost, R. Negrini, T. Perez, M. Bruford, P. Ajamon-Marsan and A. Valentini, 2011. Genetic diversity of sheep breeds from Albania, Greece and Italy by mitochondrial DNA and nuclear polymorphisms (SNPs). The Scientific World Journal, 11, 1641-1659.
52. Parsons, Y. M., Cooper, D. W., Piper, L. R., Parsons, Y. M. and D. W. Cooper, 1996. Genetic variation in Australian Merino sheep. Animal Genetics, 27: 223–228. (Abstract)
53. Radko, A., and M. Duniec, 2002. Analysis of polymorphism at 11 DNAmicrosatellite loci in Black- and White and Red and White cattle in Poland. Animal Science, 2, 1, 63-75.
54. Ritz, R. L., M. L. Glowatzki-Mullis, D. E. Machugh and C. Gaillard, 2000. Phylogenetic analysis of the tribe Bovini using microsatellites. Animal Genetics, 31, 178-185.
55. SanCristobal, M., C. Chevalet, C. S. Haley, R. Joosten, A.P. Rattink, B. Harlizius, M. A. Groenen, Y. Amigues, M. Y. Boscher, G. Russell, A. Law, R. Davoli, V. Russo, C. Desautes, L. Alderson, E. Fimland, M. Bagga, J. V. Delgado, J.L. Vega-Pla, A.M. Martinez, M. Ramos, P. Glodek, J. N. Meyer, G.C. Gandini, D. Matassino, G. S. Plastow, K. W. Siggens, G. Laval, A. L. Archibald, D. Milan, K. Hammond and R. Cardellino, 2006. Genetic diversity within and between European pig breeds using microsatellite markers. Animal Genetics, 37, 189–198.
56. Savelkoul, P. H. M., H. J. M. Aarts, J. DE Haas, L. Dijkshoorn, B. Duim, M. Otsen, J.L. W. Rademaker L. Schouls and J. A. Lenstra, 1999. Amplified-Fragment Length Polymorphism Analysis: the State of an Art. Journal of Clinical Microbiology, 3083–3091.
57. Simianer, H., 2007. Report of the ISAG/FAO advisory group on animal genetic diversity,1-6.
58. Southern, E. M., 1979. Gel electrophoresis of restriction fragments. Methods in Enzymology, 68, 152-176.
59. Stoneking, M. 2001. Single nucleotide polymorphisms: From the evolutionary past. Nature, 409, 821-822.

60. Teneva, A., E. Todorovska, N. Tyuflekchiev, A. Atanassov, S. Foteva, S. Ralcheva and S. Zlatarev, 2005. Molecular characterization of Bulgarian Livestock genetic resources I. Genetic diversity in Bulagrian Grey cattle as revealed by microsatellite markers. Biotechnology in Animal Husbandry, 21(5-6) ,35-41.
61. Teneva, A., E. Todorovska, N. Tyuflekchiev, A. Stella, P. Boettcher and I. Dimitrova, 2007. Molecular characterization of Bulgarian Livestock genetic resources II. Microsatellite variation within and among Bulgarian cattle breeds. Bulagrian Grey cattle as revealed by markers. Biotechnology in Animal Husbandry, 23(5-6), 227-242.
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. Vos, P., R. Hogers, M. Bleeker, M. Reijans, T. M. Van de Lee Hornes, A. Frijters, J. Pot J. Peleman and M. Kuiper, 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. Nucleic Acids Research, 23(21), 4407-1444.
64. Weber, J. L. and May P. E., 1989. Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. Animal Journal of Human Genetics, 44(3), 388-396.
65. Weimann, C., B. Leyhe-Horn, M. Gauly and Erhardt G., 2001. Suitability of microsatellites BM1329 and Oar A101 as markers for the introgression of FecB locus into different sheep breeds. Archiv Tierzucht, 44, 4, 435-440.
66. Welsh, J. and McClelland M., 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. Nucleic Acids Research, 18(24), 7213–7218.
67. Werner, F. A., G. Durtsewitz, F. A. Habermann, G. Thaller and W. Krämer, 2004. Detection and characterization of SNPs useful for identity control and parantage testing in major European dairy breeds. Animal Genetics, 35, 44-49.
68. White, P. S., P. Kwok, P. Oefner and A. J. Brookes, 2001. 3rd Int. Meeting on Single Nucleotide Polymorphism and Complex Genome Analysis: SNP's: 'Some Notable Progress'. European Journal of Human Genetics, 9, 316-318.
69. Williams, J.G., A. R. Kubelik, K.J. Livak, J.A. Rafalski and S.V. Tingey, 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acids Resesrch, 18(22), 6531–6535.
70. Yu, Y., L. S. Lian, J. K. Wen, X. W. Shi, F. X. Zhu, L. Nie and Y. P. Zhang, 2004. Genetic diversity and relationship of Yunnan native cattle breeds and introduced beef cattle breeds. Biochemical Genetics, 42, 1-9.
71. Hristova, D., 2011. Genetic polymorphism of alpha S1- casein gene in Bulgarian sheep breeds. Agricultural Science and Technology, 3, 1, 8-12.
72. Hristova, D., S. Georgieva, Ts. Yablanski, S. Tanchev, R. Slavov and G. Bonev, 2012. Genetic polymorphism of the melatonin receptor MT1 gene in four Bulgarian sheep breeds. Agricultural Science and Technology, 4, 3, 187-192.
73. Kijas, J. W., J. A. Lenstra, B. Hayes, S. Boitard, L. R. Porto Neto et al. 2012. Genome-Wide Analysis of the World's Sheep Breeds Reveals High Levels of Historic Mixture and Strong Recent Selection. PLoS Biology, 10(2), 1-14.
74. Hristova, D., E. Todorovska, Ts. Yablanski, D. Vassilev, E. Zhelyazkov, S. Metodiev, I. Popov, S. Bishop, 2012. Microsatellite based genetic diversity and population structure of seven Bulgarian indigenous sheep breeds. Archiv Tierzucht (in press).
75. Matukumalli, L. K., C. T. Lawley, R. D. Schnabel, J. F. Taylor, M. F. Allan et al., 2009. Development and Characterization of a High Density SNP Genotyping Assay for Cattle. Development and Characterization of a High Density SNP Genotyping Assay for Cattle PLoS ONE, 4(4), 1-13.

76. Altarayrah, A., C. Ligda, A. Georgoudis and the ECONOGENE Consortium, 2007. Investigation of the genetic diversity of Greek sheep breeds using microsattelite markers. Proc. 3rd Joint Meeting of the Network of Universities and Research Institutions of Animal Science of the South Eastern European Countries, Thessaloniki, Greece 10-12.
77. Hoda, A., Bytyqi, H., Dobi, P., Mehmeti, H., 2009. Genetic diversity of Bardhoda breed in Albania and Cosova analyzes by microsatellite markers. Research Journal of Agricultural Science, 41, 2.
78. Tolone, M., S. Mastrangelo, A. Rosa, B. Portolano, 2012. Genetic diversity and population structure of Sicilian sheep breeds using microsatellite markers. Small Ruminant Research, 102, 18-25.
79. Handley, L., K. Byrne, F. Santucci, S. Townsend, M. Taylor, M. Bruford and G. Hewitt, 2007. Genetic structure of European sheep breeds. Heredity, 1–12.
80. Kusza, S., D. Dimov, I. Nagy, Z. Bosze, A. Jávor, S. Kukovics, 2010. Microsatellite analysis to estimate genetic relationships among five bulgarian sheep breeds. Genetics and Molecular Biology, 33, 1, 51-56.
81. Delgado, J. V, A. M. Martínez, A. Acosta, L. A Alvarez, E. Armstrong, E. Camacho, J. Cañón, O. Cortés, S. Dunner, V. Landi, J. R. Marques, I. Martín-Burriel, O. R. Martínez, R. D. Martínez, L. Melucci, J. E. Muñoz, M. C. Penedo, A. Postiglioni, J. Quiróz, C. Rodellar, P. Sponenberg, O. Uffo, R. Ulloa-Arvizu, J. L. Vega-Pla J. L, A. Villalobos, D. Zambrano, P. Zaragoza, L. T. Gama, C. Ginja, 2012. Genetic characterization of Latin-American Creole cattle using microsatellite markers. Animal Genetics, 43(1), 2-10.
82. Kugonza, D. R., G. H. Kiwuwa, D. Mpairwe, H. Jianlin, M. Nabasirye, A. M. Okeyo and O. Hanotte, 2012. Accuracy of pastoralists' memory-based kinship assignment of Ankole cattle: a microsatellite DNA analysis. Journal of Animal Breedind and Genetics, 129, 30–40.
83. Trung, T., N., S. Genini, L. C. Bui1, P. Voegeli, G. Stranzinger, J. P. Renard, J. C. Maillard and B. X. Nguyen, 2007. Genomic conservation of cattle microsatellite loci in wild gaur (*Bos gaurus*) and current genetic status of this species in Vietnam. BMC Genetics, 8, 77, 1-8.
84. Conant, E. K., R. Juras, E. G. Cothran, 2012. A microsatellite analysis of five Colonial Spanish horse populations of the southeastern United States. Animal Genetics,43(1), 53-62.
85. Giacomoni, E. H., G. P. Fernández-Stolz1 and T. R. O. Freitas, 2008. Genetic diversity in the Pantaneiro horse breed assessed using microsatellite DNA markers. Genetics and Molecular Research, 7(1), 261-270
86. Manea, M. A., S. E. Georgescu, S. Kevorkian and M. Costache, 2009. Genetic diversity analyses of seven Romanian pig populations based on 10 Microsatellites Romanian Biotechnological Letters, 14, 6, 4827-4834.
87. 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.
88. Montgomery, W., J. M. 1995. Sheep linkage mapping: RFLP markers for comparative mapping studies. Animal genetics, 26, 4, 249-259.
89. Parsons, Y. M., D. W. Cooper, L. R. Piper, Y. M. Parsonsand and D. W. Cooper, 1996. Genetic variation in Australian Merino sheep. Animal Genetics, 27, 223–228.
90. Jandurovà, O. M., T. Kott, B. Kottova, V. Czernekova, M. Milerski, 2005. Genetic relationships among Sumava, Valachian and Improved Valachian sheep Small Ruminant Research, 57, 157–165.

DNA MARKERS AND THEIR APLICATION IN ANIMAL HUSBANDRY

*D. Hristova, Ts. Yablanski, *E. Todorovska*
Thrakia University, Faculty of Agriculture - Stara Zagora
**AgroBioInstitute – Sofia*

SUMMARY

The remarkable achievements in molecular biology and biotechnology as well as the development of high-throughput platforms for sequencing of human, other mammals and some livestock's genomes during the last 10 years have allowed the discovery of large number DNA polymorphisms that can be used as markers for studying the genetic base of the diversity at phenotype level. A special attention is given to the basic features of widely used DNA markers and their application in molecular genetic studies of economically important livestock such as genotype identification, assessment of genetic diversity and genetic structure of populations, pedigree determination, inbreeding, genetic drift, mapping of QTLs for traits of economic importance, etc. Herein is also discussed the possible application of DNA markers for characterization the genetic resources of the populations as a basis for the development and optimization of strategies for their conservation and rational use in breeding programs at both worldwide and national scale.

Key words: *polymorphism, DNA markers, livestock, breeding strategies*

e-mail: e.g.todorovska@gmail.com