

АГРАРЕН УНИВЕРСИТЕТ – ПЛОВДИВ
КАТЕДРА „ЖИВОТНОВЪДНИ НАУКИ“

ЯНКА ДЕНЕВА ИВАНОВА-МИХАЙЛОВА

**МОЛЕКУЛНИ МАРКЕРИ ЗА ГЕНОТИПИРАНЕ И ОЦЕНКА НА
ГЕНЕТИЧНИТЕ РЕСУРСИ ОТ МЕСТНИ ПОРОДИ ОВЦЕ В
БЪЛГАРИЯ**

ДИ С Е Р Т А Ц И Я

**ЗА ПРИСЪЖДАНЕ НА ОБРАЗОВАТЕЛНА И НАУЧНА СТЕПЕН
„ДОКТОР“**

**ПО НАУЧНА СПЕЦИАЛНОСТ: „РАЗВЪЖДАНЕ НА
СЕЛСКОСТОПАНСКИТЕ ЖИВОТНИ, БИОЛОГИЯ И
БИОТЕХНИКА НА РАЗМНОЖАВАНЕТО“**

НАУЧНИ РЪКОВОДИТЕЛИ

**ПРОФЕСОР Д-Р ВАСИЛ НИКОЛОВ
ПРОФЕСОР Д-Р ЕЛЕНА ТОДОРОВСКА**

ПЛОВДИВ

2022

Дисертационният труд е написан на 187 страници, от които 33 страници литературен преглед, 1 страница „Цел и задачи“, 11 страници „Материал и методи“, 79 страници „Резултати и обсъждане“, 3 страници „Заклучение“, 3 страници „Изводи“, 2 страници „Препоръки и Приноси“, 30 страници „Литература“ и 14 страници „Приложения“. Цитирани са 296 източника, от които 22 на кирилица и 274 на латиница. Материалът е онагледен с – 29 фигури и 22 таблици.

Трудът е обсъден на заседание на разширен катедрен съвет при катедра «Животновъдни науки» на Агрономически факултет на Аграрен университет – Пловдив, №, и насочен за защита.

Защитата на дисертационният труд ще се състои нагод. от часа вна Аграрен университет – Пловдив.

На заседание на Специализирано научно жури, назначено от Ректора на Аграрен университет – Пловдив със Заповед №РД-.....в състав:

Рецензенти:

Становища от:

Материалите по защитата са на разположение на сайта на Аграрен университет – Пловдив, www.au-plovdiv.bg и в библиотеката на Аграрен университет - Пловдив, гр. Пловдив, бул. „Менделеев“, 12.

Забележка: Използваната номерация на таблиците и фигурите в автореферата не отговаря на тази в дисертацията.

ВЪВЕДЕНИЕ

Българските местни породи са основа на овцевъдството в България и имат огромно значение както в породообразователния процес, така и като елемент на генетичното разнообразие при селскостопанските животни. Това са породи с висока устойчивост, приспособимост към местните условия, с важно историческо и културно значение за нашата страна.

Системни молекулярни изследвания, обхващащи по - голям брой породи в България не са правени. Отделни изследвания в тази насока са предпоставка за провеждане на по-задълбочено проучване на местните породи на геномно ниво, което е в съответствие с европейските (ЕААР) и световните (ФАО) директиви за съхранение на глобалното генетично разнообразие. Проучването ще даде не само по-ясна представа за генетично разнообразие при местните породи, но ще позволи и установяване на тяхната генетични обособеност.

1. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

Цел: Използване на микросателитни маркери за оценка на популационната структура и характеризиране на генетичното разнообразие на местни български породи овце.

Постигането на целта е осъществено чрез изпълнение на следните **задачи:**

1. Проучване на съвременното състояние на контролираните популации на местните автохтонни породи овце.
2. Оптимизиране на условията за провеждане на мултиплексна PCR амплификация на микросателитни локуси при овцете.
3. Генотипиране на местните породи овце с микросателитни маркери от препоръчителния списък на ISAG/FAO.
4. Проучване на полиморфизма в микросателитните локуси, генетичното разнообразие, нивото на инбридинг и варирането в изследваната автохтонна популация овце.
5. Проучване на полиморфизма в микросателитните локуси, генетичното разнообразие, нивото на инбридинг и варирането при изследваните породи.
6. Определяне на генетичните дистанции между местните автохтонни породи овце.
7. Проучване на генетичното разнообразие и нивото на инбридинг в изследваните стада.
8. Определяне на генетичната дистанция между стадата.
9. Определяне на генетичната структура на породите.

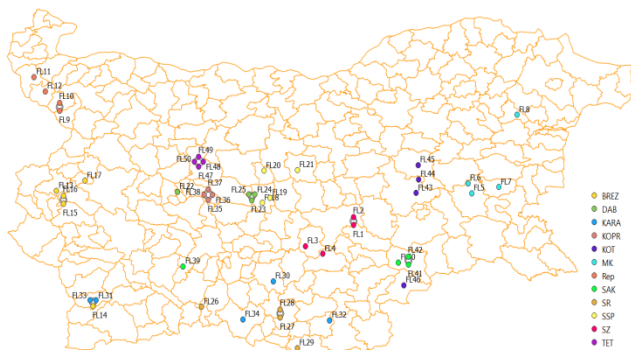
10. Определяне на фенотипните дистанции между породите, и връзката на фенотипни признаци с проучваните генетични маркери.

2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

За анализ на тенденциите на изменение и съвременното състояние на популациите на местните породи овце е проучена динамиката на контролираните популации за 13 годишен период – 2009-2021 г. Използвани са публични данни от отчетите на развъдните организации, анализи и отчети на ИАСРЖ, годишни отчети на Министерството на земеделието, информационните системи EFABIS и DAD-IS и др.

На основата на направения анализ на съвременното състояние и тенденции на изменение, степен на проучване, на географски принцип и по степен на застрашеност, за генотипиране са избрани 12 местни автохтонни породи: Местна Старозагорска /SZ/; Средностаропланинска /SSP/; Дъбенска /DAB/; Среднородопска /SR/; Тетевенска /TET/; Копревска /KOPR/; Каракачанска /KARA/; Местна Карнобатска /МК/; Реплянска /Rep/; Сакарска /САК/; Брезнишка /BREZ/; Котленска /КОТ/.

Генотипирани са общо 600 животни от 50 стада.



Фигура 2.. Географско разположение на стадата от проучваните породи.

На фиг. 2. е показано географското разположение на стадата.

Генотипирането е извършено с 15 микросателитни маркера (**D5S2, INRA5, MAF65, OarAE129, OarFCB11, INRA23, OarFCB20, McM527, CSRD247, HSC, MAF214, OarCP49, INRA63**), препоръчани от Организацията за прехрана и земеделие (FAO) и Международното общество за генетика на животните (ISAG)), въз основа на тяхното ниво на алелно разнообразие, според препоръките за използване за генотипиране и тестове за бащинство. С цел осигуряване на възможно по-

широк обхват, маркерите са селектирани така, че да покриват 20 от 54 -те хромозоми (*Ovis aries*. $2n = 54$), в резултат на което е постигнато геномно покритие в рамките на около 37 % от общия брой хромозоми.

Всички PCR реакции са проведени в обем 20 μ l, съдържащи 20 ng ДНК, 10 μ l 2x MyTaq HS микс (Bioline), 10 pmol от всеки праймер (F и R) и тип I ултрачиста вода до крайния обем на реакционната смес.

За амплификацията на 15-те локуса са използвани 4 мултиплекса както следва:

Мултиплекс А: D5S2(FAM), INRA5(VIC), MAF65(PET);

Мултиплекс В: OarAE129(PET), OarFCB0304 (VIC), OarFCB11(FAM);

Мултиплекс С: INRA23(PET), OarFCB20(FAM), SPS113(FAM), McM527(VIC);

Мултиплекс D: CSRD247(VIC), HSC(FAM), MAF214(PET), OarCP49(VIC)

Локус INRA63 е амплифициран самостоятелно при използване на безязан с FAM F праймер.

Анализът на амплифицираните ДНК фрагменти, кореспондиращи на различни микросателитни локуси е извършен на капиларен секвенатор ABI 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystem, USA). За определяне дължината на амплифицираните микросателитни алели е използван LIZ 500 (Applied Biosystem, USA) като вътрешен стандарт. Електроферограмите са анализирани със софтуера GeneMapper™ v4.0.

Определянето на алелните честоти, очакваната (H_e) и наблюдавана хетерозиготност (H_o), генетичната дистанция по Nei между породите, идентифицирането на редките алели, индексите на фиксация (F_{is} , F_{it} и F_{st}), генетичния поток (Nm), анализът на молекулната варианса (AMOVA), както и анализът на главните координати (Principle Coordinate Analysis (PCoA)) са извършени с помощта на софтуера GenAlEx v 6.50.

Полиморфното информационно съдържание (PIC) за всеки SSR маркер е определено с помощта на софтуера PowerMarker v 3.25.

Софтуерът Structure v 2.3.4 е използван за анализ на генетичната структура, където по отношение на родословието е избран модел на смесване на популациите (Admixture).

За клъстерен анализ на основата на фенотипни данни е използвана програмата FAMD 1.31.

За анализ на корелацията между данните за генетична дистанция при изследваните породи и дистанцията изчислена на основата на фенотипни данни е използван Мантел тест с помощта на GenAlEx v 6.50.

3. РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

3.1. СЪВРЕМЕННО СЪСТОЯНИЕ НА КОНТРОЛИРАНИТЕ ПОПУЛАЦИИ НА МЕСТНИТЕ АВТОХТОННИ ПОРОДИ ОВЦЕ

Основната цел на анализа на съвременното състояние на местните автохтонни породи овце е избор на породи за генотипиране.

Анализът показва, че през 2021 г., десет развъдни организации извършват развъдна дейност със 119 586 овце от 17 автохтонни породи.

От представените в табл. 3.1. 17 породи, 14 продължават да са застрашени, според действащата у нас Методика, в която са определени праговете на застрашеност на породите по видове, като за овците прагът е 11 000 женски животни под контрол на развъдните организации.

От табл. 3.1., в която са представени данните за контролираните популации на автохтонните породи по категории е видно, че три породи – Дъбенска, Каракачанска и Медночервена шуменска са над прага на застрашеност. Други, като Средностаропланинската, Среднородопската и Котленската са близко до излизане от границите на застрашеност.

Таблица 3.1. Разпределение на животните от контролираните популации на местните автохтонни породи по категории, за 2021 г., брой.

№	Порода	Стада	Общо животни	Мъжки	Женски	
					общо	в т. ч. майки
1	Местна Старозагорска	13	888	21	867	865
2	Бяла Маришка	12	836	26	810	807
3	Вакла Маришка	92	7721	298	7423	7392
4	Средностаропланинска	67	11268	319	10949	10899
5	Дъбенска	73	15266	436	14830	14791
6	Среднородопска	44	9389	234	9155	9144
7	Тетевенска	34	4564	153	4411	4399
8	Копривщенска	35	5063	120	4943	4941
9	Каракачанска	101	16614	480	16134	15977
10	Западностаропланинска	41	4656	166	4490	4459
11	Реплянска	30	4964	112	4852	4852
12	Сакарска	15	2467	99	2368	2347
13	Софийска /Елинпелинска/	75	6911	264	6647	6591
14	Брезнишка	11	2365	92	2273	2273
15	Медночервена шуменска	102	15764	345	15419	15292
16	Котленска	50	9238	217	9021	8979
17	Местна Карнобатска	8	1612	56	1556	1552
	Общо	910	138 895	3 907	134 988	134 204

3.2. ОПТИМИЗИРАНЕ НА УСЛОВИЯТА ЗА ПРОВЕЖДАНЕ НА МУЛТИПЛЕКСНА PCR АМПЛИФИКАЦИЯ НА МИКРОСАТЕЛИТНИ ЛОКУСИ ПРИ ОВЦЕТЕ

За оптимизиране условията на PCR, първоначално всички праймерни двойки са амплифицирани самостоятелно и анализирани на капилярнен секвенатор. Определени са оптималните температури на хибридизация за всяка праймерна двойка като на основата на получените резултати, включващи температура на хибридизация, размер на получените фрагменти и вида на флуоресцентното багрило са определени 4 групи от праймерни двойки за провеждане на мултиплексни реакции включващи:

Мултиплекс А: D5S2(FAM), INRA5(VIC), MAF65(PET);

Мултиплекс В: OarAE129(PET), OarFCB0304 (VIC), OarFCB11(FAM);

Мултиплекс С: INRA23(PET), OarFCB20(FAM), SPS113(FAM), McM527(VIC);

Мултиплекс D: CSRD247(VIC), HSC(FAM), MAF214(PET), OarCP49(VIC)

Температурната програма за **мултиплекси В и D** включва: 95 °C за 12 min, 31 цикъла от 95 °C за 20 sec, 63 °C за 1 min, 72 °C за 1 min, крайно удължаване 72 °C за 5 min. Температурната програма за **мултиплекс А и С** включва: 95 °C за 10 min, 31 цикъла от 95 °C за 30 sec, 55 °C за 30 sec, 72 °C за 1 min, крайно удължаване 72 °C за 5 min. Маркер **INRA 63** бе анализиран самостоятелно с използване на следната температурна програма: 95 °C за 12 min, 31 цикъла от 95 °C за 20 sec, 58 °C за 1 min, 72 °C за 1 min, крайно удължаване 72 °C за 5 min.

Последващите анализи на по-голям брой животни от анализираните популации потвърдиха добрата повторемост на резултатите и възможността за успешно прилагане на разработените мултиплекси за анализ на генетичното разнообразие и структура на изследваните популации. Изключение представляваха маркери OarFCB0304 и SPS0113, които показаха незадоволителни резултати по отношение на качеството на профила на PCR фрагментите или дължините на отчетените алели при анализа на голям брой проби, поради което не бяха включени в последващите анализи.

3.3. ПОЛИМОРФИЗЪМ В МИКРОСАТЕЛИТНИТЕ ЛОКУСИ, ГЕНЕТИЧНО РАЗНООБРАЗИЕ, ИНБРИДИНГ И ВАРИРАНЕ В ИЗСЛЕДВАНАТА ПОПУЛАЦИЯ ОВЦЕ

Въз основа на фрагментния анализ на амплифицираните PCR продукти при 600 овце от 12 автохтонни породи, е установен полиморфизъм във всички 13 автозомни микросателитни локуси (табл.

3.3.1). Идентифицирани са общо 228 алела, като броят им (Na) варира от 8 в локус D5S2 до 32 в локус OarCP49 със средно 17.54 алела/локус.

Таблица 3.3.1. Област на алелно вариране (Allele range), общ (Na) и ефективен брой алели (Ne), среден брой алели (Mn), хетерозиготност - наблюдавана (Ho) и очаквана (He), полиморфно информационно съдържане (PIC)

Локус	Област на алелно вариране (бд)	Na	Mn	Ne	Ho	He	PIC
D5S2	188-202	8	6.083	3.410	0.664	0.700	0.689
INRA5	116-152	15	10.333	6.148	0.745	0.818	0.855
MAF65	121-147	13	7.750	3.980	0.744	0.744	0.737
OarAE129	139-319	9	5.000	2.819	0.516	0.636	0.618
OarFCB11	118-146	15	8.917	5.518	0.805	0.811	0.827
INRA23	196-224	15	10.583	6.429	0.815	0.822	0.858
OarFCB20	88-118	16	11.000	6.611	0.824	0.841	0.858
McM527	161-248	12	8.167	5.170	0.802	0.798	0.808
CSR247	209-265	24	11.500	5.586	0.807	0.819	0.837
HSC	181-303	20	11.667	6.531	0.771	0.842	0.870
MAF214	165-275	24	11.167	3.979	0.722	0.714	0.732
OarCP49	72-140	32	15.333	6.438	0.837	0.833	0.864
INRA63	157-213	25	12.417	5.632	0.810	0.809	0.832
Средно		17,54	9.994	5.250	0.759	0.784	0.799
Общо		228					

Средният брой алели в локус (Mn) варира от 5 в локус OarAE129 до 15.333 в OarCP49 като в проведеното от нас изследване средният брой алели в 13-те локуса е 9.994.

Установеният в нашето изследване среден ефективен брой алели (Ne) е 5.25. Счита се, че ефективният брой алели/локус е друг важен индикатор за вътрепородното генетично разнообразие. Ефективният брой алели е броят на алелите в съответните локуси, които са представени с еднаква честота в отделните популации. Сравняването на броя на установените алели във всеки локус с ефективния брой алели, дава информация за преобладаването на определени алели във всяка порода или популация. В настоящето изследване честотите на алелите в един и същи локус варират в големи граници, поради което ефективният брой алели е по-нисък в сравнение с установения.

Очакваната хетерозиготност (He), която се счита за най-добрия критерий за нивото на генетично разнообразие в популацията варира от 0.636 в локус OarAE129 до 0.842 в локус HSC със средна стойност 0.784 за 13-те анализирани локуса. Не надвишава по стойност Ho, което е индикация за хетерозиготен дефицит. Отсъствие на хетерозиготен дефицит се наблюдава в 5 локуса, където стойностите на He и Ho са

еднакви (MAF65, INRA63, McM527) или He е по ниска от Ho (MAF214 и OarCP49).

Представените в табл. 3.3.1 резултати показват, че всички изследвани локуси са високо полиморфни, с което се потвърждава ефективността на използвания набор от SSR маркери за идентифициране на анализирани генотипове овце, включени в изследването. Полиморфното информационно съдържание (PIC) варира от 0.618 за маркера OarAE129 до 0.87 за HSC. PIC е висок и при INRA23 и OarFCB20 и OarCP49 със стойности съответно 0.858, 0.858 и 0.864. Средният PIC за 13-те микросателитни маркера е 0.799, като нито един маркер не показва стойност на PIC по-ниска от 0.618.

Средните стойности на индексите на фиксация в изследваните от нас локуси – Fis, Fit и Fst са съответно 0.034, 0.078 и 0.046 (табл. 3.3.2).

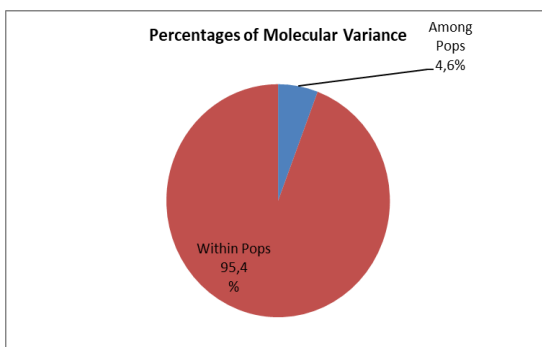
Коефициентът на инбридинг (Fis) е показател за тенденция към родствено съешаване между индивидите в дадена популация и се счита за основна причина за отклонението от равновесието на Харди-Вайнберг. Средната стойност на Fis в анализирани 13 локуса е 0.034 което показва ниско ниво на инбридинг в изследваната популация от 12 породи овце. Най-високо ниво на хетерозиготен дефицит се наблюдава в локус OarAE129 (Fis = 0.189 или 18.9%), а най-ниско в локус McM527, в който е установена отрицателна стойност (Fis = -0.005).

Таблица 3.3.2. F статистика в изследваните SSR локуси (Fis – вътрепопулационен коефициент на инбридинг, Fit – междупопулационен коефициент на инбридинг, Fst – коефициент на генетична диференциация) и поток на гени (Nm) в изследваните локуси.

Локус	Област на алено вариране (в бд)	Fis	Fit	Fst	Nm
D5S2	188-202	0.052	0.097	0.047	5.064
INRA5	116-152	0.089	0.142	0.058	4.076
MAF65	121-147	0.000	0.034	0.034	7.047
OarAE129	139-319	0.189	0.237	0.058	4.042
OarFCB11	118-146	0.008	0.050	0.042	5.747
INRA23	196-224	0.008	0.064	0.056	4.205
OarFCB20	88-118	0.021	0.055	0.035	6.931
McM527	161-248	-0.005	0.034	0.038	6.245
CSRD247	209-265	0.014	0.053	0.040	6.058
HSC	181-303	0.083	0.125	0.045	5.274
MAF214	165-275	-0.011	0.043	0.054	4.406
OarCP49	72-140	-0.004	0.044	0.048	4.951
INRA63	157-213	-0.001	0.044	0.045	5.292
Средно		0.034	0.078	0.046	5.334

Индексът на фиксиране на F_{it} , който измерва загубата на хетерозиготност на индивидите по отношение на общата популация е 0.078, което показва 8% общ дефицит на хетерозиготни индивиди в популацията на овцете. Средната стойност на F_{is} в настоящото изследване като цяло е по-ниска от тази на F_{st} ($0.034 < 0.046$), и е показател за отсъствие на хетерозиготен дефицит в изследваните локуси.

Коефициентът F_{st} , характеризира нивото на генетична диференциация между популациите, базиращо се на честотата на алелите в съответните микросателитни локуси и варира от 0 до 1. В настоящето изследване средната стойност на коефициента на генетична диференциация между популациите (F_{st}) е 0.046, което показва ниско ниво на генетична диференциация. Очевидно е, че общото генетично вариране се дължи предимно на различия между индивидите (95%) от изследваните популации (породи), т.е на вътрепородно генетично разнообразие и само 5% е резултат от различията между породите, т.нар. междупородно вариране (фиг. 3.3.). Тези резултати са ясна индикация за ниско ниво на генетична диференциация между изследваните породи.



Фигура 3.3. Генетично вариране между и вътре в анализираната популация овце в България, представена от 12 породи на основата на AMOVA анализ.

Сред основните причини за липса на ясна диференциация между изследваните национални автохтонни породи са географската близост между анализираните популации, сходните екологични условия и прилаганите развъдни практики, както и потокът на гени между тях в миналото, а вероятно и понастоящем.

Потокът на гени N_m (Number of migrants per population or gene flow) в настоящето изследване варира между 4.076 в локус *INRA5* до 6.931 в локус *OarFCB20* със средна стойност 5.334. Потокът на гени е показател за нивото на генетична диференциация на породите и отразява

процеса на миграция на гени от генофонда на една популация в друга в резултат на миграция и кръстосване.

3.4. ПОЛИМОРФИЗЪМ В МИКРОСАТЕЛИТНИТЕ ЛОКУСИ, ГЕНЕТИЧНО РАЗНООБРАЗИЕ, ИНБРИДИНГ И ВАРИРАНЕ ПРИ ИЗСЛЕДВАНИТЕ ПОРОДИ

В табл. 3.4. са представени резултатите за броя на идентифицираните алели в изследваните SSR локуси, средните стойности на общия (**Na**) и ефективен брой алели (**Ne**), наблюдаваната (**Ho**) и очакваната хетерозиготност (**He**), коефициентът на инбридинг (**Fis**) при проучваните породи.

Таблица 3.4. Общ и ефективен брой алели (Na и Ne), наблюдавана и очаквана хетерозиготност (Ho и He) и коефициент на инбридинг (Fis) в изследваните SSR локуси при проучваните породи.

Порода	Брой алели	Na	Ne	Ho	He	Fis
SZ	106	8.15	3.85	0.66	0.70	0.04
МК	82	6.31	3.80	0.74	0.72	-0.03
REP	140	10.77	5.65	0.78	0.81	0.04
BREZ	139	10.69	5.01	0.76	0.78	0.04
SSP	140	10.77	5.68	0.76	0.80	0.05
DAB	136	10.46	5.97	0.81	0.82	0.01
SR	135	10.38	5.76	0.81	0.81	0.00
KARA	125	9.62	5.00	0.71	0.78	0.10
KOPR	138	10.62	5.20	0.77	0.79	0.03
SAK	137	10.54	5.88	0.79	0.81	0.02
KOT	149	11.46	5.86	0.79	0.81	0.04
TET	132	10.15	5.34	0.73	0.78	0.07
Mean	129,92	9.99	5.25	0.76	0.78	0.03

Най-голям брой идентифицирани алели - 149 са констатирани при Котленската порода, а най-малък при Местната карнобатска. Средният брой на идентифицираните алели при проучваните породи е 129.92. Високите стойности на този параметър предполагат голямо аелно разнообразие, което най-вероятно е резултат от кръстосване или смесване на популациите.

Общият брой алели (Na) варира от 6.31 при Местната карнобатска овца до 11.46 при Котленска. Това е обяснимо, отчитайки еднородността и малкия брой на овцете от първата и значителното увеличаване на популационния размер, за кратък период от време при последната, което не изключва поставянето под контрол на нетипични животни или

кръстоски. Средният брой алели /порода е 9.99, което е показател за значително генетично разнообразие в породите. Ефективният брой алели (N_e) варира от 3.80 (Местна карнобатска) до 5.97 (Дъбенска). Средният ефективен брой алели в породите (N_e) е 5.25. В нашето изследване ефективният брой алели във всички стада е по-нисък в сравнение с установения.

Наблюдаваната хетерозиготност (H_o) варира от 0.66 (Старозагорска) до 0.81 (Дъбенска и Среднородопска), а очакваната (H_e) - от 0.70 (Старозагорска) до 0.82 (Дъбенска). Средните стойности на H_o и H_e са съответно 0.76 и 0.78, което показва високо ниво на хетерозиготност при породите, обект на проучването. При по-голяма част от тях, с изключение на Местна карнобатска, средните стойности на H_e не надвишават H_o , което е показател за хетерозиготен дефицит, но неговите нива са много ниски. Коефициентът на инбридинг (F_{is}) варира от - 0.03 (Местна карнобатска) до 0.1 (Каракачанска). Само в 2 породи коефициента на инбридинг е по-висок от 0.05 – Тетевенската и Каракачанската, докато при всички други, с изключение на Средностаропланинската, е по-нисък от 0.05. Получените стойности са показател, че съществува риск от повишаване на инбридинга само при първите две породи. Ако за Тетевенската порода подобна констатация може да се приеме като логична, тъй като всички стада са от района на Тетевен, за Каракачанската, със значителния ареал и размер на популацията, тя е малко вероятна. Причината, по-скоро може да се търси в по-продължителния и целенасочен отбор, по-скоро по отношение на типичността на екстериора в проучваните стада.

3.5. ХОМЕОСТАЗА НА ПОПУЛАЦИИТЕ (ТЕСТ ЗА РАВНОВЕСИЕ НА ХАРДИ - ВАЙНБЕРГ)

Тест за равновесие на Харди-Вайнберг е приложен за дванадесетте изследвани породи, по всички 13 микросателитни локуси. По 5 от локусите, част от породите не са в равновесие ($p=0$) - OarAE129 (Реплянска); McM527 (Тетевенска); CSRD247 (Котленска) OarCP49 (Брезнишка) и HSC (Тетевенска). При част от локусите, отклонения се наблюдават при всички породи (табл. 3.5). Най-голямо отклонение ($p<0.001$) е установено в 3 локуса: D5S2 (Реплянска и Дъбенска); INRA5 (Копривщенска); CSRD247 (Тетевенска), което се дължи на хетерозиготен дефицит. В три от локусите, в резултат на много ниските нива на хетерозиготен дефицит, част от породите се намират в равновесие ($p=1$) - McM527 (Котленска); MAF214 (Тетевенска, Старозагорска); OarCP49 (Тетевенска).

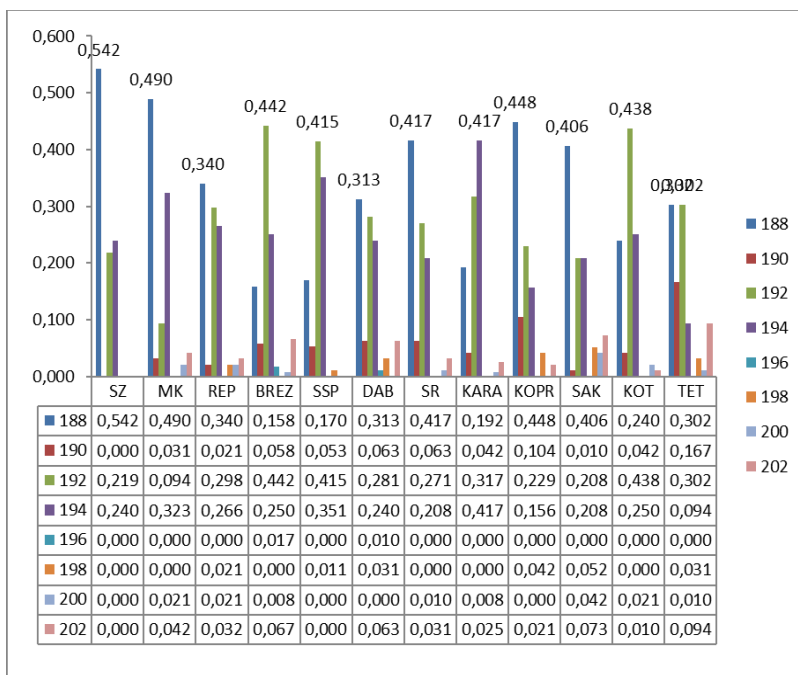
Таблица 3.5. Тест за равновесие на Харди - Вайнберг(HW) в анализираните локуси по породи

Локус Порода	D5S2	INRA5	MAF65	Oar AE129	Oar FCB1 1	INRA 23	Oar FCB20	McM52 7	CSRD 247	HSC	MAF 214	Oar CP49	INR A 63
SZ	0.118	0.026*	0.55	0.37	0.862	0.001***	0.017*	0.604	0.355	0.003**	1	0.759	0.522
MK	0.537	0.257	0.424	0.633	0.769	0.872	0.009**	0.105	0.859	0.988	0.195	0.177	0.392
REP	0.001***	0.032*	0.848	0***	0.302	0.739	0.564	0.657	0.789	0.009**	0.65	0.956	0.314
BREZ	0.427	0.157	0.488	0.555	0.035*	0.077	0.057	0.002**	0.446	0.971	0.227	0***	0.95
SSP	0.4	0.684	0.008**	0.999	0.756	0.015*	0.474	0.145	0.187	0.203	0.264	0.128	0.216
DAB	0.001***	0.819	0.952	0.109	0.9	0.634	0.343	0.635	0.985	0.011*	0.2	0.98	0.992
SR	0.598	0.83	0.215	0.002**	0.911	0.032*	0.086	0.393	0.898	0.433	0.966	0.521	0.341
KARA	0.052	0.004**	0.015*	0.005**	0.108	0.015*	0.346	0.071	0.979	0.855	0.248	0.723	0.267
KOPR	0.711	0.001***	0.002**	0.256	0.91	0.255	0.01**	0.741	0.703	0.078	0.177	0.013*	0.947
SAK	0.755	0.441	0.012*	0.615	0.522	0.397	0.871	0.947	0.825	0.946	0.017*	0.598	0.993
KOT	0.432	0.456	0.998	0.847	0.876	0.865	0.437	1	0***	0.427	0.834	0.999	0,393
TET	0.025*	0.618	0.982	0.424	0.625	0.667	0.731	0***	0.001***	0***	1	1	0,037

* P<0.05, ** P<0.01, *** P<0.001

3.6. ЧЕСТОТА НА АЛЕЛИТЕ В ИЗСЛЕДВАНИТЕ ЛОКУСИ

Установяването на честотата на алелите във всеки локус е в основата на изчисляване на генетичното разнообразие (He). Чрез този показател могат да се сравняват популации, при които броят и разпределението на алелите се различават, като варирането в честотата на отделните алели позволява използването им за оценка на генетичното разнообразие между отделните популации. Освен това, честотата на алелите в изследваните микросателитни локуси дава представа за нивото на информативност на използваните маркери.



Фигура 3.6. Честоти на алелите в локус **D5S2** по породи

От фигурата се вижда, че честотите на алелите в локус D5S2, при различните породи са твърде различни. При по-голямата част от проучваните породи с най- висока честота е алел 188 бд, като при Старозагорската порода стойността е най- висока (0.542). Със сходна стойност е честотата на този алел при Местната карнобатска порода (0.49), Копривщенската (0.448), Среднородопската (0.417) и Сакарската

(0.406), а най-ниска стойност е отчетена при Каракачанската порода (0.192).

Висока е честотата и на алели 192 бд и 194 бд, като първият е доминиращ при Брезнишката, Средностаропланинската и Котленската породи, а вторият при Каракачанската. Останалите 5 алела са със сравнително ниска честота. Те най-често се срещат в хетерозиготно състояние, при един или в минимална група от индивиди, при част от анализиранияте породи. Посочените 5 алела не са констатирани при Старозагорската порода, а при Средностаропланинската отсъстват 3 от тях (196-, 200- и 202 бд). При Местната карнобатска, Среднородопска и Котленска породи не се откриват алели 196- и 198 бд. От посочените алели, 190 бд е с по-висока честота при Копривщенската и Тетевенската овца, които се отглеждат в два съседни ареала от двете страни на Стара планина.

В по-голямата част от породите, макар и с по-ниска честота от порядъка на 0.021-0.094 се наблюдава и алел 202 бд, който не се открива в изследваните популации на Старозагорската и Средностаропланинската овца. При тези породи, както и при Дъбенската не е идентифициран и алел 200 бд.

Алел 198 бд се среща при половината от проучваните породи, а най-слабо разпространен е алел 196 бд, който е установен само при Брезнишката и Дъбенската породи, с ниска честота, съответно 0.017 и 0.010.

В посочения локус, най-ниско ниво на полиморфизъм се наблюдава при Старозагорската овца, в която се срещат само 3 от общо установените 8 алела. При 5 породи - Реплянска, Брезнишка, Дъбенска, Сакарска и Тетевенска са идентифицирани по 7 от 8-те алела в анализирания локус.

Данни за броят, разпределението и честотата на алелите са получени и анализирани за всеки от 13-те локуса, което показва, че те варират в отделните породи.

3.7. ПОПУЛАЦИОННО-СПЕЦИФИЧНИ АЛЕЛИ ПРИ ИЗСЛЕДВАНИТЕ ПОРОДИ

За популационно-специфични алели са приети всички алели с честота над 3% (0.03), които се срещат само в една порода.

Като такива могат да се отдиференцират следните алели:

- алел 147 бд в локус MAF65 с честота 0.031 (3.1%) при Реплянската порода, представен с различна честота в 2 от стадата;
- алел 146 бд в локус OarFCB11 с честота 0.083 (8.3%) при Реплянската порода, представен с различна честота в 3 от стадата;

- алел 243 бд в локус MAF214 с честота 0.033 (3.3%) при Брезнишката порода, открит с различна честота в 3 от стадата;
- алел 275 бд в локус MAF214 с честота 0.031 (3.1%) при Сакарската порода;
- алел 140 бд в локус OarCP49 с честота 0.031 (3.1%) при Средностаропланинската порода.

При направените проучвания са открити и специфични за всяка порода алели с честота между 1% и 3% (табл. 3.7.), отнесени като редки алели. Тези алели също допринасят за отдиференциране на породите, макар и в много малка степен и са причина за високото алелно разнообразие наблюдавано в тях. Такива са открити при Среднородопската овца в 3 локуса (OarFCB20, CSRD247 и INRA63), като в OarFCB20 локуса, алел 88 бд е открит в 2 стада с еднаква честота, а останалите редки алели са открити само в едно стадо. При Брезнишката порода е открит 1 алел с честота 0.025 в локус INRA63, а при Сакарската - 1 алел с честота 0.011 в локус INRA23.

Отчетени са алели с честота равна или под 1%, които спадат към групата на уникалните алели. От табл. 3.7. се вижда, че при Старозагорската овца са открити 5 уникални за породата алела в 3 локуса (OarAE129, MAF214 и OarCP49), всеки открит само в едно от 4-те стада, обект на изследване. При Реплянската порода е открит 1 уникален алел в 1 локус. При Брезнишката са открити 2 редки алела в 2 локуса, като алелът в локус MAF65 е открит в 2 стада с различна честота. Такива са и два от алелите в локуси OarFCB11 и HSC при Брезнишката овца, с честота под 1%, а при породата Средностаропланинска овца е открит 1 уникален алел в 1 локус (MAF214), представен само в едно стадо. Същата е ситуацията и при Дъбенската порода, при която е открит 1 уникален алел в 1 локус в едно стадо. При Среднородопската е открит 1 уникален алел в 1 локус (INRA5), а при Каракачанската порода са открити 2 уникални алела в 2 локуса в две стада, които са представени с една и съща честота. При Копривщенска овца е открит 1 уникален алел в 1 локус в едно от стадата, подобно на наблюдаваното за Сакарската породата. При породата Котленска овца са открити 4 уникални алела в 4 локуса, като всеки е открит само в едно стадо и всички алели са с една и съща честота. При породата Тетевенска овца са открити 2 уникални алели в 2 локуса, като всеки е открит само в едно стадо.

Прави впечатление, че нито един от редките или уникални алели не се открива във всички анализирани стада от дадена порода, поради което те не могат да бъдат отправна точка за идентифициране на породата, но са основния резервоар за повишаване на алелното (генетично) разнообразие.

Тъй като уникалните и редки алели водят до увеличаване на алелното разнообразие в популациите, то животните носители на тези алели могат да бъдат включени в развъдните програми за увеличаване на алелното разнообразие в съществуващия генофонд на породата.

Таблица. 3.7. Редки и уникални алели с честота <3% и <1%, съответно открити впределени локуси в анализираните породи

Порода	Локус	Алел	
		вбд	честота
SZ	OarAE129	174	0.010
	MAF214	165	0.010
	MAF214	251	0.010
	OarCP49	105	0.010
		138	0.010
REP	INRA63	181	0.010
BREZ	MAF65	121	0.025
	OarFCB11	118	0.008
	HSC	181	0.008
	INRA63	197	0.025
SSP	MAF214	241	0.010
KOPR	OarAE129	319	0.009
	OarCP49	72	0.008
		114	0.010

Порода	Локус	Алел	
		вбд	честота
SR	INRA5	122	0.010
	OarFCB20	88	0.021
	CSRD247	251	0.021
	INRA63	199	0.011
SAK	INRA23	196	0.011
	INRA63	175	0.010
KOT	INRA5	116	0.010
	McM527	248	0.010
	CSRD247	265	0.010
	INRA63	209	0.010
TET	CSRD247	223	0.010
	MAF214	205	0.010
DAB	INRA63	213	0.010

В допълнение, от представените в предходния подраздел фигури се вижда, че най-често срещаните алели (т.е. еволюционно най-старите) са представени с различна честота в отделните породи. Например, алел 187 бд в локус MAF214 се среща с най – висока честота (0.677) в Старозагорската порода. При 6 породи, в отделни локуси са открити алели с честоти по-високи от 0.5. При Старозагорската порода са открити алели с такава честота в 5 локуса - MAF214 (алел 187 бд, 0.677), OarAE129 (алел 139 бд, 0.615), INRA5 (алел 220 бд, 0.594), D5S2 (алел 188 бд, 0.542) и OarFCB11 (алел 136 бд, 0.531). В някои от посочените локуси както беше отбелязано, честотата на посочените алели при останалите породи е до 14 пъти по-ниска от тази при Старозагорската.

При Местната карнобатска овца, алели с честота над 0.5 са идентифицирани в два локуса - OarAE129 (алел 151 бд, 0.585) и MAF214 (алел 187 бд, 0.583). При останалите породи такива стойности са открити само в по един локус при Тетевенска в MAF214 (алел 187 бд, 0.635), Брезнишка в OarAE129 (алел 151 бд, 0.508), Каракачанска в OarAE129

(алел 151 бд, 0.578) и Средностаропланинската в MAF214 (алел 187 бд, 0.510).

Налице са и други основни алели, с честота по-ниска от 0.5, но чиито стойности също варират в широк диапазон в изследваните от нас породи и макар, че не спадат към популационно-специфичните алели, различията в честотата им между породите има отношение към тяхната диференциация.

Сред причините за появата на нови алели в определени породи и наличието на алели, представени с различна честота в тях са генетичния дрейф и потока на гени между популациите. Несъмнено при толкова много породи, разположени на толкова малка територия с ареали, които не само не са изолирани, но и географски са слабо диференцирани, през вековете е съществувал и съществува обмен на гени. Още повече, че всички наши породи се отнасят към два типа - на Цакела, Цигая или пък са техни кръстоски. По-важно е, че след проникване в новите популации, част от алелите се фиксират или се елиминират, техният брой се увеличава или намалява в породите в резултат на адаптиране към новите специфични еколого-географски условия, насоките на народната селекция, на специфичните подходи при отбора, размяната и използването на кочове и т.н.

В контекста на посоченото, независимо от установеното ниско ниво на генетична диференциация между изследваните местни автохтонни породи (5%), анализът на хетерозиготността на проучваните локуси, присъствието и отсъствието на отделни алели и алелни комбинации, различията в честотите на алелите, са доказателство за уникалността на всяка от проучваните породи и за необходимостта от нейното запазване и развъждане в чисто състояние.

Установеният голям брой алели с ниски честоти е изключително подходящ за проследяване на динамиката на генетичната структура на популацията и насоката на отбора – към елиминиране или фиксиране на уникалните алели, увеличаване или намаляване на генетичното разнообразие. Тази възможност се потвърждава и от направения сравнителен анализ на инбридинг и хетерозиготност на изследваните от нас породи и същите, проучени от други автори. Анализът показва, че през последните поне 10 години инбридингът при местните национални породи не нараства, като се отчита определено нарастване на хетерозиготността. Това вероятно се дължи на увеличаването на размерите на популациите и включването на нови стада под селекционен контрол, което дава възможност за по-ефективно прилагане на схемите за избягване на инбридинг.

3.8. ГЕНЕТИЧНА ДИФЕРЕНЦИЯ МЕЖДУ МЕСТНИТЕ АВТОХТОННИ ПОРОДИ ОВЦЕ

3.8.1. Сравнение на F_{st} между породите

За да се анализира степента на диференциация между изследваните породи са изчислени стойностите на F_{st} между всяка двойка породи. Стойностите на F_{st} и тяхната значимост са представени в табл. 3.8.1.

Най-високи са стойностите на F_{st} между Старозагорската и Каракачанската (0.065), Старозагорската и Местната карнобатска (0.063), Старозагорската и Реплянската (0.059) и Старозагорската и Каракачанската (0.056) породи. Стойности на F_{st} над 0.5 са установени и между Старозагорската и Котленската (0.053), Средностаропланинската (0.052) и Копривщенската (0.051) породи. Близки до тази стойност са тези между Старозагорската порода и останалите 4 проучвани породи - 0.048 със Сакарската и 0.049 - с останалите.

Достатъчно високи стойности на показателя, над 0.4 са получени и по отношение на Местната карнобатска порода, при сравняването ѝ с Брезнишката, Каракачанската, Копривщенската и Тетевенската.

F_{st} между останалите породи е по-ниска от 0.2, с изключение на няколко стойности между Тетевенската, Брезнишката, Дъбенската, Каракачанската и Сакарската породи. Най-ниски стойности на коефициента са отчетени при сравняване на Котленската с Каракачанската (0.010), Средностаропланинската (0.011) и Среднородопската породи (0.011).

Таблица 3.8.1. Сравнение на Fst (коэффициент на диференциация) между породите

Порода	SZ	МК	REP	BREZ	SSP	DAB	SR	KARA	KOPR	SAK	KOT
МК	0.063										
REP	0.059	0.037									
BREZ	0.049	0.040	0.017								
SSP	0.052	0.039	0.013	0.013							
DAB	0.049	0.036	0.012	0.014	0.013						
SR	0.049	0.034	0.012	0.015	0.012	0.012					
KARA	0.065	0.046	0.018	0.024	0.018	0.020	0.016				
KOPR	0.051	0.042	0.016	0.018	0.015	0.014	0.014	0.021			
SAK	0.048	0.034	0.016	0.020	0.016	0.015	0.013	0.023	0.018		
KOT	0.053	0.039	0.012	0.015	0.011	0.012	0.011	0.010	0.015	0.016	
TET	0.056	0.043	0.018	0.021	0.015	0.020	0.018	0.027	0.018	0.020	0,018

3.8.2. Генетични дистанции между породите

Изчисляването на генетичните дистанции между породите се използва за установяване на филогенетичните връзки между тях. Най-подходящият метод за изчисляване на генетичните дистанции е методът на Nei, тъй като при него се взема под внимание действието на основните еволюционни събития - мутации и генетичен дрейф.

В настоящото изследване са изчислени минималните генетични дистанции по Nei на база на получените резултати за честотите на алелите в изследваните 13 микросателитни локуси. Получените стойности на генетични дистанции са представени в табл. 3.8.2.

Отчетената висока стойност на генетични дистанции между Старозагорската порода и Каракачанската (0.437), Реплянската (0.412), Местната Карнобатска (0.362) и Тетевенската (0.362), е отражение на различията на ниво геном в изследваните микросателитни локуси, изразяващи се в различие в дължините на съответните алели, респ. в техните честоти.

В локус INRA63, основните различия между Старозагорската и другите четири породи – Местна карнобатска, Каракачанска, Реплянска и Тетевенска се откриват по отношение на алел 173 бд, чиято честота при Старозагорската (0.427) е значително по-висока в сравнение с тази при Местната Карнобатска (0.052), Каракачанската (0.121), Тетевенска породи (0.146) и Реплянска (0.042). Подобна тенденция се наблюдава и по отношение на алел 139 бд в локус OarAE129, където честотите при посочените породи са съответно 0.615, 0.223, 0.147, 0.042, 0.136. В локус INRA23, честотата на алел 220 бд е съответно 0.625 при Старозагорската порода, 0.294 при Местната карнобатска, 0.200 при Каракачанска, 0.146 при Тетевенската и 0,083 при Реплянската порода.

Значителни са генетичните дистанции и между Старозагорската порода и останалите породи - Средностаропланинска (0.325), Копривщенската (0.316), Дъбенската (0.316) Среднородопската (0.308), Сакарската (0.300) и Брежнишката (0.294).

Таблица 3.8.2. Генетични дистанции между породите по Nei

	SZ	MK	REP	BREZ	SSP	DAB	SR	KARA	KOPR	SAK	KOT
MK	0.362										
REP	0.412	0.233									
BREZ	0.294	0.257	0.108								
SSP	0.325	0.243	0.067	0.063							
DAB	0.316	0.229	0.068	0.078	0.071						
SR	0.308	0.209	0.066	0.090	0.062	0.065					
KARA	0.437	0.312	0.109	0.167	0.108	0.133	0.090				
KOPR	0.316	0.278	0.095	0.106	0.086	0.079	0.083	0.139			
SAK	0.300	0.202	0.102	0.130	0.094	0.098	0.075	0.162	0.114		
KOT	0.349	0.248	0.061	0.088	0.057	0.063	0.052	0.044	0.083	0.099	
TET	0.362	0.282	0.107	0.131	0.079	0.130	0.107	0.181	0.106	0.130	0.113

Високи стойности на генетичните дистанции, се наблюдават и между Местната карнобатска овца и Каракачанската (0.312), Тетевенската (0.282), и Копривщенска (0.278), а дистанцията между Местната карнобатска и останалите породи се движат между 0.257 и 0.202.

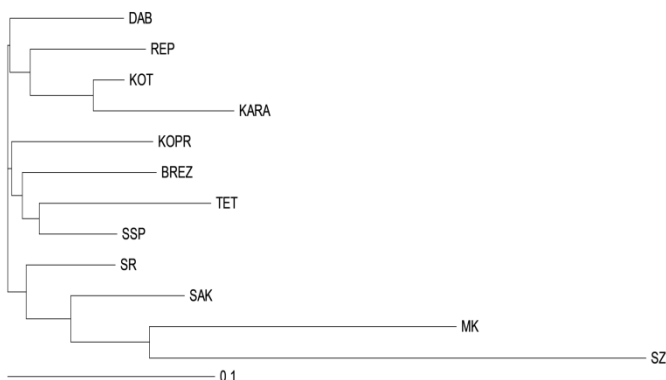
Значително по-ниски са стойностите на генетичните дистанции между останалите породи (<0.200), като най-ниски са между Котленската и Средностаропланинската (0.057), Среднородопската (0.052) и Каракачанската (0.044).

В основата на сравнително високите стойности на отчетените генетични дистанции между Старозагорската и посочените четири породи може да стоят различни причини - произход, насоки на селекцията, особеностите на агро- екологичните условия в ареалите на отглеждане и т.н.

3.8.3. Филогенетични връзки между породите

Родствените връзки между изследваните 12 породи могат да се визуализират графично чрез конструиране на филогенетично дърво – дендрограма. В нея отделните популации са групирани йерархично във фенони или т. нар. клъстери.

В настоящото изследване, дендрограмата е построена по метода „Най - близките съседи” (*Neighbor-Joining. NJ*), на базата на матрицата, представяща изчислените генетични дистанции (фиг. 3.8.3.).



Фигура 3.8.3. Дендрограма, отразяваща филогенетичните връзки между 12-те породи

Дендрограмата се състои от 3 основни клъстера. Първият включва 4 породи - Дъбенска, Реплянска, Котленска и Каракачанска породи, а вторият - Копривщенска, Брезнишка, Тетевенска и Средностаропланинска породи. Последният включва Среднородопска,

Сакарска, Местна карнобатска и Старозагорска породи. Генетично най-отдалечени са породите Старозагорска и Местна карнобатска, а най-сходни са Котленска и Каракачанска, а също и Тетевенска и Средностаропланинска породи.

Полученото от нас разпределение на породите в определени клъстери във филогенетичното дърво, в голяма степен е логично и в съответствие в известна степен и с географското разпределение на ареалите на обитание. В предходните раздели вече коментирахме близостта на ареалите на породите от „средния“ клъстер. Ареалите на Средностаропланинската и Тетевенската овца на практика се припокриват. Ареалите на Тетевенската и Копривщенската овца са на еднаква географска дължина, от двете страни на Стара планина, като между и около тях се отглеждат овце от Средностаропланинската порода. Между ареала на Копривщенската и Брезнишката овца е ареала на Елинпелинската, като двете последни породи са описвани като една и са отделени на по-късен исторически етап.

Съседни са и ареалите на породите от последния клъстер. На северозапад Сакарския регион граничи с ареала на Карнобатската и Старозагорската породи. В южностоящия регион между Сакарската и Родопската порода няма други местни породи.

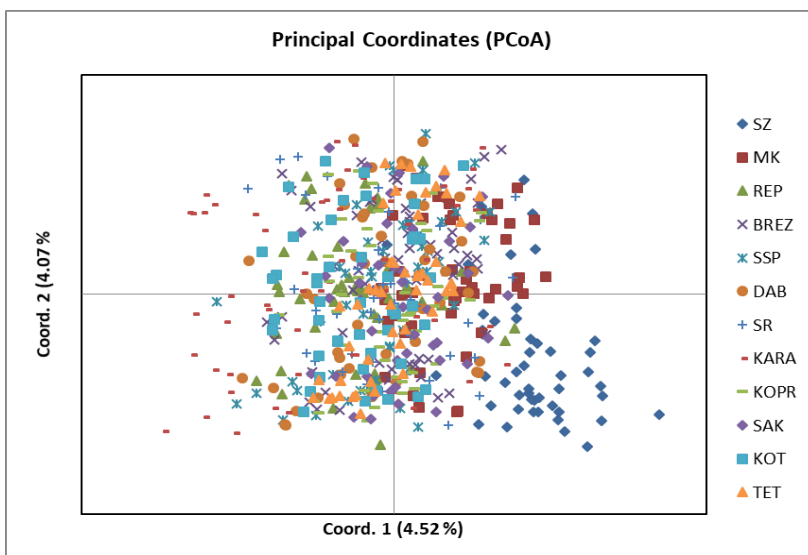
По трудно би могла да се обясни генетичната близост между породите от първия клъстер, въпреки, че на основа на краниометрични изследвания, Балевска и Петров (1972) определят Каракачанските, Карнобатските, Реплянските, Кулските, Панагюрските овце и Медночервената шуменска овца за **отродия с** общ произход от *Ovis ammon musimon* и че са типични български **Цакели**.

При три от породите в първи клъстер – Дъбенска, Каракачанска и Котленска, през последното десетилетие броят на животните нарасна многократно, като се измениха и ареалите на разпространение на породите. Не е изключено под селекционен контрол да са включени нетипични животни, както и кръстоски.

3.9. АНАЛИЗ НА ГЛАВНИТЕ КОМПОНЕНТИ (Принципен координатен анализ, РсоА).

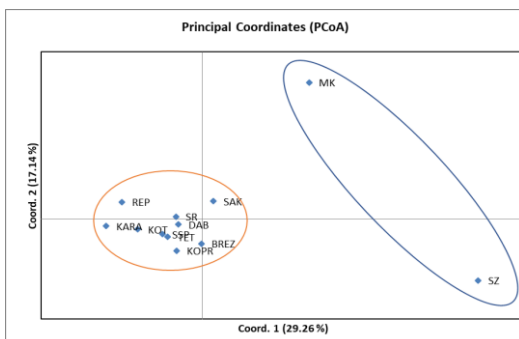
На основата на изчислените генетични дистанции, е извършен „Анализ на главните компоненти“, който потвърждава ясното отграничаване на индивидите от Старозагорската и Местната карнобатска порода. Наблюдаваната диференциация на тези породи, кореспондира с построената дендрограма. При останалите породи се наблюдава по-голямо или по-малко припокриване, на индивидите в координатната система. Прави впечатление, че индивидите от

Каракачанска порода, макар и в незначителна степен се открояват в разпределението си спрямо „района на смесване”. От получените данни от **PcoA** анализа, като най-информативни са първите 2 компоненти (фактори), които отговарят на 8.59 % от общото генетично вариране. Хоризонталната ос (*Axe1*) съответства на 4.52 % генетично вариране, като по този начин стадата от Старозагорската и Местната карнобатска порода се разграничават от другите популации и особено от Карнобатската порода. Вертикалната ос (*Axe2*) съответства на 4.07 % вариране и диференцира Местната карнобатска порода от Старозагорската порода.



Фигура 3.9.1. Анализ на главните компоненти (PcoA), извършен на основата на генетичните дистанции на Nei между 600 животни от 12 местни породи овце в България.

Анализът на главните компоненти (PcoA) на основа на генетичната дистанция по Nei между породите показан обяснява 46.40% от общото генетично вариране (фиг. 3.9.2.). Първата ос обяснява 29.26 % от общото вариране и отделя Старозагорската и Местната карнобатска порода от останалите. Втората ос, представляваща 17.14 % от общото вариране, показва отграничаването на Местната карнобатска от Старозагорската порода. Останалите 10 породи се групират заедно в отделен клъстер, тъй като не са ясно отграничени една от друга.



Фигура 3.9.2. Анализ на главните компоненти (РсоА), извършен на основата на генетичните дистанции на Nei при 12 породи.

3.10. ГЕНЕТИЧНО РАЗНООБРАЗИЕ И ИНБРИДИНГ И ГЕНЕТИЧНА ДИСТАНЦИЯ МЕЖДУ ИЗСЛЕДВАНИТЕ СТАДА

В табл. 3.10. са показани данни за общия (**Na**) и ефективния брой алели (**Ne**), наблюдаваната (**Ho**) и очакваната хетерозиготност (**He**), коефициентът на инбридинг (**Fis**) в изследваните SSR локуси по стада.

Таблица 3.10. Общ (Na) и ефективен брой алели (Ne), - наблюдавана (Ho) и очаквана (He), хетерозиготност, коефициент на инбридинг (Fis) при проучваните стада на местните автохтонни породи.

Стада/Порода	Na	Ne	Ho	He	Fis
FL1 - SZ	5.538	3.478	0.712	0.663	-0.088
FL2 - SZ	5.769	3.452	0.660	0.649	-0.026
FL3 - SZ	5.077	3.361	0.705	0.665	-0.047
FL4 - SZ	4.923	2.948	0.577	0.601	0.058
FL5 - MK	4.846	3.403	0.763	0.677	-0.131
FL6 - MK	5.462	3.791	0.776	0.719	-0.073
FL7 - MK	5.154	3.490	0.684	0.686	0.002
FL8 - MK	5.231	3.468	0.737	0.692	-0.070
FL9 - REP	6.385	3.789	0.730	0.707	-0.035
FL10 - REP	7.692	5.225	0.841	0.791	-0.060
FL11 - REP	6.308	3.986	0.755	0.720	-0.055
FL12 - REP	6.615	4.645	0.776	0.764	-0.011
FL13 - BREZ	5.846	3.778	0.763	0.699	-0.089
FL14 - BREZ	5.846	3.551	0.731	0.697	-0.042
FL15 - BREZ	6.538	3.877	0.788	0.711	-0.114
FL16 - BREZ	5.692	3.797	0.731	0.695	-0.049
FL17 - BREZ	7.385	4.809	0.771	0.777	0.009
FL18 - SSP	5.846	3.486	0.744	0.685	-0.076
FL19 - SSP	6.692	4.191	0.782	0.716	-0.102
FL20 - SSP	5.385	3.409	0.722	0.693	-0.035
FL21 - SSP	7.308	5.118	0.790	0.774	-0.014

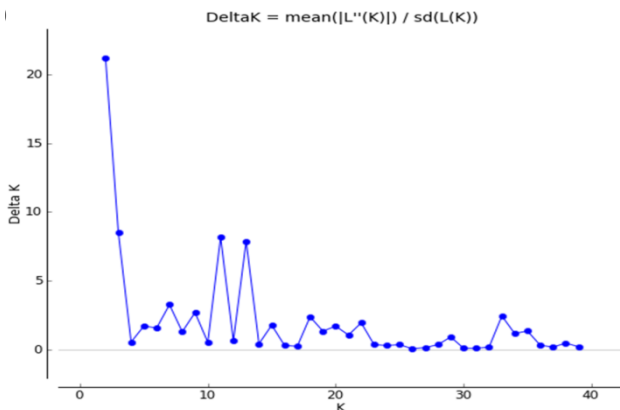
Таблица 3.10. (Продължение)

Стада/Порода	Na	Ne	Ho	He	Fis
FL22 - DAB	7.308	4.811	0.819	0.771	-0.057
FL23 - DAB	6.692	4.645	0.776	0.764	-0.008
FL24 - DAB	6.923	4.627	0.808	0.764	-0.059
FL25 - DAB	6.846	4.763	0.827	0.775	-0.067
FL26 - SR	6.846	4.576	0.829	0.755	-0.091
FL27 - SR	6.462	4.544	0.805	0.769	-0.044
FL28 - SR	6.077	4.117	0.814	0.734	-0.106
FL29 - SR	6.769	4.519	0.782	0.756	-0.033
FL30 - KARA	7.000	4.983	0.788	0.772	-0.020
FL31 - KARA	6.077	3.826	0.724	0.716	-0.010
FL32 - KARA	5.462	3.961	0.693	0.709	0.038
FL33 - KARA	3.692	2.452	0.552	0.522	-0.058
FL34 - KARA	6.000	4.244	0.786	0.739	-0.064
FL35 - KOPR	5.846	3.699	0.716	0.693	-0.025
FL36 - KOPR	6.692	4.640	0.764	0.766	0.002
FL37 - KOPR	7.308	4.802	0.811	0.772	-0.048
FL38 - KOPR	6.077	3.718	0.804	0.713	-0.124
FL39 - SAK	7.000	4.353	0.807	0.736	-0.102
FL40 - SAK	5.462	3.837	0.801	0.716	-0.127
FL41 - SAK	6.615	4.575	0.750	0.753	0.019
FL42 - SAK	6.615	4.892	0.814	0.786	-0.037
FL43 - KOT	7.385	4.835	0.750	0.768	0.034
FL44 - KOT	7.615	5.429	0.801	0.780	-0.020
FL45 - KOT	6.923	4.585	0.776	0.768	-0.013
FL46 - KOT	7.231	5.115	0.814	0.782	-0.042
FL47 - TET	5.615	3.722	0.692	0.705	0.016
FL48 - TET	6.077	3.550	0.660	0.689	0.046
FL49 - TET	6.692	4.324	0.756	0.739	-0.009
FL50 - TET	5.385	3.505	0.827	0.700	-0.179

В рамките на всяко стадо от изследваните породи са отчетени общия и ефективния брой алели, наблюдаваната и очакваната хетерозиготност и коефициентът на инбридинг. Сравнителният анализ показва, че общият брой алели (Na) варира от 3.692 в стадо FL33 (Каракачанска) до 7.692 в стадо FL10 (Реплянска), ефективният брой алели (Ne) - от 5.429 в стадо FL44 (Котленска) до 2.452 в стадо FL33 (Каракачанска), наблюдаваната хетерозиготност (Ho) варира от 0.829 в стадо FL26 (Среднородопска) до 0.522 в стадо 33 (Каракачанска), очакваната хетерозиготност (He) - от 0.791 в стадо FL 10 (Реплянска) до 0.601 в стадо FL4 (Старозагорска). Коефициентът на инбридинг (**Fis**) в почти всички стада с изключение на FL4, FL7, FL32, FL36, FL41, FL43, FL47 и FL48 е отрицателен, но дори и в изброените осем стада той е много нисък, което показва, че няма риск от инбридинг.

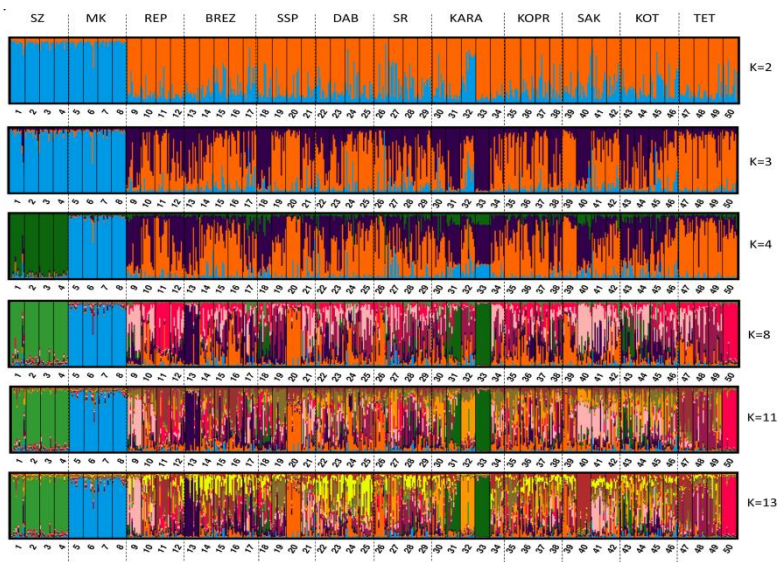
3.11. ГЕНЕТИЧНА СТРУКТУРА НА ПОРОДИТЕ

С помощта на програмата Structure v 2.3.4 е определена генетичната структура на популацията, представена от 50 стада от 12 – те изследвани породи. Използван е метода на Evanno за определяне на най-вероятния брой генетични клъстери. В резултат на прилагането му е установено, че най-вероятният брой клъстери са два, три, единадесет и тринадесет (K=2, K=3, K=11 и K=13) (фиг. 3.11.1.).



Фигура 3.11.1. Брой генетични клъстери в популацията овце, определени на основата на метода на Evanno et al. (2005).

Фигура 3.11.2. илюстрира генетичната структура при K=2, K=3, K=4, K=8, K=11 и K=13 на популацията от 600 животни овце от анализираниите 50 стада от 12-те породи. В графичното представяне на породите и съотнасящите се към тях стада всеки цвят представлява 1 клъстер, като дължината на всеки оцветен сегмент съответства на процента на принадлежност на всеки един от индивидите към съответен клъстер, черните линии отделят индивидите спадащи към всяко стадо, докато пунктираните вертикални линии отделят породите. При ниво на принадлежност на индивидите към съответен клъстер над 50% (0.500) се счита, че е налице процес на генетична диференциация.



Фигура 3.11.2. Генетичната структура при K=2, K=3, K=4, K=8, K=11 и K=13 на популацията от 600 животни овце от анализираните 50 стада на 12-те автохтонни породи.

При K=2, изследваната популация от 12 породи овце показва наличие на 2 основни клъстера (популации), първият, от които включва 10 от анализираните породи, а вторият - породите Старозагорска и Местна карнобатска, като процентът на принадлежност на индивидите от 10-породи към първия клъстер е висок и е показател за това, че тези породи имат общ предшественик и не са ясно отдиференцирани. Методът на Евано показва допълнителни по-ниски пикове, като най-високи измежду тях са отчетени при K=3 и K=11, следвани от K=13. Проведеното изследване е индикатор за наличие на субпопулации в рамките на установените 2 основни популации при K=2.

Както се вижда от фиг. 3.11.2., при K=4 се наблюдава процес на отделяне на двете породи - Старозагорската и Местната карнобатска във втората субпопулация, където % на принадлежност на породите към два различни подклъстера в рамките на втория клъстер е ясно изразено: съответно между 82 и 95.2% за стадата от Старозагорската и 90.8 и 96.6% за стадата на Местната карнобатска. В допълнение, стадата на двете породи, съответно FL1-FL4 и FL5-FL8 показват по-ясно изразена хомогенна вътрепородна структура за разлика от

останалите 10 породи, които попадат в първата популация при $K=2$, и чиято структура представлява смес от двете популации (кълъстери).

Подобни резултати бяха получени на основата на филогенетичния анализ и R_{soA} , базиращи се на генетичните дистанции, както е показано на фиг. 3.8.3. и фиг. 3.9.1 където също са наблюдавани 3 основни кълъстера.

Ниското ниво на генетична диференциация на породите с изключение на Старозагорската и Местната карнобатска, показва че фенотипните различия между изследваните породи не са съпроводени с драстични промени на генетично ниво, поне по отношение на изследваните локуси. Породите се характеризират с висока хетерогенност поради протекъл в миналото и отчасти понастоящем, генен поток в резултат на обмен на животни между породите, което е видно при $K=4$, $K=8$, $K=11$ и $K=13$, или на недостатъчно значителна дивергенция на субпопулациите от първоначален източник.

В рамките на няколко от породите попадащи в първата популация се наблюдава фрагментиране в резултат на географска изолация и/или използване на хетерозиготни кочове за разплод. Такъв е случая с Каракачанската порода, при която се наблюдават 2 субпопулации в рамките на породата. Две от стадата (FL31 и FL33) с ареал на разпространение с. Влахи и гр. Кресна, Благоевградско и две (FL30 и FL32) от района на Асеновград и Момчилград, се отдифенцират помежду си още при $K=8$. Това показва принадлежност на индивидите им към различни субкълъстери в рамките на породата, която е ясно изразена при $K=11$ и $K=13$. Стадото от района на Смолян (FL34) показва минимална принадлежност (1% и 0.098%) към субкълъстерите, които отдифенцират двете двойки стада на Каракачанската порода. Изглежда, че географската изолация в комбинация с провежданата целенасочена селекция е довела до редуциране на някои типични за Каракачанската порода алели в стада FL31 и FL33 и съответно до ясно изразената им генетична диференциация, поради високия % на принадлежност към един от субкълъстерите (55.1% за стадо FL31 и 92.8% за стадо FL33).

Индивидите от стадо FL20 от Средностаропланинската порода също се отдифенцират от останалите стада на породата, поради висок процент на принадлежност към един от субкълъстерите при нарастващо K ($K=8$, $K=11$ и $K=13$), съответно 84.4%, 80.0% и 77.4%. Подобна е ситуацията със стадо FL9 на Реплянската порода (65.4% при $K=13$) и стадо FL13 от с. Непразненци, Брезник на Брезнишката порода (75.9% при $K=13$), които се характеризират и с по-ясно изразена хомогенна структура в сравнение с останалите стада на двете породи.

Подобна е ситуацията и със стадо FL50 на Тетевенската порода, което също показва отдиференциране от останалите 3 стада на тази порода при $K=8$, със степен на принадлежност на индивидите към един от субкълстерите – 86.5%, като при $K=13$ тя дори е 87.8%. За разлика от стадо FL50, индивидите от стада FL48 и FL49 показват принадлежност 53% и 62.6%, съответно към друг субкълстер, а тези от стадо FL47 - към трети субкълстер с 55.1% принадлежност, което е още един пример за фрагментиране в рамките на породата, поради протичащи процеси на генетична диференциация.

Интересно е да се отбележи, че индивидите от някои стада от различни породи показват сходни % на принадлежност към съответни субкълстери. Наличието на сходство се определя от процента на споделеност на някои еволюционно стари алели поради произход от общ/и предшественик/ци, генетичен обмен и честотата им в тези породи, както и от действащите стратегии за развъждане.

Отдиференцирането на стадата, какъвто е случая със стада FL31 и FL32 и стада FL30 и FL33 на Каракачанската порода и стадо FL50 на Тетевенската порода, от останалите стада, може да се обясни с „ефекта на родоначалника (основателя)“ който се отнася до загуба на генетични вариации в резултат на отделяне на популация, състояща се от малък брой индивиди от една по-голяма популация. Поради загуба на генетични вариации (алели), присъстващи в по-голямата популация, най-често в резултат на географска изолация, новата популация може да стане различна, както в генетично, така и във фенотипно отношение, т.е., алелите в новосъздадената популация може да имат честоти различни от тези в оригиналната популация, а други - да бъдат изгубени. В този случай „ефекта на основателя“ може да доведе до поява на нова порода, поради факта, че „основателите“ на новата популация не репрезентират пълното генетично разнообразие присъщо на първоначалната популация/порода. Доколкото „ефекта на основателя“ важи за стада FL9 на Реплянска порода, FL13 на Брезнишка порода, FL31 и FL33 на Каракачанска порода и FL50 на Тетевенската порода, предстои да бъде установено в бъдещи анализи, включващи и други близко разположени стада от същата и други породи.

3.12. ФЕНОТИПНИ ДИСТАНЦИИ МЕЖДУ БЪЛГАРСКИТЕ АВТОХТОННИ ПОРОДИ ОВЦЕ. КОРЕЛАЦИЯ НА ФЕНОТИПНИТЕ ПРИЗНАЦИ С ГЕНЕТИЧНИТЕ МАРКЕРИ

3.12.1. Фенотипни дистанции между породите по коефициента на Nei-Li

Дистанциите между 12-те породи овце са изчислени на основата на 12 фенотипни признаци с помощта на коефициента на Nei-Li, както е описано в раздел Материал и методи.

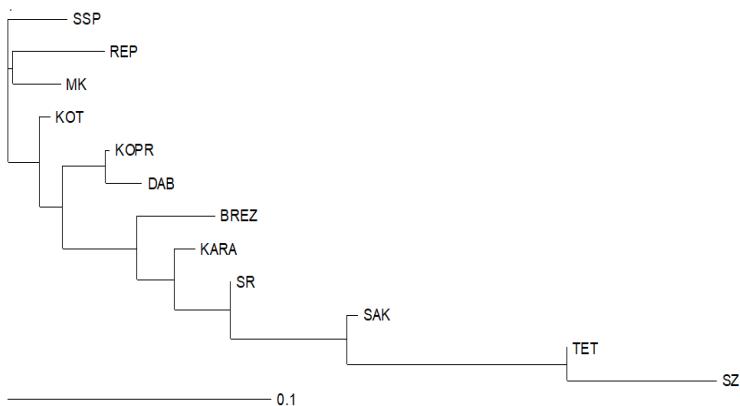
От табл. 3.12.1. се вижда, че най-големи са дистанциите между Старозагорската и следните три породи: Местна Карнобатска, Копривщенска и Котленска породи (0.4146) и между Старозагорска и Дъбенска породи (0.291). Най-голямо Фенотипното сходство е отчетено между Старозагорската и Тетевенската породи. Стойностите на дистанциите между останалите породи, с изключение на Копривщенска и Тетевенска са по-ниски от 0.29, като Местна карнобатска и Тетевенска, Дъбенска и Тетевенска и Котленска и Тетевенска се характеризират с еднаква стойност на фенотипни дистанции между тях (0.221). Дистанциите между останалите породи са със стойност по-малка от 0.221, което показва, че Старозагорската порода се отграничава по фенотипни признаци от останалите породи. Останалите породи са много близки по фенотип, като най-малки са дистанциите (0.016) между Копривщенска и Котленска и между Дъбенска и Копривщенска. Това се потвърждава и от конструираната, на основата на фенотипните признаци дендограма, както и от анализа на главните координати.

Таблица 3.12.1. Дистанции между 12-те породи овце на основата на 12 фенотипни признаци с помощта на коефициента на Nei-Li

SZ	MK	REP	BREZ	SSP	DAB	SR	KARA	KOPR	SAK	KOT	TET	
0.000												SZ
0.415	0.000											MK
0.171	0.053	0.000										REP
0.133	0.133	0.102	0.000									BREZ
0.179	0.041	0.061	0.109	0.000								SSP
0.291	0.076	0.102	0.053	0.083	0.000							DAB
0.161	0.062	0.104	0.062	0.088	0.062	0.000						SR
0.155	0.075	0.097	0.075	0.062	0.075	0.032	0.000					KARA
0.415	0.053	0.076	0.076	0.061	0.016	0.081	0.097	0.000				KOPR
0.133	0.133	0.171	0.076	0.179	0.133	0.028	0.075	0.171	0.000			SAK
0.415	0.034	0.053	0.076	0.041	0.034	0.062	0.075	0.016	0.133	0.000		KOT
0.034	0.221	0.171	0.133	0.109	0.221	0.104	0.124	0.291	0.076	0.221	0.000	TET

3.12.2. Фенотипни дистанции между породите по метода Neighbour-Joining.

Дендрограмата е построена по метода на „Най-близките съседи” (Neighbour-Joining. NJ) и отразява фенотипните дистанции между породите на основата на 12 фенотипни признаци.



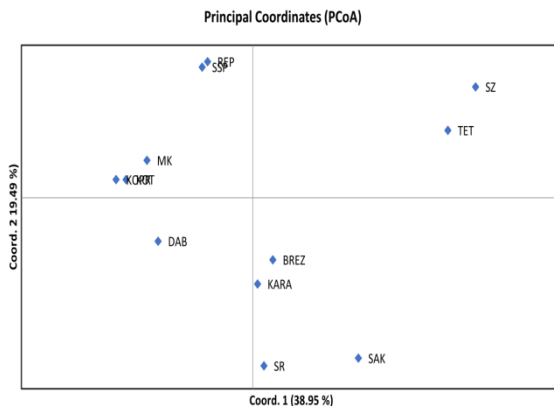
Фигура 3.12.2. Дендрограма, отразяваща дистанциите между породите на основата на отчетените фенотипни признаци.

Дендрограмата се състои от 2 основни клъстера, като породата Средностаропланинска, попада във външна група. Първият клъстер включва- Реплянска и Местна карнобатска породи. Вторият клъстер включва останалите 9 породи, като той се подразделя допълнително на два субклъстера. В първия субклъстер попадат Копривщенската и Дъбенската популации, които са фенотипно най-сходни. Във втория субклъстер попадат 6 породи, от които най-отдалечени са Старозагорската и Тетевенската.

3.12.3. Дистанции между породите на основата на анализ на главните компоненти (Принципен координатен анализ, PcoA)

Анализът на главните компоненти (PcoA) обяснява 58.44 % от общата вариация (фиг. 3.12.3.). Първата ос обяснява 38.95 % от общата вариация и отделя Брезнишка, Каракачанска, Среднородопска и Сакарска породи. Втората ос, представляваща 21.94 % от общата вариация, показва отграничаването на Старозагорската и Тетевенската породи. Останалите 6 породи се групират в самостоятелен клъстер, тъй като не са ясно отграничени една от друга – най-сходни са Реплянската

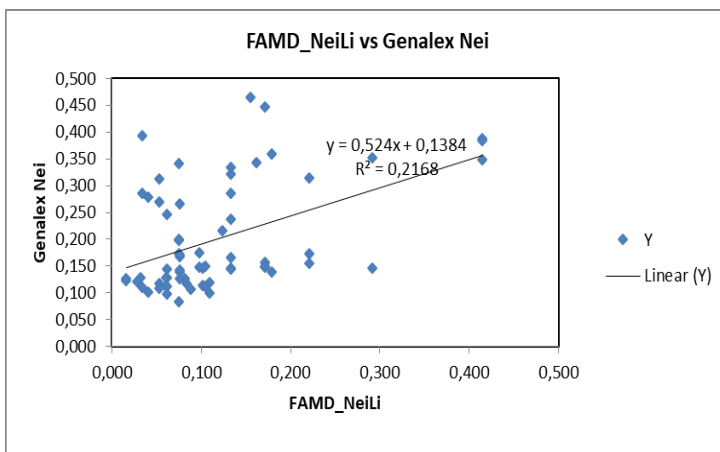
и Средностаропланинската, както и Копривщенска и Котленска породи.



Фигура 3.12.3. Анализ на главните компоненти (Принципен координатен анализ, PCoA). извършен на основата на фенотипни данни

3.12.4. Корелация между матрици, построени на база на генетичните и фенотипните дистанции

Проведен е корелационен анализ на основата на Мантел тест (Mantel, 1967) за установяване на връзка между генетичните и фенотипни данни за 12-те породи овце. Тестът на Mantel за корелация между матрици, построени на база генетични и фенотипни дистанции, както е описано в раздел Материали и методи е извършен с помощта на GenAlEx с цел определяне съществуването на корелация между данните за генетичната дистанция и дистанцията определена на основата на фенотипни признаци.



Фигура 3.12.4. Мантел тест за наличие на корелация между матриците за генетичните и фенотипни дистанции при изследваните породи. * R_{xy} = коефициент на корелация на теста на Мантел. $P(r_{xy}-rand \geq r_{xy}-data)$ = вероятност за положителна автокорелация.

Матриците, съответстващи на генетичните и фенотипни дистанции, изчислени за 12-те породи показват средно ниво на положителна, статистически значима корелация ($R_{xy}=0.466$, $p=0.03$). Това показва, че е налице корелация между някои от установените алели в анализирания 13 локуса с отчетените фенотипни признаци. Проведеното изследване индицира, че използвания набор от маркери е подходящ за комплексна оценка на генетичните ресурси от овце в България и бъдещо картиране на икономически важни QTLs на основата на асоциативно генотипиране.

ИЗВОДИ

Получените резултати от проведените микросателитни и фенотипни анализи при 12 местни породи овце в България, в рамките на дисертационния труд ни дават основание да формулираме следните изводи:

1. Въз основа на проведения фрагментен анализ е установен полиморфизъм във всички изследвани микросателитни локуси и са идентифицирани в популацията общо 228 алела, средно 17.54 алела на локус. При отделните породи са установени 129.92 алела, като средният брой установени алели за локус (9.99) варира от 6.31 при Местната карнобатска до 11.46 – при Котленската.

2. Сравнително големия брой алели в изследваните SSR локуси (от 8 в D5S2 до 32 в OarCP49) дава основание да считаме, че използваният набор от 13 микросателитни маркери е подходящ за анализ на генетичното разнообразие при местните породи овце в България. Най-високо информативни са маркерите HSC, INRA23, OarFCB20 и OarCP49, които се открояват с най-висок PIC. Установеният най-голям брой алели – среден брой (15.33), ефективен (6.44) и популационно - специфични (2); ниска стойност на хетерозиготен дефицит (4.4%); висока стойност на очаквана хетерозиготност ($H_e=0.837$) показват, че най-информативен е микросателитния маркер OarCP49. С максимален брой алели (18) по този локус се отличават популациите на Реплянската и Копривщенската породи.

3. В изследваните 12 популации овце, генотипирани с 13 микросателитни маркери е установено високо средно ниво на генетично разнообразие ($H_e=0.78$). С най-високо ниво на генетично разнообразие (H_e) се открояват Дъбенската порода овце (0.82), следвана от Реплянската, Среднородопската, Сакарска и Котленска породи (0.81), а с най-ниско – Старозагорска (0.70). Най - високо H_o е отчетено за Дъбенската и Среднородопската породи овце (0.81), а най - ниско – в Старозагорската (0.70). Коефициентът на инбридинг (F_{is}) варира от -0.03 в Местна карнобатска до 0.1 в Каракачанска порода. Средната стойност на $F_{is}=0.03$ за 12-те породи овце е показател за отсъствие на хетерозиготен дефицит.

4. В рамките на изследваните 12 породи са установени 5 популационно-специфични алели в 4 от изследваните микросателитни локуси: MAF65, OarFCB11, MAF214 и OarCP49. Най-голям брой алели (2), специфични за дадена порода са отчетени в извадката от Реплянската популация в локуси MAF65 и OarFCB11. От тях с най-голяма честота (0.083) е представен алел 146 бд в OarFCB11.

5. Отчетени са уникални алели в 11 от изследваните породи, с изключение на Местна карнобатска. Най-голям е техният брой в Старозагорската порода (5). Последните са показател за високо ниво на алелно разнообразие при местните породи овце и са ценен „резервоар“ за поддържане на ниски нива на инбридинг.

6. Анализът на молекулната вариация (AMOVA) показва 4.6 % генетично вариране между изследваните популации и 95.4% между индивидите в рамките на отделните популации. Изчисленият на базата на този анализ коефициент на генетична диференциация ($F_{st}=0.046$) е индикация за ниско ниво на диференциация между породите и е отправна точка за по-нататъшно проследяване на динамиката на развитие на породите и процеса на тяхното диференциране на генетично ниво.

7. Най-висока стойност на генетичните дистанции по Nei е установена между популациите на Старозагорската и Каракачанската ($DA=0.065$) и между Старозагорската и Местната карнобатска породи ($DA=0.046$). а най-ниска ($DA=0.010$) – между Каракачанската и Котленската. Резултатите от принципния координатен анализ (PcoA) потвърждават генетичната отдалеченост на Старозагорската и Местната карнобатска от останалите породи овце.

8. Анализът на генетичната структура, показва наличие на 2 основни популации при $K=2$ в изследваната извадка от 12 местни породи овце в България, първата от които включва 10 породи, а втората - Старозагорската и Местната карнобатска породи. При $K=3$ започва отделяне на Старозагорската и Местната карнобатска породи, като при $K=4$, стадата на Старозагорската порода (FL1-FL4) и Местната Карнобатска (FL5-FL8) са добре отдиференцирани и се характеризират с по-ясно изразена хомогенна структура за разлика от тези на останалите породи. Всички други породи при увеличаващо се K не се отдиференцират и се характеризират с висока хетерогенност, поради продължаващ процес на поток на гени между тях. Отчетлива диференциация се наблюдава за някои стада от Каракачанската, Тетевенската, Брезнишка и Реплянска породи.

9. С висока стойност на фенотипна дистанция се отличава Старозагорската порода по отношение на останалите 11 породи овце. Най-големи са дистанциите между Старозагорската и следните три породи: Местна карнобатска. Копривщенска и Котленска породи (0.4146) и между Старозагорска и Дъбенска породи (0.291), като най-голямо е фенотипното сходство между Старозагорската и Тетевенска породи.

10. Проведеният корелационен анализ между генетичните и фенотипни матрици на основата на Мантел тест показва, че е налице средна корелация между установените генетични и фенотипни параметри, което е основа за провеждане на комплексна оценка на генетичните ресурси от овце в България.

ПРЕПОРЪКИ

1. Приложеният набор от микросателитни маркери (**D5S2, INRA5, MAF65, OarAE129, OarFCB11, INRA23, OarFCB20, McM527, CSRD247, HSC, MAF214, OarCP49, INRA63**) може да се използва за характеристика на генетичната структура, генетичното разнообразие и анализ на генетичните процеси в популациите на националните автохтонни породи овце.

2. Генетичното разнообразие в изследваните популации от местни породи овце, установено с приложения набор от микросателитни маркери може да бъде използвано ефективно за съхранение на генофонда на тези породи. Особен акцент трябва да се постави върху съхранението на две от тях – Местната карнобатска и Старозагорската, характеризиращи се с най-висока степен на генетична диференциация, най-ниско ниво на наблюдавана и очаквана хетерозиготност и поради техния статус на застрашени от изчезване породи.

3. Предвид наблюдаваното силно фрагментиране при 9 от изследваните местни породи овце (с изключение на Старозагорската и Местната карнобатска породи, и с малки изключения Каракачанска порода) е препоръчително използване на схеми на развъждане, базиращи се на индивидуален отбор при строго съблюдаване на подбора и обmena на типични за породата кочове между стадата.

ПРИНОСИ

1. За първи път е извършено разширено и системно проучване на генетичните ресурси на 12 популации от местни породи овце в България, от които 7 нови, на основата на микросателитен анализ в 13 локуса. Получените резултати могат да бъдат използвани като основа за системно наблюдение/мониторинг на състоянието и развитието на генетичните ресурси на местните породи овце и тяхното ефективно управление чрез приложението им при разработване и прилагане на развъдни, в т.ч. и консервационни програми.

2. За първи път е проведен корелационен анализ между генетичните и фенотипни матрици за анализиранияте 12 породи овце на основата на Мантел тест. Установената средна корелация между

генетичните и фенотипни параметри може да послужи като отправна точка за прилагане на комплексна оценка на генетичните ресурси от овце, включваща данни от микросателитни анализи и набор от фенотипни признаци.

ПУБЛИКАЦИИ ПО ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

Mihailova Y. (2021). Genetic diversity and structure of 2 indigenous sheep breeds (Kotel and Teteven) in Bulgaria using microsatellite markers.

Biotechnology & Biotechnological Equipment. 35(1): 576-585. **IF=1.633.**

Q3 Scopus <https://doi.org/10.1080/13102818.2021.1903339>

Цитирания:

1. Odjakova, T., Todorov, P., Radoslavov, G., & Hristov, P. (2022). Microsatellite Genotyping of Two Bulgarian Sheep Breeds. *Diversity*, 14(3), 210.1, MDPI SJR 2021 = 0.654 <https://www.scopus.com/sourceid/21100924379>.

2. Loukovitis, D., Szabó, M., Chatziplis, D., Monori, I., & Kusza, S. (2022). Genetic diversity and substructuring of the Hungarian merino sheep breed using microsatellite markers. *Animal Biotechnology*, 1-9, SJR 2021 = 0.301 <https://www.scopus.com/sourceid/14943>.