

## ИЗПОЛЗВАНЕ НА МОЛЕКУЛЯРНИ МАРКЕРИ ЗА ОЦЕНКА НА ГЕНЕТИЧНОТО РАЗНООБРАЗИЕ ПРИ МЕСТНОТО СИВО ГОВЕДО

Денис Вирянски\*, Атанаска Тенева

Лесотехнически Университет – София, бул. „св. Климент Охридски“ 10, 1756 ж.к. Дървеница, София

\*Автор за кореспонденция: [razial@abv.bg](mailto:razial@abv.bg)

### Резюме

Генетичното разнообразие, основано на ДНК маркери - микросателити при породата Сиво говедо, отглеждано в България е малко проучено.

Основната цел на настоящето изследване е характеризиране на генетичните ресурси и биоразнообразие при популация животни от породата Сиво говедо, отглеждани в България чрез използване на молекулно-генетични ДНК маркери.

В проучването е включен панел от 11 микросателитни маркера (STR) препоръчани от ISAG/FAO за генотипиране и оценка на генетичното разнообразие при говеда. Изследвани са 179 животни от популация на Сиво говедо, отглеждано в Тополовградския регион. Всички от изследваните локуси бяха информативни и полиморфни. Общо са открити 96 алела със средна стойност 8,72 в 11-те микросателитни локуса, от които 26 (36.9%) бяха с честота >0.5.

Микросателитните маркери, използвани в това проучване, показват стойности на PIC от 0,72 (BM1824) до 0,89 (TGLA 227) със средно 0,79. Размерът (разнообразието) на популацията се измерва чрез оценка на нивото на хетерозиготността и броя на алелите от микросателитни данни. Наблюдаваната хетерозиготност (Ho) варира от 0.851 (локус ETH10) до 0.969 (TGLA 227). Очакваната хетерозиготност (генно разнообразие - He) варира от 0,392 в локус BM 1824 до 0,806 в локус ETH 225. За всички 11 локуса средната хетерозиготност е съответно Ho = 0,935 и He = 0,649. Ефективният брой алели (N) е между 7 (TGLA 122, INRA 23, BM 2113) и 17 (TGLA 53). Изчислените стойности на параметрите на генетичното разнообразие - PIC, Ho, He и MNA показаха, че всички микросателитни маркери са полиморфни. Всички изследвани локуси се характеризират с високо (> 0,5) полиморфно съдържание (PIC) и се наблюдава хетерозиготност (Ho> 0.6).

**Ключови думи:** микросателити, молекулярни маркери, полиморфизъм, SSR, Сиво говедо

### Увод

Приложението на молекулярните маркери в животновъдството улеснява и подпомага създаването на програми за развъждане при определена порода, представляваща интерес, като по този начин се запазват стопански качества, свързани с продуктивността и съхраняването на биоразнообразието в популациите.

При генетичните изследвания на животни, молекулярните маркери разкриват полиморфизъм на ДНК ниво, което е от съществено значение за развъждането, чрез

използването на молекулярни методи. ДНК секвенциите, като нов клас генетични маркери са описани през 80-те години на миналия век. Наблюдавани са разпръснати в еукариотните геноми, близост до гени, интронни участъци при видове като Морския Таралеж, Дрозофилата и др. (Tautz and Renz, 1984). Различният брой ДНК повтори (Аденин, Тимин, Гуанин и Цитозин) са вариабилни при една и съща популация от индивиди в тяхното ДНК и в алелите на всеки един индивид. Това може да бъде установено чрез PCR микросателитен анализ за наличие на ДНК и откриване на търсените базови секвенции, присъщи на индивидите от този вид (Garibyan and Avashia, 2014).

SSR микросателитите са силно полиморфни, състоящи се от две, три, четири и повече тандемни повторения на нуклеотидни бази – А-Т, G-C, които се разполагат из целия геном в не кодиращи (интронни) участъци. Локусите могат да дадат информация за наличието на ген, представляващ интерес за изследване и установяване на търсените от нас признаци.

SSR маркерите се срещат най-вече извън генните региони, поради факта, че SSRs имат висока мутабилност, която може да повлияе на генната експресия. Изследванията показват, че в кодиращите региони преобладават SSRs с генни мотиви от три- и хексануклеотиден тип, резултат от натиска за селекция срещу мутации, които променят рамката на четене (Vieira et al., 2016).

Чрез използването на фрагментен анализ с помоща на PCR амплификация на определени локус-специфични участъци, може да се набави достатъчно информация за търсените признаци, като в последствие може да се създаде генетична карта, а също така и подходящи селекционни програми.

В България генетичното разнообразие на популации говеда на основата на ДНК маркери е слабо проучено.

В този контекст основна цел на това проучване е характеризиране на генетичното разнообразие при популация животни от породата Сиво говедо, отглеждани в България чрез използване на 11 микросателитни маркера, т.нар. „златен стандарт“ за подобни изследвания, препоръчани от ISAG / FAO (Hoffmann et al., 2005). Използван е панел от 11 микросателитни маркера при 179 изследвани животни от местна порода Сиво говедо, като се проследяват очакваната (He) и наблюдаваната хетерозиготност (Ho), както и Полиморфно информационно съдържание (PIC).

## Материали и методи

### ДНК амплификация

Изследвани са 179 говеда от породата Сиво говедо от Тополовградски регион. Кръвта е взета и съхранена във вакуумтейнери, съдържащи EDTA като антикоагулант. ДНК беше извлечена от цяла кръв с помощта на кит за изолиране **Exgene Tissue SV (плюс) (GeneAll)** в съответствие с инструкциите на производителя. Концентрацията и качеството на ДНК е проверена, чрез гел електрофореза и спектрофотометър. В това проучване са приложени 11 микросателитни маркера, препоръчани от ISAG / FAO (Hoffmann et al., 2005). Маркерите се амплифицират, като се използва оптимизиран протокол за PCR. (Hoffmann B. et al. 2009).

PCR амплификация се извършва с термоциклер EPPENDORF (PE, Applied Biosystems) при следните условия: първоначална денатурация 95°C / 15 min, 31 цикъла, денатурация 94°C / 45 s, охлаждане 61°C / 45 s, елонгация 72°C / 60 min и окончателна елонгация 25°C / 2ч. След амплификация PCR продуктите се смесват с флуоресцентна боя FAM, JOE или NED, в зависимост от техните размери. Амплифицираните продукти бяха разделени на 5% агарозен гел. Информацията за размерите на фрагменти беше автоматично изчислена от GENESCAN ANALYSIS v.3.1. Софтуер. В таблица 1 е показано името на локуса, локализацията, последователностите на праймерите, температурата на охлаждане и обхвата на дължината на алелите на изследваните микросателити.

Фрагментният анализ на микросателитните локуси е извършен в Лаборатория по молекулярно-генетичен анализ в ЛТУ при агрономически факултет и АгроБиоИнститут, гр. София.

### Статистически методи

Генетичното разнообразие на животните от пробите беше оценено въз основа на честотите на алелите, средния брой алели (MNA), наблюдаваната хетерозиготност (Ho), очакваната хетерозиготност (He) и полиморфното информационно съдържание (PIC) с Powerstat v.1.2 Software.

### Резултати

Общо са открити 96 алела в изследваните 11 локуса за Сивото говеда от общия брой говеда - 179. Броят алели на локус варира от 6 (за ETH 10 и BM 1824) до 17 (за TGLA 53) със средно число 8,72. Честотата на алелите варира в различни микросателитни локуси. Най-високият брой хетерозиготи е наблюдаван в локус ETH225 ( $n = 179$ ), в който почти всички индивиди (162) са хетерозиготни. Най-ниският брой хетерозиготни индивиди (130) е открит в локус ETH3 ( $n = 179$ ). Микросателитните маркери, използвани в това проучване, показват стойности на PIC от 0,72 (BM1824) до 0,89 (TGLA 227) със средно 0,79 (Таблица 5). Размерът (разнообразието) на популацията се измерва чрез оценка на нивото на хетерозиготността и броя на алелите от микросателитни данни. В това изследване наблюдаваната хетерозиготност (Ho) варира от 0.851 (локус ETH10) до 0.969 (TGLA 227). Очакваната хетерозиготност (генно разнообразие - He) варира от 0,392 в локус BM 1824 до 0,806 в локус ETH 225. За всички 11 локуса средната хетерозиготност е съответно  $H_o = 0,935$  и  $H_e = 0,649$ . Ефективният брой алели (N) е между 7 (TGLA 122, INRA 23, BM 2113) и 17 (TGLA 53). Изчислените стойности на параметрите на генетичното разнообразие - PIC, Ho, He и MNA показаха, че всички микросателитни маркери са полиморфни. Всички изследвани локуси се характеризират с високо ( $> 0,5$ ) полиморфно съдържание (PIC) и се наблюдава хетерозиготност ( $H_o > 0.6$ ).

### Обсъждане

Очакваният общ брой алели при сивото говеда (96) е по-висок от наблюдаваните в изследването на Machado et al. (2003), които откриват 64 алела, използвайки 9 микросателитни маркера при 4 породи. Този брой обаче е по-малък от тези, открити от Teneva et al. (2005; 2007) за популациите от Българско сиво и Родопско късорого (съответно

83 и 118 алела). По подобен начин Cervini et al. (2003), използвайки 10 STR маркера, са открили общо 94 алела със среден брой 9,4 алела на локус при 200 животни от говеда Бразилското Nellore (*Bos indicus*). В тяхното изследване TGLA227, BM1824 и TGLA53 са най-полиморфни.

Таблица 1. Локус, хромозомна локализация, праймери, температура на анилинг, дължина на микросателитните алели.

Table 1. Locus, chromosome localization, primers, aniling temperature, microsatellite allele length.

| №  | Name of the locus<br>Име на локуса | Chromosome<br>Location<br>Местоположение в хромозомата | Marker<br>Маркер | Primer sequences (5' -> 3')<br>Праймерни секвенции<br>Forward /Прав/<br>Reverse /Обратен/ | Annealing<br>Temperature<br>Температура на анилинг | Allele<br>Range<br>Алелен диапазон |
|----|------------------------------------|--------------------------------------------------------|------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------|------------------------------------|
| 1  | ETH225 (D9S1)                      | 9                                                      | M3               | GATCACCTTGCCACTATTTCT<br>ACATGACAGCCAGCTGCTACT                                            | 55-65°C                                            | 131-159                            |
| 2  | INRA023 (D3S10)                    | 3                                                      | M9               | GAGTAGAGCTACAAGATAAACTTC<br>TAACTACAGGGTGTTAGATGAACTC                                     | 55°C                                               | 195-225                            |
| 3  | ETH10(D5S3)                        | 5                                                      | M10              | GTTCAGGACTGGCCCTGCTAACA<br>CCTCCAGCCCACTTTCTCTTCTC                                        | 55-65°C                                            | 207-231                            |
| 4  | ETЮ (D19S2)                        | 19                                                     | M14              | GAACCTGCCTCTCCTGCATTGG<br>ACTCTGCCTGTGGCCAAGTAGG                                          | 55-65°C                                            | 103-133                            |
| 5  | BM2113(D2S26)                      | 2                                                      | M15              | GCTGCCTTCTACCAAATACCC<br>CTTCCTGAGAGAAGCAACACC                                            | 55-60°C                                            | 122-156                            |
| 6  | BM1824(D1S34)                      | 1                                                      | M16              | GAGCAAGGTGTTTTTCCAATC<br>CATTCTCCAAGTGCTTCCTTG                                            | 55-60°C                                            | 176-197                            |
| 7  | TGLA227(D18S1)                     | 18                                                     | M26              | CGAATTCCAAATCTGTTAATTTGCT<br>ACAGACAGAACTCAATGAAAGCA                                      | 55-56°C                                            | 75-105                             |
| 8  | TGLA126(D20S1)                     | 20                                                     | M27              | CTAATTTAGAATGAGAGAGGCTTCT<br>TTGGTCTCTATTCTCTGAATATTCC                                    | 55-58°C                                            | 115-131                            |
| 9  | TGLA122(D21S6)                     | 21                                                     | M28              | CCCTCCTCCAGGTAAATCAGC<br>AATCACATGGCAAATAAGTACATAC                                        | 55-58°C                                            | 136-184                            |
| 10 | TGLA53 (D16S3)                     | 16                                                     | M29              | GCTTTCAGAAATAGTTTGATTCA<br>ATCTTCACATGATATTACAGCAGA                                       | 55°C                                               | 143-191                            |
| 11 | SPS115(D15)                        | 15                                                     | M30              | AAAGTGACACAACAGCTTCTCCAG<br>AACGAGTGTCTAGTTTGGCTGTG                                       | 55-60°C                                            | 234-258                            |

Таблица 2. Алелна честота, хомо- и хетерозиготни варианти по 4 микросателитни локуса при Сиво говедо

Table 2. Allelic frequency, homo- and heterozygous variants of 4 microsatellite loci in Gray cattle

| TGLA 227 n=179                                                    |                      | TGLA 53 n=179                            |                                                                  | TGLA 126 n=179 |                                                                   | ETH3 n=179     |                      |
|-------------------------------------------------------------------|----------------------|------------------------------------------|------------------------------------------------------------------|----------------|-------------------------------------------------------------------|----------------|----------------------|
| Allele<br>Алел                                                    | Frequency<br>Честота | Allele<br>Алел                           | Frequency<br>Честота                                             | Allele<br>Алел | Frequency<br>Честота                                              | Allele<br>Алел | Frequency<br>Честота |
| 79                                                                | 0,056                | 153                                      | 0,011                                                            | 142            | 0,087                                                             | 103            | 0,028                |
| 81                                                                | 0,101                | 155                                      | 0,061                                                            | 144            | 0,257                                                             | 109            | 0,025                |
| 83                                                                | 0,081                | 159                                      | 0,042                                                            | 148            | 0,070                                                             | 115            | 0,073                |
| 85                                                                | 0,126                | 161                                      | 0,223                                                            | 150            | 0,008                                                             | 117            | 0,187                |
| 87                                                                | 0,095                | 163                                      | 0,061                                                            | 152            | 0,056                                                             | 119            | 0,179                |
| 89                                                                | 0,003                | 165                                      | 0,056                                                            | 154            | 0,271                                                             | 121            | 0,089                |
| 91                                                                | 0,131                | 167                                      | 0,045                                                            | 156            | 0,070                                                             | 123            | 0,117                |
| 93                                                                | 0,126                | 169                                      | 0,123                                                            | 164            | 0,081                                                             | 125            | 0,268                |
| 95                                                                | 0,059                | 171                                      | 0,070                                                            | 172            | 0,064                                                             | 127            | 0,034                |
| 97                                                                | 0,081                | 172                                      | 0,003                                                            | 142            | 0,036                                                             |                |                      |
| 101                                                               | 0,112                | 173                                      | 0,061                                                            |                |                                                                   |                |                      |
| 105                                                               | 0,031                | 175                                      | 0,022                                                            |                |                                                                   |                |                      |
|                                                                   |                      | 177                                      | 0,034                                                            |                |                                                                   |                |                      |
|                                                                   |                      | 179                                      | 0,020                                                            |                |                                                                   |                |                      |
|                                                                   |                      | 181                                      | 0,081                                                            |                |                                                                   |                |                      |
|                                                                   |                      | 183                                      | 0,061                                                            |                |                                                                   |                |                      |
|                                                                   |                      | 185                                      | 0,025                                                            |                |                                                                   |                |                      |
| Хомозиготи/Homozygotes -n=30<br>Heterozygotes/Хетерозиготи -n=149 |                      | Номозиготи -n=33<br>Heterozygotes -n=146 | Хомозиготи/Номозиготи -n=43<br>Хетерозиготи/Heterozygotes -n=136 |                | Хомозиготи/Homozygotes -n=49<br>Хетерозиготи/Heterozygotes -n=130 |                |                      |

Таблица 3. Алелна честота, хомо- и хетерозиготни варианти по 4 микросателитни локуса при Сиво говедо

Table 3. Allelic frequency, homo- and heterozygous variants of 4 microsatellite loci in Gray cattle

| SPS115<br>n=179                                                               |                      | TGLA 122 n=179                                                            |                      | INRA023 n=179                                                             |                      | ETH 225 n=179                                                             |                      |
|-------------------------------------------------------------------------------|----------------------|---------------------------------------------------------------------------|----------------------|---------------------------------------------------------------------------|----------------------|---------------------------------------------------------------------------|----------------------|
| Allele<br>Алел                                                                | Frequency<br>Честота | Allele<br>Алел                                                            | Frequency<br>Честота | Allele<br>Алел                                                            | Frequency<br>Честота | Allele<br>Алел                                                            | Frequency<br>Честота |
| 242                                                                           | 0,011                | 101                                                                       | 0,003                | 197                                                                       | 0,003                | 139                                                                       | 0,070                |
| 248                                                                           | 0,260                | 107                                                                       | 0,003                | 199                                                                       | 0,106                | 141                                                                       | 0,173                |
| 250                                                                           | 0,073                | 109                                                                       | 0,028                | 207                                                                       | 0,154                | 145                                                                       | 0,221                |
| 252                                                                           | 0,115                | 117                                                                       | 0,215                | 209                                                                       | 0,156                | 147                                                                       | 0,190                |
| 254                                                                           | 0,229                | 119                                                                       | 0,299                | 211                                                                       | 0,106                | 149                                                                       | 0,142                |
| 256                                                                           | 0,089                | 121                                                                       | 0,154                | 215                                                                       | 0,399                | 151                                                                       | 0,142                |
| 258                                                                           | 0,106                | 123                                                                       | 0,092                | 217                                                                       | 0,075                | 157                                                                       | 0,014                |
| 260                                                                           | 0,117                | 125                                                                       | 0,182                |                                                                           |                      | 159                                                                       | 0,047                |
|                                                                               |                      | 127                                                                       | 0,025                |                                                                           |                      |                                                                           |                      |
| Хомозиготи/Номо<br>zygotes -<br>n=34<br>Хетерозиготи/Hete<br>rozygotes -n=145 |                      | Хомозиготи/Номо<br>zygotes -n=39<br>Хетерозиготи/Hete<br>rozygotes -n=140 |                      | Хомозиготи/Номо<br>zygotes -n=39<br>Хетерозиготи/Hete<br>rozygotes -n=140 |                      | Хомозиготи/Номо<br>zygotes -n=17<br>Хетерозиготи/Hete<br>rozygotes -n=162 |                      |

Таблица 4. Алелна честота, хомо- и хетерозиготни варианти по 3 микросателитни локуса при Сиво говедо

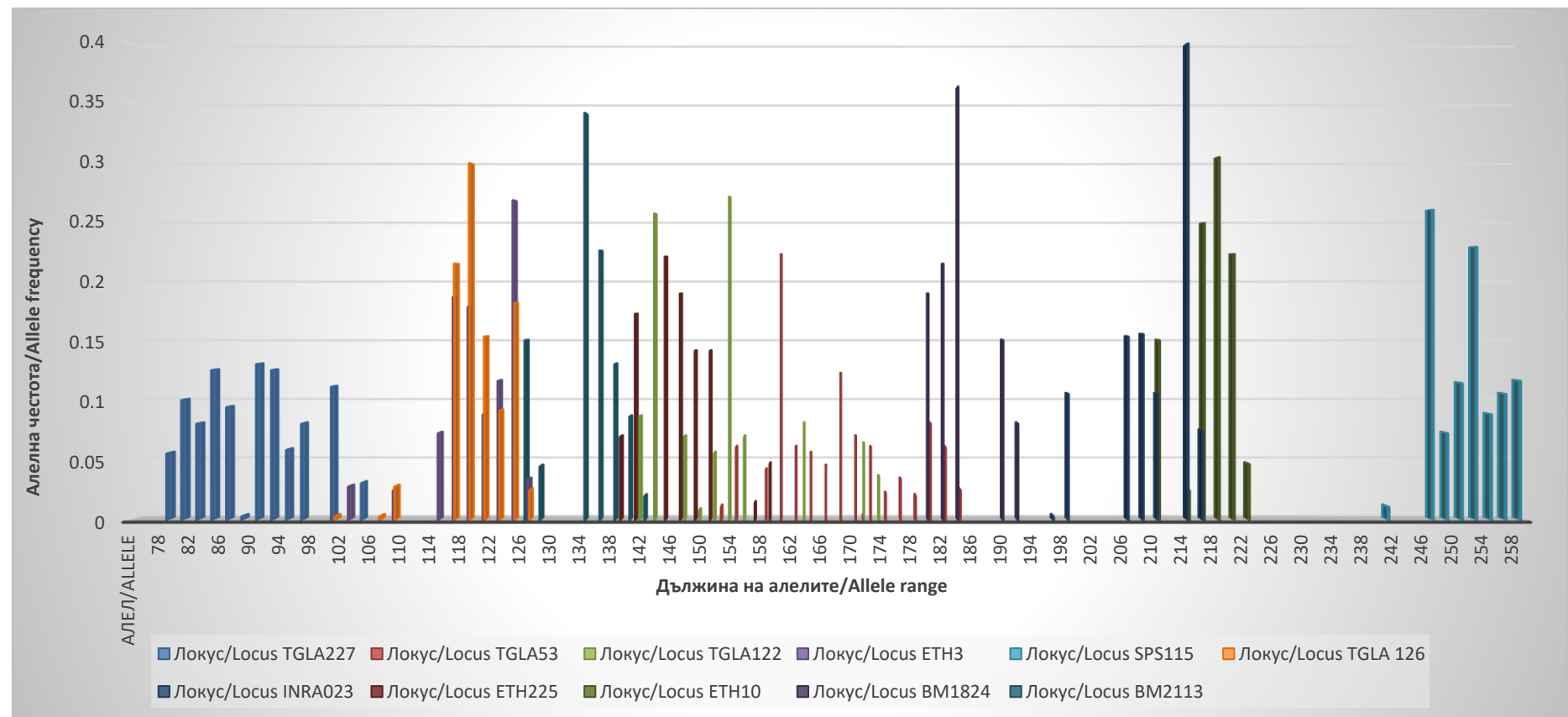
Table 4. Allelic frequency, homo- and heterozygous variants of 3 microsatellite loci in Gray cattle

| ETH10<br>n=179                                                           |                      | BM1824<br>n=179                                                          |                      | BM2113<br>n=179                                                          |                      |
|--------------------------------------------------------------------------|----------------------|--------------------------------------------------------------------------|----------------------|--------------------------------------------------------------------------|----------------------|
| Allele<br>Алел                                                           | Frequency<br>Честота | Allele<br>Алел                                                           | Frequency<br>Честота | Allele<br>Алел                                                           | Frequency<br>Честота |
| 211                                                                      | 0,151                | 180                                                                      | 0,190                | 126                                                                      | 0,151                |
| 215                                                                      | 0,025                | 182                                                                      | 0,215                | 128                                                                      | 0,045                |
| 217                                                                      | 0,249                | 184                                                                      | 0,363                | 134                                                                      | 0,341                |
| 219                                                                      | 0,304                | 190                                                                      | 0,151                | 136                                                                      | 0,226                |
| 221                                                                      | 0,223                | 192                                                                      | 0,081                | 138                                                                      | 0,131                |
| 223                                                                      | 0,047                |                                                                          |                      | 140                                                                      | 0,087                |
|                                                                          |                      |                                                                          |                      | 142                                                                      | 0,020                |
|                                                                          |                      |                                                                          |                      | 142                                                                      | 0,051                |
| Хомозиготи/Homozygotes -<br>n=42<br>Хетерозиготи/Heterozygotes-<br>n=137 |                      | Хомозиготи/Homozygotes -<br>n=58<br>Хетерозиготи/Heterozygotes<br>-n=121 |                      | Хомозиготи/Homozygotes -<br>n=55<br>Хетерозиготи/Heterozygotes<br>-n=124 |                      |

Таблица 5. Полиморфен информационен коефициент, хетерозиготност и брой алели при Сиво говедо

Table 5. Polymorphic information coefficient, heterozygosity and number of alleles in Gray cattle

| Локус<br>Locus | Дължина на алелите<br>Allele lenght /bp / | PIC  | Ho     | He    | N    |
|----------------|-------------------------------------------|------|--------|-------|------|
| TGLA 227       | 75-105                                    | 0.89 | 0.969  | 0.660 | 12   |
| BM 2113        | 126-142                                   | 0.75 | 0.914  | 0.417 | 7    |
| TGLA 53        | 153-185                                   | 0.89 | 0.965  | 0.628 | 17   |
| ETH 10         | 211-223                                   | 0.73 | 0.851  | 0.40  | 6    |
| SPS 115        | 242-260                                   | 0.81 | 0.941  | 0.618 | 8    |
| TGLA 122       | 101-127                                   | 0.77 | 0.923  | 0.566 | 7    |
| TGLA 126       | 142-174                                   | 0.81 | 0.938  | 0.527 | 10   |
| INRA 23        | 197-217                                   | 0.74 | 0.904  | 0.566 | 7    |
| ETH 3          | 103-127                                   | 0.81 | 0.935  | 0.470 | 9    |
| ETH 225        | 139-159                                   | 0.82 | 0.936  | 0.806 | 8    |
| BM 1824        | 180-192                                   | 0.72 | 0.900  | 0.392 | 5    |
| Общо/Total     |                                           | 8,72 | 10.176 | 7.143 | 96   |
| Средно /Mean   |                                           | 0,79 | 0.935  | 0.649 | 8,72 |



Фигура 1. Алелна честота и дължина на алелите при Сиво говедо в 11 микросателитни локуса

Figure 1. Allele frequency and length of alleles in Gray cattle in 11 microsatellite loci

При Сивото най-голям брой алели се наблюдават за TGLA53 с 17 и TGLA227 с 12 алела, последвани от ETH3 (9 алела) и ETH225, SPS115 (8 алела). Подобни резултати са съобщени от Kévin et al. (2019), които са изследвали генетичното разнообразие на популациите на говеда в Бенин и са открили най-голям брой алели (18) в TGLA122 и най-малък в локус BM1824 (5 алела).

Сравнявайки честотите на алелите в микросателитните локуси, се установява, че алелите, идентифицирани във всеки отделен локус, се срещат с различна честота в изследваната популация на Сивото говедо. Оценката на честотата на алелите във всеки отделен локус е от голямо значение, тъй като някои от тях могат да бъдат признати като специфични за породата в бъдещи сравнителни изследвания, включително различни породи. Сред маркерите, използвани в това проучване, най-полиморфните и подходящи за използване при по-нататъшни генетични анализи са тези с по-висок PIC, като TGLA227(0.89), TGLA53 (0.89), TGLA126 (0.81), ETH3(0.81), SPS115(0.81).

Същият набор от микросателитни маркери е оценен при Югославски говеда (YU Симентал) за тяхната приложимост при тестване за бащинство (Stevanovic et al., 2010). В това изследване TGLA227 и TGLA53 се характеризират с най-висок PIC (0.89), докато най-ниската PIC стойност (0.72) е наблюдавана за BM1824. За разлика от това проучване, гореспоменатите автори откриват най-високата наблюдавана хетерозиготност ( $H_o$ ) със стойност 0,774 и очаквана хетерозиготност ( $H_e = 0,889$ ) в INRA023. Подобни данни са докладвани от Sodhi et al. (2007), който използва 25 микросателитни маркера за характеризиране на генетичното разнообразие при говеда Kankrej и изчислява най-високата стойност на PIC за TGLA122 (0,886) с  $H_o$  (0,875) и  $H_e$  (0,866), съответно. Наблюдаваната хетерозиготност ( $H_o$ ) в популацията на Сивото говедо варира от 0.851 в локус ETH10 до 0.969 в локус TGLA227 със средна стойност 0.935 докато очакваната хетерозиготност ( $H_e$ ) варира от 0.392 в локус BM1824 до 0.806 в локус ETH225 със средна стойност 0.649.

Наблюдаваната хетерозиготност ( $H_o$ ) е по-висока от очакваната ( $H_e$ ) във всички локуси, което означава липса на инбридинг в популацията на Сивото, за разлика от други проучвания (Agung et al., 2019; Cervini et al., 2006), които съобщават за по-високи  $H_e$  от  $H_o$  при говедата. Последното наблюдение може да се обясни с няколко фактора, наличие на нулеви алели, селекция срещу хетерозиготи, инбридинг или комбинация от всички тези фактори.

Очакваната средна стойност на  $H_e$  (0.649) в това изследване показва, че нивото на разнообразие в извадката от породата Сиво говедо е по-високо от наблюдаваната в друга популация от Сиво ( $H_e = 0,775$ ) и Родопско късорого говедо ( $H_e = 0,785$ ) (Teneva et al., 2005; Тенева и сътр., 2007), при Югославските говеда (YU Симентал) ( $H_e = 0,750$ ) (Stevanovic et al., 2010), при Червените Степни говеда ( $H_e = 0,703$ ) (Kramarenko et al., 2018), в Украинският черен Пиед ( $H_e = 0,819$ ) и Червено-бели породи ( $H_e = 0,884$ ) (Shelyov, 2015; Shelyov et al., 2017), както и в изследването на Delgado et al. (2013) за 26 популации Креолски говеда, обработени проби от 10 държави, представляващи Северна, Централна, Южна Америка и Карибските острови.

## **Изводи**

В настоящето изследване се установи висок полиморфизъм на избраните 11 микросателитни маркери.

Те са високоинформативни, което потвърждава тяхното приложение при определяне на генетичната структура на популации говеда.

Това проучване е основна информация за провеждането на програма за опазване на генетично подобрение на породата Сиво говедо един от основните генетични ресурси в говедовъдството.

Информацията може да се използва от фермерите в различни развъдни програми, за да се избегне инбридинг, което може да доведе до загуба на някои специфични белези и ефективно управление на генетичните ресурси на селскостопанските животни, което изисква задълбочени познания за характеристиките на породата, включително данни за размера на популацията и структура, както и генетично разнообразие между породите.

## **Use of molecular markers to assess genetic diversity in local Gray bovine**

Denis Viryanski, Atanaska Teneva

### **Abstract**

The genetic diversity based on DNS markers- microsatellites in the Gray Cattle breedq reared in Bulgaria is little known.

The main goal of the study was genetic characterization of AnGR and estimation of genetic diversity of a population from Grey cattleq on the base of molecular markers.

In the present study is applied 11 microsatellite markers (STR) recommended by ISAG / FAO in cattle were used for genotyping and assessment of genetic diversity in 179 animals from the population of Gray cattle inhabiting the region of Topolovgrad. All of the studied loci were informative and polymorphic. A total of 96 alleles with a mean value of 8.72 were detected in the 11 microsatellite loci, of which 26 (36.9%) had a frequency > 0.5.

The microsatellite markers used in this study showed PIC values ranging from 0.72 (BM1824) to 0.89 (TGLA 227) with an average of 0.79. Population size (diversity) is measured by estimating the level of heterozygosity and the number of alleles from microsatellite data. The observed heterozygosity ( $H_o$ ) ranged from 0.851 (ETH10 locus) to 0.969 (TGLA 227). The expected heterozygosity (genetic diversity -  $H_e$ ) varies from 0.392 at locus BM 1824 to 0.806 at locus ETH 225. For all 11 loci, the mean heterozygosity is  $H_o = 0.935$  and  $H_e = 0.649$ , respectively. The effective number of alleles ( $N$ ) is between 7 (TGLA 122, INRA 23, BM 2113) and 17 (TGLA 53). The calculated values of the parameters of genetic diversity - PIC,  $H_o$ ,  $H_e$  and MNA showed that all microsatellite markers are polymorphic. All examined loci were characterized by a high (> 0.5) polymorphic content (PIC) and heterozygosity ( $H_o > 0.6$ ) was observed.

**Keywords:** Microsatellites, Molecular markers, Polymorphism, SSR, Gray cattle

## Литература

- Agung P., F. Saputra, M. Zein, A. Wulandari, W. Putra, S. Said, J. Jakaria (2019): Genetic diversity of Indonesian cattle breeds based on microsatellite markers. *Asian-Australas J. Anim. Sci.*, 32(4):467-476.
- Garibyan L., N.J. Avashia (2013): Research Techniques Made Simple: Polymerase Chain Reaction (PCR). *Invest Dermatol. Mar*, 133(3): e6.
- Hoffman J., W. Amos (2005): Microsatellite genotyping errors: detection approaches, common sources and consequences for paternal exclusion, *Molecular Ecology*, 14(2):599-612.
- Hoffmann B., M. Beer, S. Reid, P. Mertens, C. Oura (2009): A review of RT-PCR technologies used in veterinary virology and disease control: sensitive and specific diagnosis of fivelivestock diseases notifiable to the World Organisation for Animal Health. *Veterinary Microbiology*, Elsevier, 139 (1-2), pp.1.
- Delgado J., A. M. Martinez (2013): Genetic characterization of Latin-American Creole cattle using microsatellite markers. *Animal Genetics* 43(1):2-10.
- Kévin, K., Y. Karim. (2019): Genetic Diversity of Benin Cattle Populations Using Microsatellite Markers. *International Journal of Animal Science and Technology*, 3(1):7.
- Kramarenko A., T. Pidpala, L. Strikha, E. Gladyr, N.E. Zinovieva, S. Kramarenko (2018): Genetic diversity and bottleneck analysis of the Red Steppe cattle based on microsatellite markers. *Ukrainian Journal of Ecology*, 8(2).
- Shelyov, A.V. (2015): Polymorphism of microsatellite DNA loci in different species of farm animals. *Animal Breeding and Genetics*, 50:183–189.
- Shelyov, A.V., K.V. Kopylov, S.S. Kramarenko, O.S. Kramarenko (2017): Analysis of population-genetic processes in different cattle breeds by microsatellite loci of DNA. *Agricultural Science and Practice*, 4(1): 74–78.
- Sodhi M., M. Mukesh, B. Prakash, B. P Mishra, R. C. Sobti, K. P. Singh, S. P.S. Ahlawat (2007): Microsatellite Marker Based Characterization of Genetic Diversity in Kankrej Cattle. *Journal of Applied Animal Research*, 31(2): 153-158.
- Stevanovic, J. Z. Stanimirovic, V. Dimitrijevic, M. Maletic (2010): Evaluation of 11 microsatellite loci for their use in paternity testing in Yugoslav Pied cattle (YU Simmental cattle). *Czech J. Anim. Sci.*, 55(6): 221–226.
- Tautz D., M. Renz (1984): Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eukaryotic genomes. *Nucleic Acids Res.*, 12:4127–4138.
- Teneva A., E. Todorovska, N. Tyufekchiev, L. Kozelov, A. Atanassov, S. Foteva, S. Ralcheva, S. Zlatarev (2005): Molecular characterization of Bulgarian livestock genetic resources 1. Genetic diversity in Bulgarian grey cattle as revealed by microsatellite markers. *Biotechnology in Animal Husbandry*, 21 (5-6):35-41.
- Teneva A., E. Todorovska, N. Tyufekchiev, A. Stella, P. Boettcher, I. Dimitrova (2007): Molecular characterization of Bulgarian livestock genetic resources. II. Microsatellite variation within and among Bulgarian cattle breeds. *Biotechnology in Animal Husbandry*, 23 (5-6): 227 – 242.

Vieira M., Santini L., A. Diniz, C. Munhoz (2016): Microsatellite markers: what they mean and why they are so useful. *Genet. Mol. Biol.*, 39(3): 312–328.