

МЕТОДИКА ВИЗНАЧЕННЯ STR-ЛОКУСІВ ОВЕЦЬ ВІТЧИЗНЯНОЇ СЕЛЕКЦІЇ

В. М. Іовенко, доктор сільськогосподарських наук,
професор

ORCID ID: 0000-0002-0829-7844

К. В. Скрепець, кандидат сільськогосподарських наук

ORCID ID: 0000-0002-8873-3801

Н. Б. Писаренко, кандидат сільськогосподарських наук

ORCID: 0000-0001-9645-2279

Г. О. Яковчук

ORCID ID: 0000-0002-2141-8540

Г. І. Рукавнікова

ORCID ID: 0000-0001-6009-6583

І. М. Свістула, аспірант

ORCID: 0000-0002-7981-7923

Інститут тваринництва степових районів імені М. Ф. Іванова
«Асканія-Нова» - Національний науковий селекційно-генетичний
центр з вівчарства

вул. Соборна, 1, смт Асканія-Нова, Каховський р-н,
Херсонська обл., 75230, Україна
e-mail: ascitsr_priemnaya@ukr.net

Надійшла 02.05.2022

Мета. Оптимізація методики визначення поліморфізму мікросателітних локусів у овець вітчизняної селекції та можливості їх використання для дослідження генетичної структури популяцій овець. **Методи.** Молекулярно-генетичні та ДНК-технології. **Результати.** Розроблено та вдосконалено методику визначення STR-локусів у племінних стадах овець асканійської селекції. Визначено склад реакційної суміші для: dH₂O – 6,8 мкл; Буфер-ПЛР 10-х – 1,0 мкл; MgCl₂ – 0,7 мкл; dNTP суміш (2мМ кожного) – 0,2 мкл; два праймера (10 пкМ/мкл) – 0,2 мкл; Taq-полімераза (5 ед/мкл) – 0,1 мкл; ДНК 50-100 нг – 1,0 мкл та режими ампліфікації STR-локусів: початкова денатурація – 3 хв при 94 °С, далі 35 цикла: денатурація – 10 с при 95 °С, відпал праймерів –

Науковий керівник: Іовенко Василь Миколайович, доктор с.-г. наук, професор, Заслужений діяч науки і техніки України.

30 с при 57 °С і синтез – 60 с при 68 °С. Завершує реакцію термінальна елонгація – 6,5 хвилин при 68 °С. Оптимізовано методику приготування поліакріламидного гелю його формування та режими електрофорезу з наступною візуалізацією. Отримано базову інформацію стосовно мікросателітних локусів овець (MAF214; CSRD247; INRA063; INRA172; OarFCB20) та їх поліморфізму у досліджених популяціях. Показано, що у овець ген амелогену на X хромосомі характеризується довжиною фрагмента 264 п.н, а на Y хромосомі – 217 п.н. **Висновки.** У овець асканійської селекції досліджено п'ять поліморфних мікросателітних локусів, зокрема: MAF214 (189-265 п.н.), CSRD247 (209-255 п.н.), INRA063 (169-201 п.н.), INRA172 (126-160 п.н.), OarFCB20 (87-113 п.н.). Показано, що після ампліфікації ДНК-фрагменти мають різну молекулярну масу, що дає можливість використовувати їх в мультиплексній ПЛР для характеристики генетичного різноманіття овець різного походження та вивчення ефективності застосування мікросателітів в системах розведення овець різного напрямку продуктивності.

Ключові слова: вівці, STR-локуси, ДНК, ПЛР, алель, молекулярно-генетичні маркери.

DOI: <https://doi.org/10.33694/2617-0787-2022-1-15-82-96>

UDC 636.32/38.082.12

THE METHOD of DETERMINATION the SHEEP STR-LOCUSES DOMESTIC SELECTION

V. M. Iovenko, Doctor of Agricultural Sciences,
Professor

ORCID: 0000-0002-0829-7844

K. V. Skrepets, Candidate of Agricultural Sciences

ORCID ID: 0000-0002-8873-3801

N. B. Pysarenko, Candidate of Agricultural Sciences

ORCID: 0000-0001-9645-2279

H. O. Yakovchuk

ORCID ID: 0000-0002-2141-8540

H. I. Rukavnikova

ORCID: 0000-0001-6009-6583

I. M. Svistula*, a Graduate Student

ORCID: 0000-0002-7981-7923

*"Ascania Nova" Institute of Animal Breeding in the Steppe Regions

Named after M. F. Ivanov - National Scientific Selection-Genetics
Center for Sheep Breeding
1, Soborna Street, Askania Nova, Kakhovka district,
Kherson region, 75230, Ukraine
e-mail: ascitsr_priemnaya@ukr.net

Aim. Optimization of the method for determining the polymorphism of microsatellite loci in the domestic breeding sheep and the possibility of using these loci to study the sheep populations genetic structure were the task this investigation. **Methods.** Molecular genetics and DNA technologies. **Results.** A method for determining STR-loci in breeding herds of Ascanian sheep has been developed and improved. The composition of the reaction mixture was determined for: dH₂O - 6.8 µl; Buffer-PCR 10's - 1.0 µl; MgCl₂ - 0.7 µl; dNTP mixture (2mM each) - 0.2 µl; two primers (10 pM/µl) – 0.2 µl; Taq-polymerase (5 units/µl) – 0.1 µl; DNA 50-100 ng - 1.0 µl and amplification modes of STR loci: initial denaturation - 3 min at 94 °C, then 35 cycles: denaturation - 10 s at 95 °C, primer annealing - 30 s at 57 °C and synthesis - 6 s at 68 °C. The reaction is completed by terminal elongation - 6.5 minutes at 68 °C. The method of preparing a polyacrylamide gel for its formation and the modes of electrophoresis with subsequent visualization are optimized. Basic information on sheep microsatellite loci (MAF214; CSRD247; INRA063; INRA172; OarFCB20) and their polymorphism in the studied populations was obtained. It was shown that in sheep the amelogenin gene on the X chromosome is characterized by a fragment length of 264 bp, and on the Y chromosome – 217 bp. **Conclusions.** Five polymorphic microsatellite loci were studied in Ascanian sheep, in particular: MAF214 (189-265 bp), CSRD247 (209-255 bp), INRA063 (169-201 bp), INRA172 (1 - 160 s.n.), OarFCB20 (87-113 s.n.). It was shown that, after amplification, DNA fragments have different molecular weights, which makes it possible to use them in multiplex PCR to characterize the genetic diversity of various origins sheep and study the using microsatellites effectiveness in the different productivity directions sheep breeding systems.

Keywords: sheep, STR loci, DNA, PCR, allele, molecular genetic markers.

DOI: <https://doi.org/10.33694/2617-0787-2022-1-15-82-96>

* Scientific adviser: Iovenko Vasyl Mykolayovych, Doctor of Agricultural Sciences, Professor, Honored Worker of Science and Technology of Ukraine.

Постановка проблеми. На сучасному етапі удосконалення існуючих та створення і консолідація нових високопродуктивних порід і типів сільськогосподарських тварин як теоретично так і практично пов'язане з широким застосуванням новітніх методів генетики і біотехнології.

Незважаючи на появу нових методів типування, мікросателітні маркери, що відрізняються такими важливими перевагами, як рівномірний розподіл в геномі, велику аллельну різноманітність, високу інформативність, кодомінантність успадкування за менделевським типом і легкість автоматизації визначення залишаються актуальними як високоінформативні ДНК-маркери при проведенні популяційно-генетичних досліджень.

Поліморфізм мікросателітних локусів залежить від видових, породних та індивідуальних особливостей тварин. Це ділянки ДНК, в яких тандемно повторюються послідовності довжиною 1 – 6 нуклеотидів, наприклад (GA) $_n$, (GAG) $_n$, (AGAT) $_n$. Кількість повторів (n), як правило, є високополіморфним і підпорядковується менделівському принципу успадкування [1].

Для того, щоб стимулювати використання однакових маркерів, в даний час Продовольчою і сільськогосподарською організацією ООН (Food and Agriculture Organization, FAO) і Міжнародним товариством генетики тварин (ISAG, International Society for Animal Genetics) запропоновано списки мікросателітних локусів для овець [2].

Аналіз останніх досліджень і публікацій. В даний час використовують високопродуктивні методи генотипування, зокрема повногеномне SNP (single nucleotide polymorphism) сканування за допомогою ДНК-матриць різної щільності та генотипування за допомогою секвенування (genotyping-by-sequencing, GBS) [3]. Але, незважаючи на це дослідження та використання мікросателітних локусів у якості молекулярно-генетичних маркерів має широке розповсюдження. Існує багато наукових праць з досліджень алелофондів та генетичних структур порід та популяцій різних видів сільськогосподарських тварин [4, 5, 6, 7], визначення вірогідності походження та аналізу генетичного різноманіття з використанням мікросателітів [8].

В системі НААН України дослідженнями STR-локусів свійських тварин займається ряд наукових установ, так, у великої рогатої худоби, коней та собак – Інститут розведення і генетики тварин імені М. В. Зубця [9], у свиней – Інститут свинарства і агропромислового виробництва [10], розвинено вивчення мікросателітів і у рибицтві – Інститут рибного господарства [11].

Дослідження мікросателітних локусів овець різних порід використовуються у багатьох країнах світу, наприклад, таких як Турція [12], Індія [13], Уругвай [14], Польща [15], Білорусь [16], Казахстан [17] та інші. Але, не зважаючи на велику кількість праць іноземних авторів та розповсюдження досліджень мікросателітів у овець зарубіжної селекції вівці вітчизняних порід за мікросателітними локусами не досліджувалися взагалі, або мали вибіркового характеру [18]. Саме це і слугувало основною причиною розробки методики дослідження поліморфізму STR-локусів та визначення можливості використання мікросателітів у системах селекції овець різного напрямку продуктивності.

Матеріал і методи досліджень. Дослідження проводили на вівцях асканійської селекції: асканійської м'ясо-вовнової (АМВ); асканійської тонкорунної (АТ) та асканійської каракульської (АК) порід, які утримуються у ДПДГ «Асканія-Нова» Херсонської області.

Виділення геномної ДНК проводилося з клітин крові з використанням комплекту реагентів для екстракції ДНК „ДНК-Сорб-Б” за стандартною методикою, згідно рекомендацій виробника (Амплісенс) [19]. Полімеразно-ланцюгову реакцію здійснювали з використанням програмованого ампліфікатора Libe Line 212.

Для розділення продуктів ампліфікації проводили вертикальний електрофорез у 12% поліакріламидному гелі (ПААГ). Візуалізацію отриманих результатів здійснювали за допомогою транслюмінатора в УФ світлі з довжиною хвилі 312 nm та подальшим документуванням електрофореграм цифровою фотокамерою. Диференціацію ампліконів за розмірами проводили за допомогою маркера молекулярних мас рUC19/MspI.

Результати досліджень. З метою відпрацювання основних методик ампліфікації та генетичного типування STR-локусів було відібрано п'ять (MAF214; CSR247; INRA063; INRA172; OarFCB20) та ген амелогенину (AMEL), що використовується для ідентифікації статевої належності тварин (табл. 1). При виборі враховували рівень їх поліморфізму і можливість ампліфікації у одній реакції (близькі температури відпалу праймерів) та щоб область одного мікросателітного маркера не пересікалася з областю іншого. Рядом дослідників встановлено, що розміри алелей відібраних мікросателітних локусів коливаються від 87 до 265 нуклеотидів, шаг між алелями – два нуклеотиди [20, 21, 22].

Типування тварин за мікросателітними локусами геному передбачає ПЛР-ампліфікацію відповідних фрагментів ДНК та їх електрофоретичний аналіз із визначенням розмірів ампліфікованих фрагментів.

Таблиця 1. Мікросателітні локуси, відібрані для розробки та відпрацювання методики

Локус	Послідовність нуклеотидів праймерів	Розміри в п.н.
OARFCB 20	F: 5'- GGAAAACCCCATATATACCTATAC -3' R: 5'- AAATGTGTTTAAGATTCCATACATGTG -3'	87-113
INRA172	F: 5'- CCAGGGCAGTAAAATGCATAACTG -3' R: 5'- GGCCTTGCTAGCCTCTGCAAAC -3'	126-160
INRA063	F: 5'- GACCACAAAGGGATTTGCACAAGC -3' R: 5'- AAACCACAGAAATGCTTGGGAAG -3'	169-201
CSR247	F: 5'- GGA CTTGCCAGAACTCTGCAAT -3' R: 5'- CACTGTGGTTTGTATTAGTCAGG -3'	209-255
MAF214	F: 5'- AATGCAGGAGATCTGAGGCAGGGACG -3' R: 5'- GGGTGATCTTAGGGAGGTTTTGGAGG -3'	189-265
AMEL	F: 5'- CAGCCAAACCTCCCTCTGC -3' R: 5'- CCCGCTTGGTCTTGTCTGTTGC -3'	X - 264 Y - 217

Типування тварин за мікросателітними локусами геному передбачає ПЛР-ампліфікацію відповідних фрагментів ДНК та їх електрофоретичний аналіз із визначенням розмірів ампліфікованих фрагментів. За опрацьованими літературними джерелами визначено склад реакційної суміші для ПЛР та режими ампліфікації STR-локусів [20, 21, 22, 23]. Але саме ці етапи роботи і потребували основної оптимізації та доопрацювання.

Після підбору мікросателітних локусів наступним етапом була оптимізація методики та умов проведення полімеразної ланцюгової реакції для STR-локусів. Для цього було підбрано рецептуру суміші для проведення ПЛР. В результаті було розроблено відповідну реакційну суміш об'ємом 10 мкл такого складу: dH₂O – 6,8 мкл; Буфер-ПЛР 10-х – 1,0 мкл; MgCl₂ – 0,7 мкл; dNTP суміш (2мМ кожного) – 0,2 мкл; два праймера (10 пкМ/мкл) – 0,2 мкл; Taq-полімераза (5 ед/мкл) – 0,1 мкл; ДНК 50-100 нг – 1,0 мкл (табл. 2). Кожен з п'яти локусів ампліфікувався окремо.

Наступним кроком оптимізації методики проведення досліджень був підбір оптимальних температур та часових параметрів і кількість циклів проведення етапів реакції – однакових для всіх досліджуваних локусів.

Таблиця 2. Склад реакційної суміші для ПЛР

Компонент	Об'єм, мкл
10-х – Таq-буфер	1,0
MgCl ₂ (15 mM)	0,7
dNTP mix (2mM)	0,2
Праймери (10 μM)	0,2
Таq-полімераза (5U/μl)	0,1
Бідістильована H ₂ O	6,8
ДНК-матриця	1,0
Загальний об'єм	10,0

В результаті, використовуючи досвід попередніх дослідів було підібрано оптимальні умови проведення реакції за наступними температурними режимами: початкова денатурація – 3 хв при 94 °С, далі 35 цикла: денатурація – 10 с при 95 °С, відпал праймерів – 30 с при 57 °С і синтез – 60 с при 68 °С. Завершує реакцію термінальна елонгація – 6,5 хвилин при 68 °С (табл. 3).

Таблиця 3. Остаточні, підібрані режими ампліфікації STR-локусів

Температура	Час	Етап	
94 °С	3 хв	початкова денатурація	
95 °С	10 с	денатурація	35 циклів
57 °С	30 с	відпал праймерів	
68 °С	60 с	синтез	
68 °С	6,5 хв	кінцевий синтез	
4 °С		зберігання	

Дослідження STR–локусів доцільно проводити з використанням поліакріламідних гелів різної щільності [24], тому продукти ампліфікації (амплікони) розділяли методом електрофорезу у 9-12% ПААГ. Для цього було виготовлено камеру для вертикального електрофорезу (прибор Стадієра) (рисунок 1) та відповідне супутнє обладнання (скельця, спейсери, гребінки) [25].

Відпрацьовано методики приготування поліакріламідного гелю та його формування. У таблицях 4 та 5 наведено рецептури приготування відповідних розчинів та необхідна кількість реактивів [26].

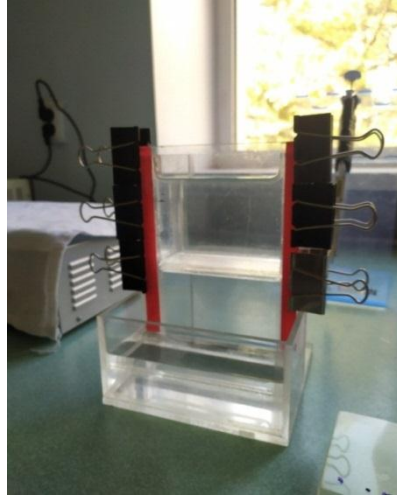


Рисунок 1. Камера для вертикального електрофорезу (прибор Стадієра)

Таблиця 4. Приготування початкових розчинів

Розчин на ПААГ	
Буфер А (рН = 8,9): Трис – 36,6 г 1 N HCl – 48 мл H ₂ O до 100 мл (без 1 N HCl довести к HCl)	Буфер Б (рН = 6,7): Трис – 6,0 г 1 N HCl – 48 мл H ₂ O до 100 мл (без 1 N HCl довести к HCl)
Буфер В МБА – 0,8 г АКА – 28 г H ₂ O до 100 мл <i>Бісакриламід – 0,735 г</i> <i>Акриламід - 28,0 г</i> <i>H₂O – до 100 мл</i>	Буфер Г МБА – 2,5 г АКА – 10 г H ₂ O – до 100 мл

У дослідженнях використовували ступінчастий нативний електрофорез який проводили за методикою Лемлі, що характеризується полімеризацією у одній системі відразу двох

Таблиця 5. Приготування 12% ПААГ

Розділяючий гель: Нижній	Концентруючий гель: Верхній
А – 2,345 мл В – 9,166 мл Н ₂ О – 10,211 мл PSA – 0,275 мл TEMED – 80 мкл	Б – 500 мкл Г – 2 мл Н ₂ О 2,5 мл PSA – 40 мкл TEMED – 40 мкл

гелів: поділяючого дрібнопористого і безпосередньо над ним концентруючого крупнопористого. Концентруючий – 3% ПААГ довжиною 1,0-1,5 см, поділяючий – 12% ПААГ довжиною 13,5-14,0 см [27].

Електрофорез проводили 5 годин за напруги 160-200 V та сили струму 10-15 mA. Після проходження нанесених зразків через концентруючий гель камеру поміщали у холодильник з температурою +4 °C, де і тримали до закінчення розгонки.

Візуалізацію електрофореграм проводили шляхом фарбування гелів у розчині бромистого етидію (0,5 мкг/мл) з експозицією 15 хвилин та наступною багаторазовою відмивкою у дистильованій воді.

Детекцію фрагментів ДНК проводили в ультрафіолетовому світлі на транслюмінаторі (Neogen, Україна) з довжиною хвилі 312 нм з наступним фотографуванням електрофореграм цифровою камерою. Диференціацію ампліконів за розмірами проводили за допомогою маркера молекулярних мас pUC19/MspI (рис. 2-6).

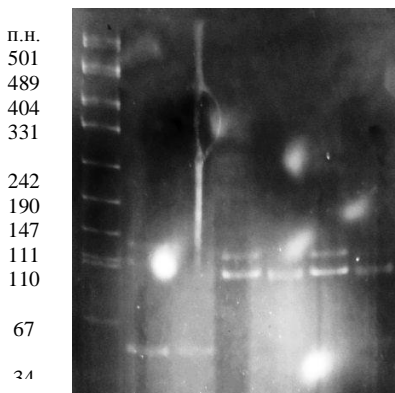


Рисунок 2. Електрофореграма локусу OarFCB20 (TG)n (87-113 п.н), 12% ПААГ, маркер pUC19/MspI

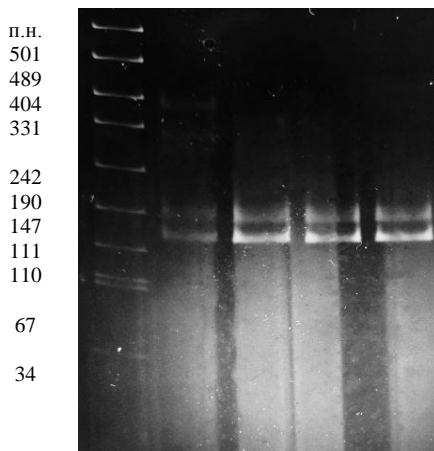


Рисунок 3. Электрофореграмма локусу INRA172 (TG)_n, (126-160 п.н) 12% ПААГ, маркер рUC19/MspI

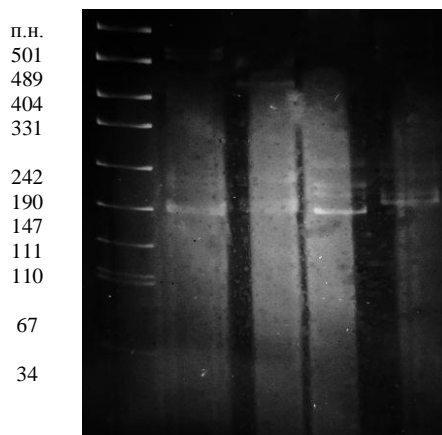


Рисунок 4. Электрофореграмма локусу INRA063 (AC)_n, (169-201 п.н.) 12% ПААГ, маркер рUC19/MspI

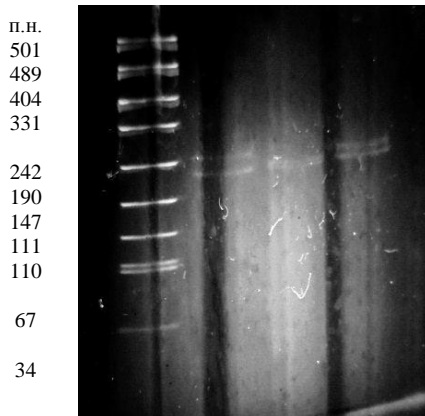


Рисунок 5. Електрофореграма локусу CSRD247 (CA)n, (209-255 п.н.) 12% ПААГ, маркер рUC19/MspI

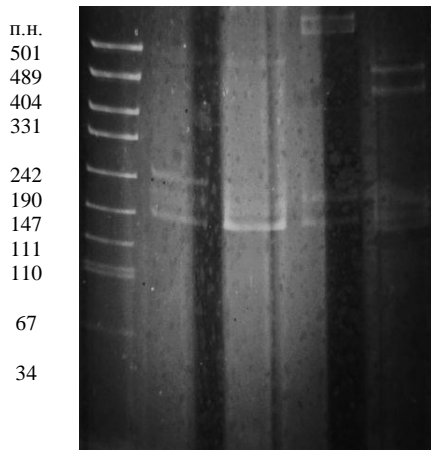


Рисунок 6. Електрофореграма локусу MAF214 (GT)n, (189-265 п.н.) 12% ПААГ, маркер рUC19/MspI

Ген амелогенину є потенційним ДНК-маркером ідентифікації статевої належності тварин. Структура AMEL досліджена у великої рогатої худоби [28], овець [29], кіз [30] та людини [31]. Між X та Y – специфічними варіантами гену амелогенину спостерігається

поліморфізм за довжиною послідовностей, тому він може використовуватися для визначення статі на молекулярно-генетичному рівні. Цей локус Міжнародне товариство генетики тварин рекомендує використовувати у мультиплексних STR-панелях для збільшення інформативності. Саме тому у овець асканійської селекції було досліджено ген амелогенину та визначено, що у них AMEL на X хромосомі характеризується довжиною фрагмента 264 п.н, а на Y хромосомі – 217 п.н., що повністю співпадає та підтверджується дослідженнями інших авторів [29] (рис. 7).

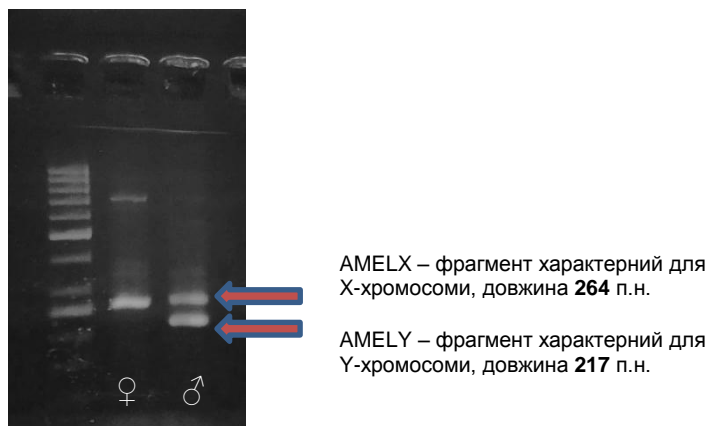


Рисунок 7. Електрофореграма локусу AMEL, 2,5% агарозний гель ДНК-маркер 50 bp

Розмір ампліфікованих фрагментів визначали з використанням спеціалізованого програмного забезпечення TotalLab 2.01 [32] та GelAnalyzer 19.1 [33].

Отримані після ампліфікації ДНК-фрагменти відповідають алелям локусів MAF214 (189-265 п.н.), CSRD247 (209-255 п.н.), INRA063 (169-201 п.н.), INRA172 (126-160 п.н.), OarFCB20 (87-113 п.н.), мають різну молекулярну масу, що дає можливість використовувати їх в мультиплексній ПЛР. Наступним етапом досліджень буде розробка 4-х плексної інформативної STR-панелі для характеристики генетичного різноманіття овець різного походження та вивченні ефективності застосування мікросателітів в системах розведення овець різного напрямку продуктивності.

Висновки. 1. Розроблено та оптимізовано методику визначення STR-локусів у племінних стадах овець асканійської селекції. Визначено склад реакційної суміші для ПЛР та режими ампліфікації STR-локусів для використання їх у дослідженнях генетичної структури існуючих та новостворюваних порід і типів овець, рівня філогенезу окремих генофондів вітчизняної та зарубіжної селекції.

2. У овець асканійської селекції досліджено п'ять поліморфних мікросателітних локусів, зокрема: MAF214 (189-265 п.н.), CSRD247 (209-255 п.н.), INRA063 (169-201 п.н.), INRA172 (126-160 п.н.), OarFCB20 (87-113 п.н.).

3. Отримані після ампліфікації ДНК-фрагменти мають різну молекулярну масу, що дає можливість використовувати їх в мультиплексній ПЛР для характеристики генетичного різноманіття овець різного походження та вивчення ефективності застосування мікросателітів в системах розведення овець різного напрямку продуктивності.

Отримані після ампліфікації ДНК-фрагменти відповідають алелям локусів MAF214 (189-265 п.н.), CSRD247 (209-255 п.н.), INRA063 (169-201 п.н.), INRA172 (126-160 п.н.), OarFCB20 (87-113 п.н.), мають різну молекулярну масу, що дає можливість використовувати їх в мультиплексній ПЛР. Наступним етапом досліджень буде розробка 4-х плексної інформативної STR-панелі для характеристики генетичного різноманіття овець різного походження та вивченні ефективності застосування мікросателітів в системах розведення овець різного напрямку продуктивності.

Список використаної літератури

1. Karslı T., and Soner Balcioglu M. Determination of genetic polymorphism in Guney Karaman local Turkish sheep breed by using STR markers. International Conference on Advances in Natural and Applied Sciences. *AIP Conf. Proc.* 1833. 2017. P. 020075-1–020075-4. DOI: 10.1063/1.4981723

2. Chistiakov D. A., Helleman B., Volckaert F. A.M. Microsatellites and their genomic distribution, evolution, function and applications: A review with special reference to fish genetics. *Aquaculture*. 2006. Vol. 255, Iss. 1–4. P. 1–29.

3. ISAG Comparison test. Panels of markers for parentage verification tested at the 2013-14, www.isag.org.uk.

4. Kawecka A., Krupinski J. Sheep in the Polish Carpathians: genetic resources conservation of the Podhale Zackel and Coloured Mountain Sheep. *Geomatix, Landmanagement and Landscape*. 2014. Vol. 1. P. 35–45.

5. Kawecka A., Piorkowska K. Characteristic of the genetic structure of native sheep breeds. *Ann. Anim. Sci.* 2011. Vol. 11, Iss.3. P. 371–382.

6. Ocampo R, Cardona H, Martinez R. Genetic diversity of Colombian sheep by microsatellite markers. *Chil. J. Agric. Res.* 2016. Vol.76. P. 40–47.

7. Pramod S., Kumarasamy P., Rosalyn Mary Chandra A., Sridevi P. and Rahumathulla P.S. Molecular characterization of vembur sheep (*Ovis aries*) of south India based on microsatellites. *Indian J. Sci. Technol.* 2009. Vol. 2, Iss.11. P. 55–58.
8. Radha P., Sivaselvam S. N., Kumarasamy P. and Kumanan K. Genetic diversity and bottleneck analysis of Kilakarsal sheep by microsatellite markers. *Indian J. Biotechnol.* 2011. Vol. 10. P. 52–55.
9. Radko A., Rychlik T., Słota E. Genetic characterization of the wrzosowka sheep breed on the basis of 14 microsatellite DNA markers. *Medycyna Weterynaryjna.* 2006. Vol. 62, Iss. 9. P. 1073–1075.
10. Rendo F, Iriondo M, Manzano C, Estonba A. Microsatellite based ovine parentage testing to identify the source responsible for the killing of an endangered species. *Forensic Sci. Int. Genet.* 2011. Vol. 5. P. 333–335.
11. Rychlik T., Radko A., Duniec M. Evaluating the usefulness of polymorphism of some genetic markers for parentage control of sheep. *Medycyna Weterynaryjna.* 2003. Vol. 59, Iss. 11. P. 1016–1018.
12. Wajid A., Wasim M., Yaqub T., Firyal S., Tayyab M., Siddique S. and Hussain T. Assessment of genetic diversity in Balochi and Rakhshani sheep breeds of Balochistan using microsatellite DNA markers. *J. Anim. and Plant Sci.* 2014. Vol. 24. P. 1348–1354.
13. Yilmaz O., Sezenler T., Sevim S., Cemal I., Karaca O., Yaman Y., Karadao O. Genetic relationships among four Turkish sheep breeds using microsatellites. *Turk. J. Vet. Anim. Sci.* 2015. Vol. 39, Iss. 5. P. 576–582.
14. Budak Yildiran F. A., Şükran Çakir. Analysis of Genetic Polymorphism with Microsatellite Method in Turkey Local Sheep Breeds. *Kaf. Univ. Vet. Fak. Deg.* 2012. Vol. 18, Iss. 1. P. 75–79.
15. Szumiec A., Radko A., Koseniuk A., Rubis D. and Bugno-Poniewierska M. Application of 11 STR markers for the evaluation of genetic variation in sheep. *ICAR Technical Series.* 2018. Vol. 23. P. 141–145.
16. Diez-Tasco'n C., Littlejohn R.P., Almeida P.R., Crawford A.M. Genetic variation within the Merino sheep breed: Analysis of closely related populations using microsatellite. *Animal Genetics.* 2000. Vol. 31. P. 243–251.

References

1. Karslı T., and Soner Balcıoğlu M. Determination of genetic polymorphism in Guneş Karaman local Turkish sheep breed by using STR markers. International Conference on Advances in Natural and Applied Sciences. *AIP Conf. Proc.* 1833. 2017. P. 020075-1–020075-4. DOI: 10.1063/1.4981723
2. Chistiakov D. A., Helleman B., Volckaert F. A.M. Microsatellites and their genomic distribution, evolution, function and applications: A review with special reference to fish genetics. *Aquaculture.* 2006. Vol. 255, Iss. 1–4. P. 1–29.
3. ISAG Comparison test. Panels of markers for parentage verification tested at the 2013-14, www.isag.org.uk.
4. Kawecka A., Krupinski J. Sheep in the Polish Carpathians: genetic resources conservation of the Podhale Zackel and Coloured Mountain Sheep. *Geomatics, Landmanagement and Landscape.* 2014. Vol. 1. P. 35–45.

5. Kawecka A., Piorkowska K. Characteristic of the genetic structure of native sheep breeds. *Ann. Anim. Sci.* 2011. Vol. 11, Iss.3. P. 371–382.
6. Ocampo R, Cardona H, Martinez R. Genetic diversity of Colombian sheep by microsatellite markers. *Chil. J. Agric. Res.* 2016. Vol.76. P. 40–47.
7. Pramod S., Kumarasamy P., Rosalyn Mary Chandra A., Sridevi P. and Rahumathulla P.S. Molecular characterization of vembur sheep (*Ovis aries*) of south India based on microsatellites. *Indian J. Sci. Technol.* 2009. Vol. 2, Iss.11. P. 55–58.
8. Radha P., Sivaselvam S. N., Kumarasamy P. and Kumanan K. Genetic diversity and bottleneck analysis of Kilakarsal sheep by microsatellite markers. *Indian J. Biotechnol.* 2011. Vol. 10. P. 52–55.
9. Radko A., Rychlik T., Słota E. Genetic characterization of the wrzosowka sheep breed on the basis of 14 microsatellite DNA markers. *Medycyna Weterynaryjna.* 2006. Vol. 62, Iss. 9. P. 1073–1075.
10. Rendo F, Iriondo M, Manzano C, Estonba A. Microsatellite based ovine parentage testing to identify the source responsible for the killing of an endangered species. *Forensic Sci. Int. Genet.* 2011. Vol. 5. P. 333–335.
11. Rychlik T., Radko A., Duniec M. Evaluating the usefulness of polymorphism of some genetic markers for parentage control of sheep. *Medycyna Weterynaryjna.* 2003. Vol. 59, Iss. 11. P. 1016–1018.
12. Wajid A., Wasim M., Yaqub T., Firyal S., Tayyab M., Siddique S. and Hussain T. Assessment of genetic diversity in Balochi and Rakhshani sheep breeds of Balochistan using microsatellite DNA markers. *J. Anim. and Plant Sci.* 2014. Vol. 24. P. 1348–1354.
13. Yilmaz O., Sezenler T., Sevim S., Cemal I., Karaca O., Yaman Y., Karadao O. Genetic relationships among four Turkish sheep breeds using microsatellites. *Turk. J. Vet. Anim. Sci.* 2015. Vol. 39, Iss. 5. P. 576–582.
14. Budak Yildiran F. A., Şükran Çakir. Analysis of Genetic Polymorphism with Microsatellite Method in Turkey Local Sheep Breeds. *Kaf. Univ. Vet. Fak. Deg.* 2012. Vol. 18, Iss. 1. P. 75–79.
15. Szumiec A., Radko A., Koseniuk A., Rubis D. and Bugno-Poniewierska M. Application of 11 STR markers for the evaluation of genetic variation in sheep. *ICAR Technical Series.* 2018. Vol. 23. P. 141–145.
16. Diez-Tasco'n C., Littlejohn R.P., Almeida P.R., Crawford A.M. Genetic variation within the Merino sheep breed: Analysis of closely related populations using microsatellite. *Animal Genetics.* 2000. Vol. 31. P. 243–251.