

Mikroszatellit markerek vizsgálata dorper juh fajtában

Csizmár Nikolett–Jávor András–Kusza Szilvia

Debreceni Egyetem Mezőgazdaság-, Élelmiszertudományi és Környezetgazdálkodási Kar,
Állattudományi, Biotechnológiai és Természetvédelmi Intézet, Debrecen
csizmar@agr.unideb.hu

ÖSSZEFOGLALÁS

A nem gyapjas, vedlő juhok létszáma világszerte meghaladja a 60 milliót. Számuk és jelentőségük növekszik, az elmúlt évtizedekben Észak-Amerikában, Ausztráliában, Új-Zélandon és Európában egyaránt megjelentek. Magyarországon úttörőnek bizonyult közülük a dél-afrikai dorper, mely 2006-ban került az országba. Dél-Afrika második legnagyobb létszámban tenyésztett juhajtaja, melyet a dorset horn és a somáli juh keresztezésével alakítottak ki. Az európai uniós tagállamok célja az adott fajtát tekintve kis populációik növelése, javítva a termelési tulajdonságokat, elkerülve a beltenyésztettséget. Problémát jelenthet azonban a megfelelő tenyészanyaghoz, illetve állathoz való hozzájutás a kis populációk, valamint a gyaníthatóan közös kiinduló származási pont révén. A különböző molekuláris genetikai módszerek segítségével képet kaphatunk az állományok genetikai háttéréről. Manapság a mikroszatellit a legismertebb, leggyakrabban alkalmazott genetikai markerek közé tartoznak, hisz kimutatásuk gyors és pontos, valamint könnyen ismételhető eredményt adnak. Mivel nincs konkrét összefoglaló adat a különböző európai uniós országok dorper populációinak genetikai háttéréről, illetve a populációk közötti diverzitásról, jelen munkánk során szeretnénk 31 kiválasztott mikroszatellit alkalmazhatóságát megvizsgálni és reakciófeltételeit optimalizálni, első lépésként szolgálva ezzel a teljes genetikai háttér feltérképezéséhez a különböző EU-s dorper populációk tekintetében.

Kulcsszavak: dorper, mikroszatellit, juh, genetikai diverzitás

SUMMARY

Number of not woolly and molty sheep exceeds 60 million throughout the world. Their numbers and their importance is growing, still they have appeared in the past two decades all over in North-America, Australia, New-Zealand and also in Europe. The South African Dorper has been a pioneer among them in Hungary. It was introduced in 2006 in the country. The Dorper sheep is the second largest breed in South Africa, which was developed from the crossing of Dorset Horn and the Blackhead Persian. The aim of the EU Member States in terms of this specific breed is increasing the small populations, improving the productive qualities, in addition to this avoiding inbreeding. However, finding appropriate breeding stock is difficult due to the small size of available populations and also to the suspected common of origin. With the help of various molecular genetic methods we could get a total view of the genetic background of these flocks. Nowadays the most commonly known and used genetic markers are microsatellites, because their applications give fast, accurate and easily reproducible results. There is no specific descriptive information on the genetic background of Dorper populations in the various EU countries, also regarding diversity between populations. Therefore in our work we want to optimize the conditions of applicability of 31 selected microsatellite reactions as a first step of mapping the entire genetic background of the different EU Dorper populations.

Keywords: Dorper, microsatellite, sheep, genetic diversity

BEVEZETÉS

A mi éghajlatunkon alapvetően vedlőgyapjasként reprezentált dorper juhajtaja Dél-Afrikából származik, az afrikai zsírfarú somáli juh, valamint az angol dorset horn fajta keresztezéséből. Az említett két keresztezési partner előnyös tulajdonságait felhasználva – előbbi kiváló anyai nevelő- és ellenálló képességét, utóbbi imponáló húsformáit – a mai napig igyekeznek megtartani az 50–50%-os vérhányadot. A Dorper 1947 óta nevezhetjük önálló fajtának, ezt követően három évvel pedig megalakult a Dorper Tenyésztők Egyesülete (Milne 2000, Lategan 2004). Mindezek után rohamléptekkel terjedt a fajta, azonban az Európai Unió szigorú szabályai lehetetlenné tették az élő állat, termékenyítő anyag, vagy embrió behozatalát Dél-Afrikából. Svájc nem Európai Unió ország révén tenyészanyaghoz jutott a fajta őshazájából, így ennek köszönhetően a tenyészállományok döntő többsége ezen állatok leszármazottjai. Minden európai uniós állam tenyészcéljai közt szerepel azonban a kis létszámú populációk növelése, javítva a termelési tulajdonságokat, a beltenyésztettséget elkerülése mellett.

A kis egyedszámú populációk esetében különösen fontos, hogy a beltenyésztés, illetve a vérfriítés nélküli tenyésztés csökkenti a genetikai variabilitást, szűkítve ezzel a heterozigotizációt. Ennek elkerülése érdekében a különböző molekuláris genetikai módszerek segítségével képet kaphatunk az állományok jelenkori genetikai háttéréről, a populációk közötti kapcsolatokról, beltenyésztettség mértékéről. Korábban a genetikai távolság vizsgálatok során bármilyen mérhető, látható tulajdonságot, illetve fehérje markereket (vércsoport, antigének, enzimek különböző formái) használtak. Azonban a molekuláris genetikai gyors fejlődésének köszönhetően ma már elsősorban genetikai markereket alkalmaznak (Bátoriné 2006). Ezek előnyösebbek, mint a fehérje markerek, mivel pontosabb eredményt adnak és elérhetővé váltak minden laboratórium számára, anyagi szempontból is.

A marker lehet gén, a DNS egy kis szakasza ismeretlen funkcióval, illetve azzal kapcsolatos öröklődő szekvencia részlet. Az egyik leggyakrabban használt marker a genetikai diverzitás vizsgálatoknál, a mikroszatellit. A mikroszatellit a genomban elszórtan elhelyezkedő egy, kettő, három vagy négy bázispár ismét-

lődésből álló, általában 50–300 bp hosszú szekvencia-részletek, elsősorban a nem kódoló régióban helyezkednek el (Buduram et al. 2005). Sokallélos rendszerek, nagyfokú polimorfizmussal jellemezhetők, ami az ismétlődő motívumok változó hosszából és bázisösszetételéből adódik (Tautz és Renz 1984, Tautz et al. 1986, Litt és Luty 1989). Manapság a legismertebb, leggyakrabban alkalmazott genetikai markerek közé tartoznak, hisz kimutatásuk gyors és pontos, valamint könnyen ismételhető eredményt adnak. Kimutatásuk jelenleg PCR-reakció (Polimerase Chain Reaction) alapú fragment-analízissel történik (Mullis és Faloona 1987). Új mikroszatellit izolálása egy fajban idő és pénzigényes folyamat, ezért a kutatók gyakran dolgoznak a rokonfajok már azonosított mikroszatellitjeivel. Például a szarvasmarha mikroszatellitiek döntő hányada használható a juh fajban is (De Gortari et al. 1998).

Az elmúlt években hatalmas fejlődés volt tapasztalható a különböző mikroszatellitiek juh populációkon belüli és közötti genetikai diverzitásának vizsgálatában (Saitbekova et al. 2001, Mwacharo et al. 2002, Tomasco et al. 2002, Ibeagha-Awemu és Erhardt 2004, Kusza et al. 2008, Quiroz et al. 2008, Álvarez et al. 2012, Al-Atiyat et al. 2014, Ceccobelli et al. 2015, Elbeltagy et al. 2015, Zhao et al. 2015), így jelen kutatásunkban mi is ezekből válogattunk. Számos irodalom foglalkozik a különböző nagy egyedlétszámú dél-afrikai juh-fajták populáció genetikájával. Így – mint ezek kialakításában résztvevő keresztezési partnert – sok kutató használta fel diverzitás vizsgálatában kontroll fajtának a dorper (Campher et al. 1998, Peters et al. 2010, Soma et al. 2012). Jelen munka az első lépéseket jelenti a kiválasztott mikroszatellitiek alkalmazásának optimalizálása révén.

Következő lépés lesz a genotipizálás, mely a PCR-termékek kapilláris szekvenátor gépen történő futtatását jelenti, ez a legbiztosabb eljárás a genotípus egyértelmű azonosítására. Ezek alkalmazásával meg lehet állapítani egy adott DNS szakasz pontos hosszát vagy bázissorrendjét. A kapilláris gélelektroforézis során az elválasztás egy 10–100 μm külső átmérőjű üveg kapillárisban történik, mely folyékony polimerrel van töltve. A fragmentek kimutatását a PCR-reakcióban alkalmazott primerek fluoreszcens jelölése teszi lehetővé. A kimutatás során a fluoreszcens festéket lézertény gerjeszti, melynek hatására eltérő hullámhosszú emissziókat bocsát ki. Ezeket az emissziós adatokat a számítógép a kapilláris egy adott pontján detektálja. A termékek hosszát és intenzitását egy standardhoz viszonyítva értékeli a készülék (Pritchard et al. 1995, Wang et al. 1996).

ANYAG ÉS MÓDSZER

Mintagyűjtés

Szem előtt tartva az Európai Unió szigorú egészségügyi szabályait, illetve a gyűjtés gyorsabbá tételét, árát, nem vér-, hanem gyapjú-, illetve szőrmintákat gyűjtöttünk Franciaország, Németország, az Egyesült Királyság, Csehország, Ausztria, Románia, Magyarország, Svédország, valamint Dél-Afrika területéről. Dorper és fehér dorper fajtából összesen 802 mintát sikerült gyűj-

tenünk, 28 tenyészetből, különböző populáció számmal. A szőröket önzáródó műanyag tasakokban külön engedély nélkül hozhattuk át a határon, mindezek mellett számos minta szállítása postai úton is kivitelezhető volt.

Genomiális DNS tisztítás

A gyapjú/szőr feldolgozására, valamint a további labormunkálatokra a Debreceni Egyetem MÉK Állatgenetikai Laboratóriumában került sor. Első lépésként a tárolt gyapjú, valamint szőr mintákból, azok szőrhagymájából genomiális DNS-t izoláltunk (FAO/IAEA 2004). Mivel elsődleges célunk a PCR-kondíciók és az ehhez szükséges reakcióelegy meghatározása volt, kezdetben 100 minta került izolálásra. 1,5 ml-es eppendorf csövekbe 8–12 szőrhagymát vágunk – ügyelve arra, hogy a hagyma felett maximum 0,5 cm szőrszál legyen – majd 100 μl Hair Buffer-t adunk hozzá, melynek összetétele: 250 μl Tween 20, 5 ml MgCl_2 nélküli PCR-reakcióhoz használt 10 mM-os puffer, 5 ml MgCl_2 (25 mM), mindezt dH_2O -val 50 ml-re kiegészítve. A reakció elősegítése érdekében minden mintához 1 μl proteináz K-t (20 nM) adunk. Ezt követően az eppendorf csövek a mintáinkkal 60 percre 37 °C-os, majd 20 percre 80 °C-os vízfürdőbe kerültek inkubálásra. Az izolálás sikerességének elbírálása érdekében koncentráció-mérést végeztünk NanoDrop 1000 Spectrophotometer segítségével. A PCR-reakció előkészítéseként a minták koncentrációját 10 és 100 $\text{mg}/\mu\text{l}$ közé eső értékre hígítottuk.

Mikroszatellit kiválasztás, felsokszorosítás (PCR-reakció), ellenőrzés (agaróz gélelektroforézis)

Kiválasztásra került 31 mikroszatellit a Food and Agricultural Organization (FAO) és az International Society for Animal Genetics (ISAG) ajánlása, valamint korábbi tanulmányokban alkalmazott primerek alapján (1. táblázat). Gradiens (több hőmérsékleten hibridizáló) PCR eredményeként meghatározásra került minden primer feltapadási hőmérséklete.

Az optimalizálás fő momentumai a PCR-kondíciók, illetve az ehhez szükséges reakcióelegy meghatározása volt. Az amplifikációhoz szükséges elegy kiinduló összetevői a következők voltak: 1 μl izolált DNS, 1 μl dNTP (2 mM) /Fermentas/; 1 μl 10X GoTaq Flexi Buffer (50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl pH 8,3, 1% Triton X-100)/Promega, Madison, USA/; 0,88 μl MgCl_2 (25 mM) /Promega, Madison, USA/; 0,2 μl reverse és 0,2 μl fluoreszcens jelölt forward primer (20 pmol/ μl) /SIGMA/; 0,1 μl GoTaq Flexi DNA polymerase (5u/ μl) /Promega, Madison, USA/; 5,62 μl dH_2O . Egyidejűleg minden sikertelen reakciót követően maximum két komponens mennyiségét változtattuk. A PCR-reakció kiinduló kondíciója az alábbi táblázatban látható (2. táblázat). A primerek kapcsolódásának hőfoka a primer feltapadási hőmérséklete szerint változott, melyet korábban gradiens PCR-rel határoztunk meg. Az optimalizálás során az egyéb hőmérsékleteket nem, csupán az időt, valamint a ciklusok számát változtattuk.

A PCR-termékek sikerességét 2%-os előre elkészített agaróz gélen gélelektroforézissel ellenőriztük.

1. táblázat

Az alkalmazott primerek főbb jellemzőikkel

Név(1)	Hossz (bp)(2)	Feltapadási hőm. (°C)(3)	Forrás(4)
Agla226	134–154	60	Joshi et al. (2012)
BL1022	82–84	58	Smith et al. (1997)
BM1314	136–176	55	Bishop et al. (1994)
BM1818	258–284	55,9	Armstrong et al. (2006)
BM2023	118–144	56,1	Primer pair sequences in USDA-MARC database
BM2901	110–132	56,6	Stone et al. (1995)
BM6506	184–212	54	Bishop et al. (1994)
BMS1788	105–116	55	De Gortari et al. (1997)
CSSM43	237–273	54	Moore et al. (1994)
ILSTS11	155–275	58	Brezinsky et al. (1993)
ILSTS62	199–225	49,2	Kemp et al. (1995)
Inra127	181–215	54	Vaiman et al. (1992)
MaF214	183–263	68	Bozzi et al. (2009)
MAF35	104–122	60	Swarbrick et al. (1991)
MAF65	116–140	59	Buchanan et al. (1992)
Maf70	128–175	60	Crawford et al. (1992)
McM218	140–160	58,2	Davies és Maddox (1994)
McM527	150–185	60	Crawford et al. (1995)
McMa0011	176–222	55,8	Bozzi et al. (2009)
McMa7	228–270	60	Beh et al. (2000)
OarAE119	147–185	60,1	Penty et al. (1993)
OarCP026	120–170	64	Ede et al. (1994a)
OarCP34	111–125	59,7	Ede et al. (1994b)
OarFCB20	86–128	62,5	Buchanan és Crawford (1992)
OarHH0035	112–138	56,4	Henry et al. (1993)
OarHH0041	110–140	60,4	Henry et al. (1993)
RM067	81–83	57,5	Kossarek et al. (1993)
TCRB	227–268	60,9	Buitkamp et al. (1993)
TGLA116	112–156	58,1	Georges és Massey (1992)
TGLA357	113–154	65,5	Georges és Massey (1992)
TGLA53	114–143	60	Crawford et al. (1995)

Table 1: The used primers and their main characteristics
Name of primer(1), Size range(bp)(2), Annealing temperature (°C)(3), Reference(4)

2. táblázat

A PCR-reakció kondíciói

Kezdő denaturáció(1)	95 °C	10 min	
Denaturáció(2)	94 °C	20 sec	
Primerek kapcsolódása(3)	60 °C	30 sec	35 ciklus(6)
Elongáció(4)	70 °C	30 sec	
Záró szakasz(5)	73 °C	20 min	
	10 °C	∞	

Table 2: Conditions of PCR reactions

Initial denaturation(1) Denaturation(2), Annealing(3), Extension(4), Final extension(5), 35 cycle(6)

A gél összetétele a következő volt: 2%-os Seakem-agaróz, 1x TAE (Tris-ecetsav-EDTA) puffer, majd a termékeket GelRed (Biotium, USA) DNS festékkel festettünk. Az agaróz gélre mintánként 3 µl-t vittünk fel, ezt követően 100 V feszültségen futtattuk, míg a mintánként 3 µl jelzőfesték el nem érte a gél alját. A különböző mikroszatellitek – eltérő fragmenthossz alapján – eltérő méretű sávokat eredményeztek. A bázispárok hossza mind 80 és 300 közé estek, így 50 bp-os létrát használtunk a gél-elektroforézis során.

EREDMÉNYEK

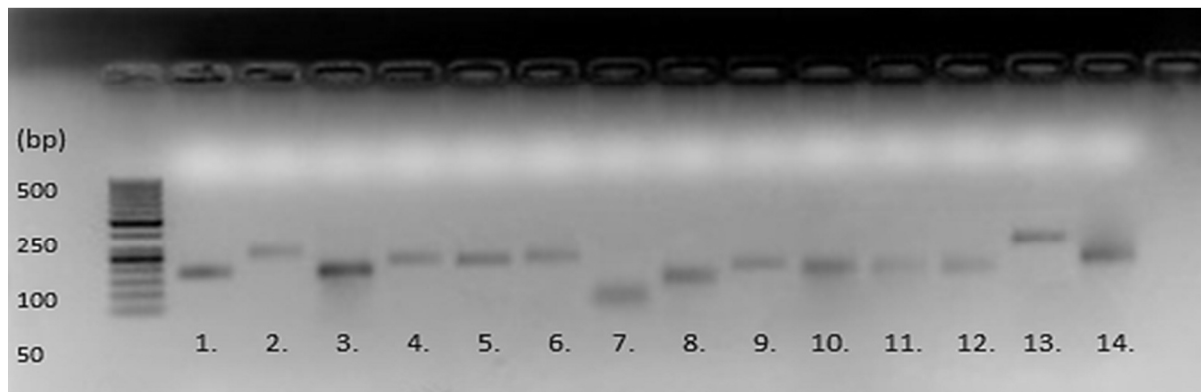
A vizsgált 31 mikrosatellit közül, több hetes optimalizálási reakciók után 14 (McM527, BM1818, AGLA226, INRA127, MAF214, TCRB, TGLA357, MAF35, OarAE119, TGLA53, MAF65, BMS1788, McMa7, MAF70) bizonyult sikeresen amplifikálhatónak a meglévő izolált genomális dorper DNS mintákon (1. ábra). Ez a szám ma már kevésnek mondható a diverzitás vizsgálatok elemzéséhez, azonban ezekkel is kaphatunk egy képet a vizsgált állomány genetikai szerkezetéről. A vizsgálatok pedig folytathatóak további markerek bevonásával és az anyagi források bővülésével.

KÖVETKEZTETÉSEK

Mivel vizsgálataink megkezdését hosszú mintagyűjtési időszak előzte meg, így a laboratóriumi vizsgálatokat éppen lehetőség volt megkezdni, és a már meglévő primerek hatékonyságát optimalizálni. A mikrosatellit vizsgálatokkal a következő általánosan használt mutatókkal mindenképpen tervezzük számolni: várt és valós heterozigotizációs érték, az állományokra és lókuszkokra, Hardy-Weinberg egyensúly, különböző beltenyésztettségi mutatók, Wright-féle indexek, különböző távolság értékek (Nei, Reynolds), átlagos allél-szám lókuszonként, effektív populáció méret, palacknyak-hatás stb.

Összességében elmondható, hogy jelen munka kiindulási pontja lehet a különböző európai uniós dorper populációk közötti genetikai diverzitással foglalkozó tanulmányoknak.

1. ábra: A PCR-reakció utáni tisztítás sikerességének ellenőrzése gélelektroforézis segítségével



Megjegyzés: a képen a minták tisztítás után kapott termékei láthatóak 50 kb-os létrát alkalmazva a 14 működő mikroszatellittel. Mikroszatellitek: 1. McM527, 2. BM1818, 3. AGLA226, 4. INRA127, 5. MAF214, 6. TCRB, 7. TGLA357, 8. MAF35, 9. OarAE119, 10. TGLA53, 11. MAF65, 12. BMS1788, 13. McMa7, 14. MAF70

Figure 1: Verification of the efficiency of purification after the PCR was performed by gel electrophoresis

Note: This figure shows the product of our samples after purification using 50 kb length DNA ladder, with the 14 microsatellites what worked. Microsatellites: 1. McM527, 2. BM1818, 3. AGLA226, 4. INRA127, 5. MAF214, 6. TCRB, 7. TGLA357, 8. MAF35, 9. OarAE119, 10. TGLA53, 11. MAF65, 12. BMS1788, 13. McMa7, 14. MAF70

IRODALOM

- Al Atiyat, R. M.–Salameh, N. M.–Tabba Mohammad, J. (2014): Analysis of genetic diversity and differentiation of sheep populations in Jordan. *Electronic Journal of Biotechnology*. 17: 168–173.
- Álvarez, I.–Capote, J.–Traoré, A.–Fonseca, N.–Pérez, K.–Cuervo, M.–Fernández, I.–Goyach, F. (2012): Genetic relationships of the Cuban hair sheep inferred from microsatellite polymorphism. *Small Ruminant Research*. 104: 89–93.
- Armstrong, E.–Postiglioni, A.–Martínez, A.–Rincón, G.–Vega-Pla, J. L. (2006): Microsatellite analysis of a sample of Uruguayan Creole bulls (*Bos taurus*). *Genetics and Molecular Biology*. Copyright by the Brazilian Society of Genetics. Printed in Brazil. 29. 2: 267–272.
- Bátoriné Kusza Sz. (2006): A genetikai távolság becslése cigája és zackel fajtakörbe tartozó juhállományok között, valamint három nem klasszikus immungén kifejeződés és polimorfizmus vizsgálata sertésben. Debreceni Egyetem Állattenyésztési Tudományok Doktori Iskola. PhD értekezés. 61–62.
- Beh, K. J.–Riffkin, C. D.–Davies, K. P.–di Inno, K. L.–Maddox, J. F. (2000): Dinucleotide repeat polymorphism at the ovine McMA7, McMA10, McMA13, McMA16, McMA17, McMA27, McMA29, McMA42, McMA47 and McMA49 loci. *Animal Genetics*. 31: 228–229.
- Bishop, M. D.–Kappes, S. M.–Keele, J. W.–Stone, R. T.–Sunden, S. L. F.–Hawkins, G. A.–Solinas Toldo, S.–Fries, R.–Grosz, M. D.–Yoo, J.–Beattie, C. W. (1994): A genetic linkage map for cattle. *Genetics*. 136: 619–639.
- Bozzi, A. R.–Degl'Innocentia, P.–Rivera Diaz, B. P.–Nardia, L.–Crovetti, A.–Sargentini, C.–Giorgetti, A. (2009): Genetic characterization and breed assignment in five Italian sheep breeds using microsatellite markers. *Small Ruminant Research*. 85: 50–57.
- Brezinsky, L.–Kemp, S. J.–Teale, A. J. (1993): 5 polymorphic bovine microsatellites (ILSTS010–014). *Animal Genetics*. 24: 75–76.
- Buchanan, F. C.–Adams, L. J.–Littlejohn, R. B.–Maddox, J. F.–Crawford, A. M. (1994): Determination of Evolutionary Relationships among Sheep Breeds Using Microsatellites. *Genomics*. 22: 397–403.
- Buchanan, F. C.–Crawford, A. M. (1992): Ovine dinucleotide repeat polymorphism at the MAF 214 locus. *Animal Genetics*. 23: 394.
- Buduram, P.–van Wyck, J. B.–Kotze, A. (2005): Genetic characterization of indigenous Southern African sheep breeds using DNA markers. EAAP 56th Annual Meeting. Uppsala. 96.
- Buitkamp, F.–Chwaiger, W. S.–Eppelen, J. T. (1993): Vb6T-cell receptor elements in artiodactyls: conservation and germline polymorphisms. *Mammalian Genome*. 4: 504–510.
- Campher, J. P.–Hunlun, C.–Van Zyl, G. J. (1998): South African Livestock Breeding. South African Stud Book and Livestock Improvement Association. Bloemfontein. South Africa.
- Ceccobelli, S.–Karsli, T.–Di Lorenzo, P.–Marozzi, G.–Landi, V.–Maria Sarti, F.–Sabbioni, A.–Lasagna, E. (2015): Genetic diversity of Cornigliese sheep breed using STR markers. *Small Ruminant Research*. 123: 62–69.
- Crawford, A. M.–Dodds, K. G.–Ede, A. J.–Pierson, C. A.–Montgomery, G. W.–Garmonsway, H. G.–Beattie, A. E.–Davies, K.–Maddox, J. F. (1995): An autosomal genetic Linkage map of the sheep genome. *Genetics*. 140: 703–724.
- Crawford, A. M.–Swarbrick, P. A.–Buchanan, F. C. (1992): Ovine dinucleotide repeat polymorphism at the MAF70 locus. *Animal Genetics*. 23: 185–185.
- Davies, K. P.–Maddox, J. F. (1994): Ovine dinucleotide repeat polymorphism at the lysozyme (LYZ) locus. *Animal Genetics*. 25: 204.
- De Gortari, M. J.–Freking, B. A.–Kappes, S. M.–Leymaster, K. A.–Crawford, A. M.–Stone, R. T.–Beattie, C. W. (1997): Extensive genomic conservation of cattle microsatellite heterozygosity in sheep. *Animal Genetics*. 28: 274–290.
- De Gortari, M. J.–Freking, B. A.–Cuthbertson, R. P.–Kappes, S. M. (1998): A second-generation linkage map of the sheep genome. *Mammalian Genome*. 9: 204–209.
- Ede, A. J.–Pierson, C. A.–Crawford, A. M. (1994a): Ovine microsatellites at the OaKP9, OaQ16, OarCP20, OaQ21, OaKP21 and OaKP26 loci. *Animal Genetics*. 26: 129–130.
- Ede, A. J.–Pierson, C. A.–Crawford, A. M. (1994b): Ovine microsatellites at the OarCp34, OaQ38, OarCP43, OaQ49, OarCP73 and OaQ79 loci. *Animal Genetics*. 26: 130–131.

- Elbeltagy, A. R.–Aboul-Naga, A.–M.–Hassen, H.–Rischkowsky, B.–Mwacharo, J. M. (2015): Genetic diversity and structure in Egyptian indigenous sheep populations mirror patterns of anthropological interactions. *Small Ruminant Research*. 132: 137–142.
- FAO/IAEA (2004): Agriculture Biotechnology Laboratory, Handbook of Laboratory Exercises. IAEA Laboratories. Seibersdorf. Austria.
- Georges, M.–Massey, J. (1992): Polymorphic DNA markers in bovidae (World Intellectual Property Org., Geneva) WO Publication. No 92/13102.
- Henry, H. M.–Penty, C. J. M.–Pierson, A.–Crawford, A. M. (1993): Ovine microsatellites at the OarHH35, OarHH41, OarHH44, OarHH47 and OarHH64 loci. *Animal Genetics*. 24: 223.
- Ibeagha-Awemu, E. M.–Erhardt, G. (2004): Genetic variations between African and German sheep breeds, and description of a new variant of vitamin D-binding protein. *Small Ruminant Research*. 55: 33–43.
- Joshi, J.–Kumar Salar, R.–Banerjee, P.–Sharma, U.–Sudan Tantia, M.–Kumar Vjij, R. (2012): Comparative evaluation of Murrah breed with buffaloes of Indo-Gangetic Plains. *DHR International Journal of Biomedical and Life Sciences (DHR-IJBLS)*. 3. 1: 93–105.
- Kemp, S. J.–Hishida, O.–Wambuger, J. (1995): A panel of polymorphic bovine, ovine, and caprine microsatellite markers. *Animal Genetics*. 26: 299–306.
- Kossarek, M.–Su, X.–Grosse, W. M.–Finlay, W.–Barendse, W.–Hetzl, D. J. (1993): Bovine dinucleotide repeat polymorphism RM067. *J. Animal Science*. 71: 3178.
- Kusza, Sz.–Czeglédi, L.–Árnyasi, M.–Oláh, J.–Mihók, S.–Kovács, A.–Posta, J.–Dankó, G.–Besztercei, B.–Jávor, A. (2008): Preservation of Native Sheep and Turkey Breeds with Molecular Genetic Methods. *Analele Universitatii din Oradea Fascicula: Ecotoxicologie. Zootehnie Si Tehnologii de Industrie Alimentara*. 7. 7: 276–291.
- Lategan, D. (2004): Dorpers. Into the new century. Brochure & Training Manual. Dorper Sheep Breeders' Society of SA & Dolf Lategan. 5–9.
- Litt, M.–Luty, J. A. (1989): A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. *The American Journal of Human Genetics*. 44: 397–401.
- Milne, C. (2000): The history of the Dorper sheep. *Small Ruminant Research*. 36: 99–102.
- Moore, S. S.–Byrne, K.–Berger, K. T.–Barendse, W.–McCarthy, F.–Womack, J. E.–Hetzl, D. J. S. (1994): Characterisation of 65 bovine microsatellites. *Mammalian Genome*. 5: 84–90.
- Mullis, K. B.–Faloona, F. A. (1987): Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase chain reaction. [In: Wu R. (ed.) *Methods in Enzymology*.] Academic Press. San Diego. CA. 155: 335–350.
- Mwacharo, J. M.–Otieno, C. J.–Okeyo, A. M. (2002): Genetic variations between indigenous fat-tailed sheep populations in Kenya. *Small Ruminant Research*. 44: 173–178.
- Penty, J. M.–Henry, A. H. M.–Ede, J.–Rawford, A. M. C. (1993): Ovine microsatellites at the OarAEI6, OarAE54, OarAE57, OarAE119 and OarAE129 loci. *Animal Genetics*. 24: 219.
- Peters, F. W.–Kotze, A.–van der Bank, F. H.–Soma, P.–Grobler, J. P. (2010): Genetic profile of the locally developed Meatmaster sheep breed in South Africa based on microsatellite analysis. *Small Ruminant Research*. 90: 101–108.
- Pritchard, L. E.–Kawaguchi, Y.–Reed, P. W.–Copeman, J. B.–Davies, J. L.–Barnett, A. H.–Bain, S. C.–Todd, J. A. (1995): Analysis of the CD3 gene region and type 1 diabetes: Application of fluorescence-based technology to linkage disequilibrium mapping. *Human Molecular Genetics*. 4: 197–202.
- Quiroz, J.–Martinez, A. M.–Zaragoza, L.–Perezgrovas, R.–Vega-Plad, J. L.–Delgado, J. V. (2008): Genetic characterization of the autochthonous sheep populations from Chiapas, Mexico. *Livestock Science*. 116: 156–161.
- Saitbekova, N.–Schlapfer, J.–Dolf, G.–Gaillard, C. (2001): Genetic relationships in Swiss sheep breeds based on microsatellite analysis. *J. Animal Breeding Genetics*. 118: 379–387.
- Smith, T. P. L.–Lopez-Corrales, N. L.–Grosz, M. D. (1997): Anchoring of bovine chromosomes 4 (6), 7, 10, and 14 and linkage group telomeric ends via FISH analysis of lambda clones. *Mammalian Genome*. 8: 333–336.
- Soma, P.–Kotze, A.–Grobler, J. P.–van Wyk, J. B. (2012): South African sheep breeds: Population genetic structure and conservation implications. *Small Ruminant Research*. 103: 112–119.
- Stone, R. T.–Pulido, J. C.–Duyk, G. M. (1995): A small insert genomic library highly enriched for microsatellite repeat sequences. *Mammalian Genome*. 6: 714–724.
- Swarbrick, P. A.–Buchanan, F. C.–Crawford, A. M. (1991): Ovine dinucleotide repeat polymorphism at the W 3 5 locus. *Animal Genetics*. 22: 369–370.
- Tautz, D.–Renz, M. (1984): Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eukaryotic genomes. *Nucleic Acid Res*. 12. 10: 4127–4138.
- Tautz, D.–Trick, M.–Dover, G. A. (1986): Cryptic simplicity in DNA is a major source of genetic variation. *Nature*. 322: 652–656.
- Tomasco, I.–Wlasiuk, G.–Lessa, E. P. (2002): Evaluation of polymorphism in ten microsatellite loci in Uruguayan sheep flocks. *Genetics and Molecular Biology*. 25: 37–41.
- Vaiman, D. R.–Osta, D.–Mercier, C. G.–Levezie, I. H. (1992): Characterisation of five new bovine dinucleotide repeats. *Animal Genetics*. 24: 537–541.
- Wang, Y.–Wallin, J. M.–Ju, J.–Sensabaugh, G. F.–Mathies, R. A. (1996): High-resolution capillary array electrophoretic sizing of multiplexed short tandem repeat loci using energy-transfer fluorescent primers. *Electrophoresis*. 17: 1485–1490.
- Zhao, W.–Zhang, W.–Yang, D.–Zhang, L.–Wang, R.–Liu, A. (2015): Prevalence of *Enterocytozoon bienersi* and genetic diversity of ITS genotypes in sheep and goats in China. *Infection, Genetics and Evolution*. 32: 265–270.

