

## DIVERSITETI GJENETIK I DISA RACAVE LOKALE TË DELEVE NË SHQIPËRI DHE KOSOVË BAZUAR NË MARKERËT MIKROSATELITË

ANILA HODA<sup>1\*</sup>, HYSEN BYTYQI<sup>2</sup>, HAJRIP MEHMETI<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Fakulteti i Bujqësisë dhe Mjedisit, Universiteti Bujqësor i Tiranës, Shqipëri.

<sup>2</sup> Fakulteti i Bujqësisë, Universiteti i Prishtinës, Kosovë

Email: hodanila@yahoo.com

### PËRMBLEDHJA

Delet janë një specie shumë e rëndësishme në Shqipëri dhe Kosovë. Një kampjon prej 150 individësh, që përfaqësojnë pesë raca lokale delesh: "Bardhoka" e Shqipërisë, "Ruda", "Shkodrane", "Recka" dhe "Bardhoka" e Kosovës janë gjenotipizuar për 6 markerë mikrosatelitë. Në total u hasën 101 alele. Heterozigotia varionte nga 0.67 në 0.79. Numri mesatar i aleleve për racë varionte nga 5.83 deri në 8.83. Të gjitha racat me përjashtim të races "Ruda" shfaqin një deficit të heterozigotëve. Për secilën nga racat e studjuara deficiti i heterozigotëve është 3.4% dhe për të gjithë popullatën, ky deficit është 16.8%. Vlerat  $F_{ST}$  tregojnë se rreth 9.7% e variacionit gjenetik total mund të shpjegohet me anë të ndryshimeve midis racave dhe 92.3% shpjegohet me ndryshimet midis individëve. Distanca gjenetike janë të vogla dhe fluksi i gjeneve është relativisht i lartë.

**Fjalë kyçe:** diversiteti gjenetik, distancë gjenetike, mikrosatelitë, fluks gjenesh.

### ABSTRACT

Sheep are considered as an important livestock species in Albania and Kosovo. A sample of 150 individuals, representing five local sheep breeds: "Bardhoka" of Albania, "Ruda", "Shkodrane", "Recka" and "Bardhoka" of Kosovo is genotyped for 6 microsatellite markers. A total of 101 alleles were found. Heterozygosity varied from 0.67 to 0.79. Mean alleles number per breed varied from 5.83 to 8.83. All breeds, except "Ruda" showed heterozygote deficit. There is a heterozygotes deficit of 3.4% for each of analyzed breeds. This deficit is of 16.8% for the whole population. Level of apparent breed differentiation is

moderate and multilocus  $F_{ST}$  values indicate that around 9.7% of the total genetic variation could be explained by breed differences and the remaining 92.3% by differences among individuals. There is a small genetic distance between breeds and a rather great gene flow.

**Key words:** genetic diversity, genetic distance, microsatellite, gene flow.

### Hyrje

Delet janë një specie më të rëndësishme të kafshëve të fermës. Në Shqipëri dhe Kosovë ekzistojnë disa raca lokale, të cilat kryesisht janë klasifikuar duke u bazuar në karakteristikat morfologjike, si dhe në performancën e prodhimit. Delet u janë përshtatur kushteve ekstensive të menaxhimit, kullosin në kullota natyrore dhe janë rezistente ndaj sëmundjeve të ndryshme dhe parazitëve. Gjatë shekullit të 20-të, janë aplikuar mjaft kryqëzime me racat ekzotike të deleve, kryesisht Merinosi dhe Cigaia. Për pasojë individët racëpastër mund të gjenden kryesisht në zonat malore, ku kushtet mjedisore dhe cilësia e kullotës nuk janë të favorshme për racat ekzotike. Aktualisht, ekziston një rrezik i madh i zhdukjes së racave lokale të deleve, pasi për reth dy dekada nuk ekzistojnë më librat gjenealogjikë, mungojnë programet racore dhe racat lokale po zëvendësohen nga raca ekzotike, sipas preferencave të fermerëve. Për pasojë, përcaktimi i strukturës së popullatave, vlerësimi i diversitetit gjenetik të racave lokale me interes, janë fillimet për hartimin e programeve të konservimit.

Katër janë racat autoktone të deleve në Shqipëri: Bardhoka, Ruda, Shkodrane dhe Recka, të cilat janë

objekt i këtij studimi. Raca Bardhoka, është gjithashtu një nga racat më të rëndësishme të deleve edhe në Kosovë e cila është marrë në konsideratë për të parë sa është niveli i divergimit të saj, krahasuar me Bardhokën e Shqipërisë. Pritet që raca Bardhoka në Shqipëri dhe Kosovë të paraqesë diversitet për shkak të izolimit politik midis dy vendeve.

Mikrosatelitët janë markerë të fuqishëm pasi janë të shumtë në numër, tepër variabël dhe të përhapur gjerësisht në gjenomën e organizmave eukariotë. Ata janë rekomanduar nga FAO për karakterizimin e biodiversitetit gjenetik të kafshëve të fermës. Markerët molekularë, si mikrosatelitët përdoren gjerësisht për vlerësimin e diversitetit gjenetik brenda dhe midis racave. Ka mjaft studime të diversitetit gjenetik midis racave të deleve, bazuar në mikrosatelitët (3, 7, 13, 15). Studimet e diversitetit gjenetik të racave të deleve të Shqipërisë dhe Kosovës janë të kufizuara (5, 15). Në këtë punim, vlerësohet diversiteti gjenetik i këtyre racave autoktone, si dhe mardhëniet filogjenetike midis racave dhe individëve. Qëllimi i këtij studimi është vlerësimi i strukturës gjenetike të racave autoktone të deleve në Shqipëri dhe Kosovë, duke përdorur 6 markerë mikrosatelitë

## 2. Materiali dhe Metoda

### 2.1. Mbledhja e kampjoneve dhe markerët mikrosatelitë

U analizuan kampjone gjaku të mbledhura në 150 individë, që përfaqësojnë pesë raca lokale delesh: Bardhoka (Shqipëri) (31), Ruda (31), Shkodrane (31), Recka (32) dhe Bardhoka (Kosovë) (25). Për çdo racë u mblodhën kampjone në tufa të ndryshme, karakteristike nga vëndorigjina e racës dhe në ferma që synojnë të mbarëshojnë individë racëpastër. Kampjonimi u realizua në mesatarisht 11 tufa, për çdo racë. Në çdo tufë u përzgjedhën maksimumi tre individë, pa lidhje gjaku me njeri tjetrin, dy femra dhe një mashkull, bazuar në informacionin e dhënë nga fermeri, i cili njih gjenealogjinë e individëve të tufës. Gjithsej u analizuan 6 markerë mikrosatelitë: BM8125, MAF65, OarCP34, OarFCB304, OarHH47 dhe OarVH72 të përzgjedhur nga lista e mikrosatelitëve të rekomanduar nga FAO për studimin e diversitetit gjenetik në delet.

### 2.2. Analiza statistikore

Studimet e diversitetit gjenetik përfshijnë analizën brenda racave dhe atë midis racave. Analiza brenda racave ka të bëjë me vlerësimin e heterozigotisë, të  $F_{ST}$ ,

numrin mesatar të aleleve, si dhe me ekuilibrin Hardy-Weinberg (HWE). Analiza midis racave përfshin tre elementë kryesorë: fragmentarizimin e variancës gjenetike, analizën që bazohet në frekuencat alelike, si dhe analizën që bazohet në distancat gjenetike. Analiza midis racave, që bazohet në frekuencën e aleleve përfshin analizën multivariate (analiza e komponentëve kryesorë PCA (*Principal Component Analysis*), grupimet që bazohen në një model të caktuar, p.sh. modeli Bayesian, (model-based clustering (*Structure*)), si dhe analizën e përzierjes (*Admixture analysis*). Analiza midis racave e cila bazohet në distancën gjenetike ka të bëjë me ndërtimin e pemëve të tipit UPGMA ose NJ.

### Analiza brenda racave

Frekuencat alelike, si dhe testimet për devijime nga ekuilibri Hardy-Weinberg (HWE) u kryen duke përdorur testimet ekzakte të programit GENEPOP (19). Programi Genetix (4) u përdor për të llogaritur heterozigotinë e vëzhguar ( $H_o$ ), diversitetin gjenetik ( $H_E$ ). Programi FSTAT (10) u përdor për llogaritjen e diversitetit alelik të korrigtuar (*allelic richness* dhe statistikën F, duke përfshirë nivelin e tyre të sinjifikancës).

### Analiza midis racave

Analiza hierarkike u realizua duke përdorur analizën e variancës molekulare (AMOVA) në paketën ARLEQUIN (20). Programi STRUCTURE (17) është përdorur për të analizuar strukturën e popullatës nëpërmjet analizës së *cluster-ve* bazuar në modelin Bayesian. Programi përdor metodën Markov Chain Monte Carlo dhe u realizua sipas "*no admixture model*", me "*burning period*" prej 100000 iterations dhe "*period of data collection*" prej 100000 iterations. Kampjonet u analizuan me  $K$  nga 2 në 6, për 3 përsëritje. Një analizë tipike e *Structure* supozon një model sipas të cilit ekzistojnë  $K$  popullata, ku secila karakterizohet nga një komplet frekuencash alelike në çdo lokus. Individët vendosen në popullata (në mënyrë probabilistike), ose mund të vendosen në dy apo më shumë popullata nëse gjenotipet e tyre tregojnë praninë e përzierjes në individët. Gjatë kryerjes së analizës supozohet se lokuset janë në HWE, si dhe në ekuilibër lidhjeje. Vendosja (*Assignment*) e individëve në popullatën e tyre të referencës u vlerësua duke përdorur programin GeneClass (16). Për të gjitha racat është kryer një vendosje direkte e individëve, si dhe një analizë e përgjashimit bazuar në 10000 individë të simuluar. U përdorën metodat që bazohen në frekuencat e aleleve (12), si dhe në teoremën Bayesian-e (18). Metoda

Bayes llogarit probabilitetin hasjes së një gjenotipi në secilën popullatë, bazuar në frekuencat alelike të popullatës. Llogaritjet u kryen duke aplikuar gjithmonë procedurën “leave one out”.

Distncat gjenetike sipas Nei, u llogaritën dhe u përdorën për të ndërtuar një pemë të tipit *consensus* UPGMA me paketën Phylip (8). Bootstrap (1000 replika) u krye për të testuar qëndrueshmërinë e topologjisë së dendrogramës. Nëse vlerat e bootstrapping janë më të vogla se 50, kjo do të thotë që lidhjet filogjenetike nuk janë sinjifikante. Distanca gjenetike sipas Nei, u paraqit në formë grafike, si PCA duke përdorur programin GenALEx (14).

Vlerësimet e distancave midis individëve, bazuar në përqindjen e aleleve të përbashkët (*Proportion of*

*shared alleles*), (Dps), u llogaritën me programin Population (11). Pema UPGMA u ndërtua me paketën Phylip (8).

### 3. Rezultatet dhe diskutimi

#### 3.1. Markerët mikrosatelitë

Të gjithë markerët janë polimorfikë. Në total u hasën 72 alele (Tabela 1) për të gjithë lokuset në 150 individët. Numri i aleleve varionte na 9 (BM8125, OARVH7) deri në 16 (OAFB3). Të gjithë markerët shfaqnin më shumë se 5 alele. Heterozigotia e vëzhguar ( $H_O$ ) për lokus varionte nga 0.627 (OAFB3) deri në 0.844 (OARVH7), me një mesatare prej 0.738. Shmangiet nga ekuilibri Hardy-Weinberg u zbuluan në 3 nga 30 kombinimet e mundshme lokus-popullatë ( $p < 0.05$ ).

Markerët	Variacioni alelik (bp)							Popullatat që devijojnë nga HWE
	NA	$H_O$	$H_E$	$F_{IS}$	$F_{IT}$	$F_{ST}$		
BM8125	9	108-126	0.75	0.753	-0.023	0.084*	0.104***	0
MAF65	12	113-138	0.742	0.688	0.005	0.067*	0.062***	1
OARCP3	11	111-135	0.785	0.805	0.012	0.11***	0.099***	0
OAFB3	16	149-189	0.627	0.572	0.107*	0.23***	0.138***	0
OARHH4	15	121-155	0.681	0.538	0.103**	0.233***	0.145***	1
OARVH7	9	125-141	0.844	0.823	0.009	0.042	0.034***	1
mean			0.738	0.696	0.034*	0.129***	0.097***	

\* $p < 0.001$

**Tabela 1.** Numri i aleleve mikrosatelitë të vëzhguar (NA), masa alelike, heterozigotia e vëzhguar ( $H_O$ ), heterozigotia e pritur ( $H_E$ ), indekset e fiksimit ( $F_{IS}$ ,  $F_{IT}$ ,  $F_{ST}$ ) për secilin nga markerët në 5 racat e deleve.

Raca	n	TNA	AR	He	Ho	MNA	$F_{IS}$	Devijimet HWE
Bardhoka (Shqiptare)	31	46	44.47	0.76	0.72	7.67	0.061	3
Ruda	31	47	45.09	0.77	0.80	7.83	-0.011	0
Shkodrane	31	53	50.42	0.77	0.71	8.83	0.087	1
Recka	32	50	47.33	0.78	0.79	8.33	0.009	0
Bardhoka (Kosova)	25	35	35.00	0.68	0.67	5.83	0.033	2
Totali	150	72	55.88	0.75	0.74	7.7	0.036	

n: masa e kampjonit; TNA: numri total i aleleve; AR: allelic richness;  $H_E$ : heterozigotia e pritur;  $H_O$ : heterozigotia e vëzhguar; MNA: Numri mesatar i aleleve.

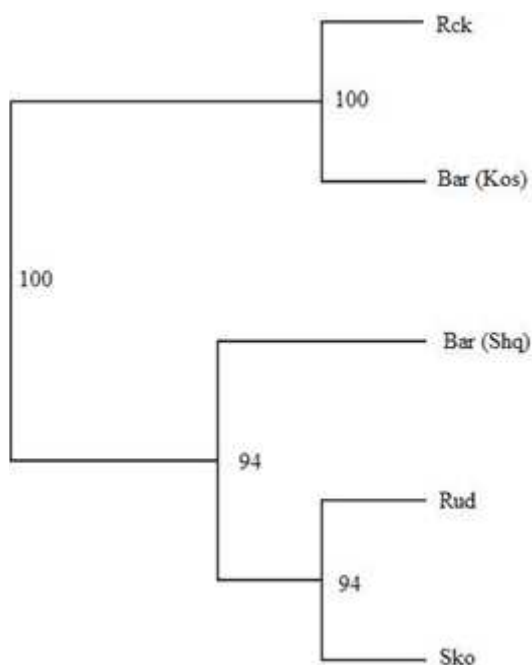
**Tabela 2.** Matjet e variabilitetit gjentik në racat e deleve.

	Bardhoka (Shqipëri)	Ruda	Shkodrane	Recka	Bardhoka (Kosova)
Bardhoka (Shqipëri)		0.118	0.111	1.665	2.001
Ruda	14.71		0.067	1.714	2.091
Shkodrane	17.06	114.5		1.807	2.277
Recka	1.12	1.17	1.12		0.197
Bardhoka (Kosova)	0.80	0.83	0.80	4.92	

**Tabela 3.** Matriksi i distancës gjenetike sipas Nei ( $D_S$ ) (sipër) dhe numri i migrantëve (poshtë).

### 3.2. Variacioni gjenetik brenda racave

Në tabelën 2, paraqitet variabiliteti gjenetik i racave të deleve. Raca më diverse paraqitet Recka me numrin më të lartë të aleleve (TNA) prej 50. Numrin më të lartë mesatar të aleleve (MNA) e ka raca Ruda prej 4.1. Numrin më të ulët të TNA e ka raca Bardhoka e Kosovës prej 35. Heterozigotia e pritur ka vlerën më të ulët në racën Bardhoka të Kosovës prej 0.68 dhe më të lartën në racën Recka prej 0.78. Të gjitha racat e deleve shqiptare kanë vlera të përafërta të heterozigotisë. *Allelic richness* (AR) variojnë nga 35 për Bardhokën e Kosovës deri në 50 për racën Shkodrane. Vlerat e heterozigotisë së vëzhguar ( $H_o$ ) variojnë nga 0.67 në Bardhokën e Kosovës deri në 0.80 në racën Ruda. Vlerat mesatare të  $H_E$  dhe  $H_o$ , për të gjithë lokuset dhe racat janë 0.75 dhe 0.74 respektivisht, pra mjaft afër njera-tjetrës. Vlerat e heterozigotisë së vëzhguar janë më të larta se ato që janë vëzhguar në raca të tjera delesh si 0.68 në Merinosin francez (6); 0.70 në delen Muzzafaranagri (1); 0.71 në racat baltike (22); 0.67 në delet Nali dhe Chokla (21); 0.69 në delen Magra nga Arora dhe Bhatia (2), por janë të ngjashme me delet e Ballkanit Perëndimor 0.78 (5). Numri mesatar e aleleve për lokus (MNA) variojnë nga 5.83 për Bardhokën e Kosovës deri në 8.83 për racën Shkodrane. Vlerat pozitive të  $F_{IS}$  për lokus dhe për racë tregojnë praninë e inbreedingut në të gjitha racat me përjashtim të racës Ruda. Vlerat e  $F_{IS}$  variojnë nga -0.011 për Rudën deri në 0.087 për Shkodranen. Në tabelën 2 tregohet numri i lokuseve që devijojnë në mënyrë sinjifikante ( $p < 0.05$ ) nga HWE, për çdo racë. Jo të gjitha racat shfaqin devijime sinjifikante nga HWE. Vlerat pozitive të  $F_{IS}$  tregojnë deficit të heterozigotëve brenda racave.



**Figura 1.** Pema e ndërtuar nga  $D_S$ .

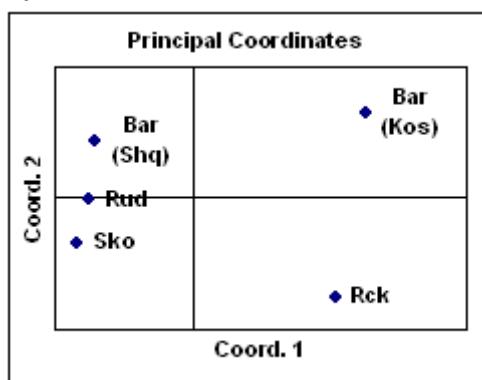
### 3.3. Diferencimi gjenetik

Diferencimi gjenetik mesatar midis racave (vlera  $F_{ST}$ ) ishte 0.097, i ndryshëm në mënyrë sinjifikante nga zero ( $p < 0.001$ ), që do të thotë se rreth 9.7% e variacionit gjenetik total mund të shpjegohet me ndryshimet midis popullatave dhe 90.3% i korespondon ndryshimeve midis individëve brenda secilës racë. Vlerat  $F_{ST}$  flasin për një diferencim të moderuar gjenetik. Vlerat e diferencimit gjenetik janë më të larta se ato të treguara nga autorë të tjerë midis 57 racave

të deleve europiane dhe të Lindjes së mesme 5.7%, (15), midis shtatë racave të deleve të Ballkanit Perëndimor 5.2% (5), midis racave baltike 8.8% (22), ose 8.5%, (9). Por, në analizën tonë është përdorur një komplet tjetër, më i vogël në numër, markerësh mikrosatelitë.

Distancat gjenetike janë relativisht të vogla dhe variojnë nga 0.671 deri në 2.227. Fluksi i gjeneve është i lartë dhe vlerat variojnë nga 0.80 deri në një vlerë shumë të lartë prej 114.5

Distanca gjenetike sipas Nei ( $D_S$ ) midis çifteve të popullatave (Tabela 3), u përdor për të ndërtuar një dendrogramë me algoritmin UPGMA (Figura 1). Numrat te nyjet tregojnë vlerat për 1000 *bootstrap resampling* të lokuseve. Vlerat në nyje janë më të larta se 50, gjë që tregon për një qëndrueshmëri të pemës. PCA është paraqitur në Figurën 2. Duket qartë se Bardhoka e Kosovës dhe Recka formojnë grupe të veçanta.



**Figura 2.** Analiza e komponentëve kryesorë.

Analiza gjenetike tregon një nivel të lartë të diversitetit gjenetik, brenda racës që reflektohet në vlerat e larta të heterozigotisë, vlerat e larta të TNA, MNA si dhe AR, por edhe midis racave ku si tregues shërben vlera e  $F_{ST}$  (9.7%). Numri i lartë i aleleve, për çdo lokus dhe diversiteti i lartë gjenik për çdo racë tregon se markerët e përzgjedhur janë të përshtatshëm për analizimin e diversitetit gjenetik të racave lokale të deleve.

Përdorimi i shumë markerëve polimorfikë, mundëson që duke u bazuar në gjenotipet e vecantë, të përcaktohet popullata e origjinës së një individi, e cila kryhet me ndihmën e të ashtuquajturve "assignment tests". Ky lloj testimi përdoret në studimet e diversitetit gjenetik për të analizuar përzjerjen që

mund të ekzistojë midis racave. Vendosja dhe përjashtimi i individëve nga popullata e tyre e origjinës paraqitet në tabelën 4. Niveli i konfidencës është 99%.

Rabca	Frekuenca			Bayes	
	No	Direkt	Simulim	Direkt	Simulim
Bardhoka (Shqipëri)	31	51.61	9.68	54.84	12.90
Ruda	31	48.39	3.23	51.61	22.58
Shkodrane	31	35.48	0.00	35.48	6.45
Recka	32	71.88	53.13	78.13	40.63
Bardhoka (Kosovë)	25	21.16	0.00	14.44	0.00
<b>Totali</b>	<b>150</b>	<b>58.67</b>	<b>14.00</b>	<b>58.67</b>	<b>17.33</b>

**Tabela 4.** Përqindja e individëve nga secila racë e vendosur korrektësisht në popullatën e origjinës nëpërmjet metodave që bazohen në frekuencën alelike dhe në teoremën Bayes.

Raca me nivelin më të ulët të individëve të vendosur korrektësisht është Bardhoka e Kosovës. Raca Recka është raca me përqindjen më të lartë të individëve të vendosur saktësisht (78,13%), e cila është gjithashtu dhe raca me përqindjen më të lartë të individëve të përjashtuar (40,63%). Në të dy rastet shifrat i referohen teoremës Bayes.

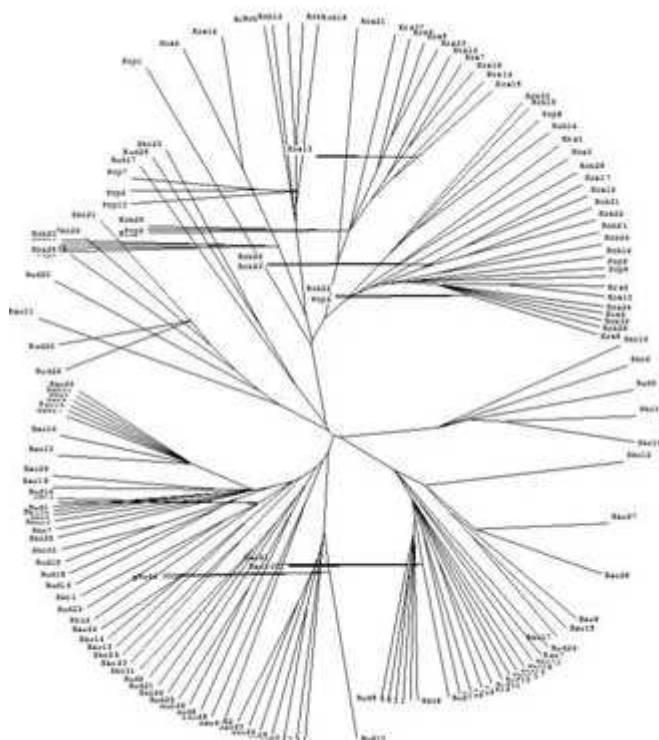
Raca	Grupimet e supozuara $K=3$		
	1	2	3
Bardhoka (Shq)	0.500	0.034	0.466
Ruda	0.471	0.014	0.515
Shkodrane	0.476	0.013	0.511
Recka	0.021	0.958	0.021
Bardhoka (Kos)	0.015	0.967	0.018

**Tabela 5:** Përqindja pjesmarrjes së racave të deleve kur grupimet e supozuara janë  $K=3$ .

Analiza e grupimeve që bazohet në modelin Bayesian, bazohet në supozimin që i gjithë kompleti i të dhënave të analizuarra e ka origjinën nga  $K$  popullata të pavarura (subpopullata) dhe përkatësia e tyre grupore është e panjohur. Meqenëse çdo popullatë, për çdo lokus karakterizohet nga një komplet frekuencash alelike, atëherë individët vendosen në popullata duke u bazuar në të dhënat gjenotipike individuale. Për të përcaktuar

numrin e mundshëm të subpopullatave (K) merret në konsideratë logaritmi i probabilitetit të K ( $\ln \Pr(X|K)$ ). Numri më i mundshëm subpopullatave i korespondon pikës në të cilën logaritmi arrin një plate kundrejt subpopullatave (K). U testuan një sërë grupimesh (K) që varionin nga 2 në 6, duke përdorur modelin pa përzierje, pra duke supozuar që çdo individ vjen në mënyrë të pastër nga njera prej popullatave K. Plateja

e  $\ln \Pr(X | K)$  fitohet për K = 3. Në tabelën 5, jepet përqindja e pjesmarrjes së çdo race në grupimet e supozuara, për K = 3. Shihet qartë që grupimi i parë dhe i tretë përbëhen nga individët të racave Bardhoka (Shq), Ruda dhe Shkodrane, kurse grupimi i dytë përbëhet nga individë të racave Recka dhe Bardhoka e Kosovës.



**Figura 3.** Pema UPGMA e ndërtuar nga Das, midis individëve.

Burimi i variacionit	Shuma e katrorëve	Komponentët e variancës	Përqindja e variacionit
Midis popullatave	67.222	0.243	9.74
Brenda popullatave	664.398	2.252	90.26
<b>Totali</b>	<b>731.620</b>	<b>2.495</b>	

**Tabela 6:** Analiza AMOVA për pesë racat e deleve bazuar në 6 lokuse mikrosatelitë .

Dendrograma bazuar në distancën gjenetike midis individëve e paraqitur në figurën 4, tregon qartë se

individët janë të shpërhapur ndërmjet njeve të racave të ndryshme. Testimet e kryera tregojnë qartë se ka një nivel të lartë të përzierjes së racave. Analiza AMOVA (Tabela 6) tregon se përqindja e variacionit midis popullatave ishte 9.74% dhe brenda popullatave 90.26%.

Mungesa e librave gjenealogjikë për një periudhë rreth 20 vjeçare mund të ketë çuar në një përzierje të racave, por kryesisht atyre Shqiptare. Kjo përzierje ka qenë e kufizuar kundrejt Bardhokës së Kosovës, për shkak të izolimit njëshekullor midis dy shteteve. Kjo ka bërë që Bardhoka e Shqipërisë dhe Kosovës edhe pse fillimisht kanë qenë e njeja racë, tashmë kanë

diverguar mjaft nga njera tjetra, aq sa ndoshta mund të konsiderohen si raca të veçanta.

Racat e deleve të marra në konsideratë në këtë studim përbëjnë një fond të rëndësishëm gjenetik i cili duhet mbrojtur. Rezultatet e paraqitura mund të merren në konsideratë për të hartuar programe dhe politika racore me qëllim konservimin e tyre. Megjithatë, studimi duhet thelluar më tej, së pari duke rritur numrin e markerëve.

#### BIBLIOGRAFIA

1. Arora R and Bhatia S (2004) Genetic structure of Muzzafarnagri sheep based on microsatellite analysis. *Small Ruminant Research* 54: 227-230.
2. Arora R and Bhatia S (2006) Genetic diversity of Magra sheep from India using microsatellite analysis. *Asian-Australian Journal of Animal Science* 19: 938-942.
3. Arranz J J, Bayon Y, and San Primitivo F (2001) Differentiation among Spanish sheep breeds using microsatellites. *Genet. Sel. Evol.* 33: 529-542
4. Belkhir K, Borsa P, Chikhi, Raufaste N and Bonhomme F (2001) Genetix, logiciel sous Windows TM pour la génétique des populations, Laboratoire Génome, Populations, Interactions, CNRS UPR 9060, Université de Montpellier II, Montpellier France. <http://www.univmontp2.fr/~genetix/genetix/genetix.htm>.
5. Cinkulov M, Popovski Z, Porcu K, Tanaskovska B, Hodzic A, Bytyqi H, Mehmeti H, Margeta V, Djedovic R, Hoda A, Trailovic R, Brka M, Markovic B, Vazic B, Vegara M, Oslaker I and Kantanen J (2008) Genetic diversity and structure of the West Balkan pramenka sheep types as revealed by microsatellite and mitochondrial DNA analysis. *J. Anim. Breed. Genetic* 125, 417-426.
6. Diez-Tasco'n C, Littlejohn R.P, Almeida P.A and Crawford A.M (2000) Genetic variation within the Merino sheep breeds analysis of closely related populations using microsatellites. *Animal Genetics* 31, 243-51.
7. Farid A, O'reilly E, Dollard C and Kelsey C R (2000) Genetic analysis of ten sheep breeds using microsatellite markers. *Can. J. Anim. Sci.* 80, 9-17.
8. Felsenstein J. (2000) PHYLIP Phylogeny Inference Package, Department of Genome Science, University of Washington, Seattle.
9. Forbes S.H, Hogg J.T, Buchanan, F.C, Crawford, A.M and Allendorf, F.W (1995) Microsatellite evolution in congeneric mammals domestic and bighorn sheep. *Mol. Biol. Ecol.* 12, 1106-1113.
10. Goudet, J (1995) FSTAT V 2.9.3 a computer programme to calculate F-statistics <http://www.unil.ch/izea/software/fstat.html>. *J. Hered.* 8, 485-486.
11. Langella O (2002) Populations. <http://www.pge.cnrs.fr/bioinfo/populations/>.
12. Paetkau D, Calvert W, Stirling I and Strobeck C (1995) Microsatellite analysis of population structure in Canadian polar bears. *Mol. Ecol.* 4: 347-354.
13. Pariset L, Savarese M C, Cappucio I and Valentini A (2003) Use of microsatellites for genetic variation and inbreeding analysis in Sarda sheep flocks of central Italy. *J. Anim. Breed. Genet.* 120, 425-432.
14. Peakall, R and Smouse, P.E. GenAlEx 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Mol. Ecol. Notes.* 2006, 6, 288-295.
15. Peter, C, Bruford, M, Perez, T, Dalamitra, S, Hewitt, G, Erhardt, G and The Econogene Consortium (2007) Genetic diversity and subdivision of 57 European and Middle Eastern sheep breeds. *Anim, Genetics*, 38, 37 - 44.
16. Piry S, Alapetite A, Cornuet J M, Paetkau D, Baudouin L and Estoup A (2004) GeneClass2: a software for genetic assignment and first generation migrants detection. *Journal of Heredity* 95, 536- 39.
17. Prichard J K, Stephens M and Donnelly P (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, 155: 945-959.
18. Rannala B and Mountain J L (1997) Detecting immigration by using multilocus genotypes. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 98: 9197-9201.
19. Raymond, M. And Rousset, F (2001) GENEPOP a population genetic software for exact test and ecunemism. <http://www.cefe.cnrs-mop.fr>. Stand 12.12.04.
20. Schneider S, Roessli D and Excoffier L (2000) Arlequin: a software for population genetics data analysis. Genetics and Biometry Laboratory, University of Geneva, Switzerland.
21. Sodhi M, Mukesh M and Bhatia S (2006) Characterizing Nali and Chokla sheep differentiation with microsatellite markers, *Small Ruminant Research* 65: 185-192.
22. Tapio, I, Tapio, M, Grislis, Z, Holm, L.E, Jeppsson, S, Kantanen, J, Miceikiene, I, Olsaker, I, Viinalass, H. and Eythorsdottir, E (2005) Unfolding of population structure in Baltic sheep breeds using microsatellite analysis. *Heredity* 94, 448-456.