



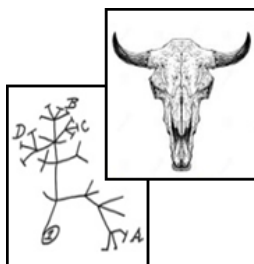
Българска Академия на Науките
Институт по биоразнообразие и екосистемни
изследвания

Мирослав Кирилов Маринов

МОЛЕКУЛЯРНО-ПОПУЛАЦИОННИ ИЗСЛЕДВАНИЯ НА
МЕСТНИ ПОРОДИ КУЧЕТА В БЪЛГАРИЯ

Автореферат

на Дисертация за присъждане на образователна и научна степен „ДОКТОР“
Професионално направление 4.3. Биологически науки, Научна специалност
„Зоология“



Научен ръководител: доц. д-р Георги Радославов

Научни консултанти: доц. д-р Петър Христов

проф д-р Николай Спасов

София, 2019

Дисертационният труд е обсъден и насочен за защита на разширено заседание на колегиума на отдел „Животинско разнообразие и ресурси“ към Института по биоразнообразие и екосистемни изследвания при БАН, състояло се на 30.10.2019 г.

Защитата на дисертационния труд ще се състои на 05.02.2020 г. (сряда), 14:00 часа в Заседателната зала на База 1, на Института по биоразнообразие и екосистемни изследвания при БАН, ул. „Майор Ю. Гагарин“ № 2.

Състав на научното жури (назначено със заповед на Директора на ИБЕИ-БАН №105/22.11.2019г.:

Вътрешни членове:

1. Проф. Георги Марков
2. Доц. Георги Радославов

Външни членове:

3. Проф. Румяна Миронова – Институт по молекулярна биология-БАН
4. Проф. Даниела Симеоновска-Николова – Софийски университет „Св. Кл. Охридски“
5. Доц. Диана Златанова – Софийски университет „Св. Кл. Охридски“

Дисертационният труд е с общ обем от 98 страници, 5 таблици и 22 фигури с обяснителен текст. Списъкът на цитираната литература включва 83 източника, от тях 82 на латиница и 1 на кирилица.

Материалите по защитата са на разположение на всички интересувачи се в библиотеката на ИБЕИ, База 1, София, ул. „Майор Ю. Гагарин“ № 2.

СЪДЪРЖАНИЕ

Списък със съкращения.....	4
I. Увод	6
II. Цел и задачи на дисертационния труд	8
III. Материали и методи.....	9
III.1. Материали	9
III.1.1. Събиране на биологичен материал от местни кучета в България	9
III.1.2. Събиране на археозооматериал от древни кучета в България.....	10
III.2.Методология	10
III.2.1. Изолиране на геномна ДНК от местни породи кучета	10
III.2.2. Изолиране на древна ДНК (дДНК) от археозооматериал	11
III.2.3. PCR намножаване и пречистване на намножените продукти.....	11
III.2.4. PCR-намножаване и пречистване на намножените продукти на дДНК	12
III.2.5. Секвенционен и филогенетичен анализ при съвременни проби.....	13
III.2.6. Секвенционен и филогенетичен анализ при древни проби	13
.IV.Резултати.....	15
IV.1. Генетично разнообразие при местни породи кучета.....	15
IV.2.Филогенетичен анализ при местни породи кучета	15
IV.3. Генетично разнообразие при древни кучета	16
V.Дискусия	20
V.1. Митохондриално разнообразие при местни породи кучета	20
VII.1.1. Митохондриално разнообразие при местни ловни породи кучета...	21
V.1.2. Митохондриално разнообразие при местни овчарски породи кучета	23
V.3. Генетични изследвания при древни кучета в световен мащаб.....	24
V.3.1 Генетични изследвания при древни кучета от България	25
VII. Изводи.....	31
VIII. Приноси	33
IX. Публикации свързани с темата на дисертацията	35
X. Участие на национални форуми.....	36
Литература.....	37

Списък със съкращения

ДНК - дезоксирибонуклеинова киселина

мтДНК - митохондриална ДНК

нд – нуклеотидни двойки

SNP – Single Nucleotide Polymorprisms (единични нуклеотидни замени)

HG – хаплогрупа

FCI – Международна федерация по кинология

LGM – Last Glacial Maximum (Последен ледников период)

International Kennel Union – Международно обединение на клубовете за развъждане

БРФК – Българска републиканска федерация по кинология

НКБГ - Национален клуб „Българско гонче“

HVR – хипервариабилен регион

PCR – полимеразна верижна реакция

ЕДТА – етилендиаминтетраоцетна киселина

NCBI - Национален център за биотехнологична информация на САЩ

PCA – Principal Component Analysis (Анализ на основните компоненти)

КК - Каракачанско куче

БОК – Българско овчарско куче

БГ – Българско гонче

ББ - Български барак

Благодарности

Искрено благодаря на научния си ръководител доц. д-р Георги Радославов за търпението, напътствията, помощта, разбирането и подкрепата.

Сърдечно благодаря на научния си консултант доц. д-р Петър Христов за компетентните съвети, ценните идеи и съдействието, които допринесоха за това изследване.

Благодаря на научния си консултант проф. д-р Николай Спасов за предоставения археозооматериал и компетентните съвети при написването на дисертацията.

Специална благодарност изказвам на развъдните киноложки организации, клубове и частни стопанства за предоставения материал за изследване.

Благодаря на Директора на ИБЕИ-БАН доц. Анна Ганева за осигурените условия за ползотворна изследователска дейност.

Благодаря на колегите от Отдел „Животинско разнообразие и ресурси“ за добрата работна атмосфера и ползотворните дискусии при представянето на резултатите от изследването.

Изказвам благодарност за финансовата подкрепа осигурена чрез проект “Траките - генезис и развитие на етноса, културни идентичности, цивилизационни взаимодействия и наследство от древността,” – БАН, Тема 2.: „Дивите и домашните животни от праисторията до тракийския период” и докторантската субсидия.

Благодаря сърдечно на моето семейство за разбирането, търпението и подкрепата.

I. Увод

Известно е, че кучето (*Canis lupus familiaris*) е първото одомашнено и най-разпространено домашно животно. Най-общо, в зависимост от предназначението си, видът е селектиран в три основни направления: ловни и охранителни породи и домашни любимци. Това обуславя разликите във размера, формата, цвета, поведението и др. Поради ценните си качества: работоспособност, сила, устойчивост, привързаност към дома и стопаните, непретенциозност, възприемчивост към обучение, послушание и др. кучето увеличава непрекъснатата числеността и многообразието си.

Одомашняването на кучето се свързва основно с периода от края на Късния палеолит и Мезолита през последната ледникова епоха (15 000 - 10 000 г. пр.н.е.), като това е продължило и в по-късно време. Известно, че предшественик на кучето е сивият вълк (*Canis lupus lupus*), като съществуват няколко етапа и центрове на одомашняване в Евразия.

Произходът и одомашняване на кучето се разглежда като двустъпален процес:

1. Одомашняване на кучето от неговия предшественик - сивия вълк (*C. lupus lupus*) преди 30 000-15 000 г.;
2. Пороодообразуване и специализация паралелно с появата на първите човешки цивилизации, както и досега.

Въпреки разностранните филогенетични и популационно-генетични изследвания на различни породи кучета в световен мащаб, подобни данни за района на Балканския полуостров не съществуват.

Това налага необходимостта да бъдат проучени българските местни породи кучета, както от гледна точка на техния произход (филогенетични връзки), така и от гледна точка на генетичната структура на техните популации.

II. Цел и задачи на дисертационния труд

Целта на настоящето изследване е да се установи генетичното разнообразие на местни породи кучета в България на базата на митохондриални генетични маркери (D-loop region, HVRI).

За осъществяване на поставената цел са формулирани следните задачи:

1. Да се установи генетичният профил на местните породи кучета в България;
2. Да се съпостави генетичният профил на български породи кучета с географско близки популации;
3. Да се проучи произхода и одомашняването на базата на ДНК анализ от археозоологичен материал;
4. Да се отговори на въпроса местен ли е произхода на тези породи кучета и до колко има генетична интрогресия с други популации.

III. Материали и методи

III.1. Материали

III.1.1. Събиране на биологичен материал от местни кучета в България

В анализа са включени типични представители (мъжки и женски) за всяка от изследваните породи от различни региони на страната: **Каракачанско куче** (КК, $n=37$); **Българско овчарско** (БОК, $n=15$); **Български барак** (ББ, $n=34$) и **Българско гонче** (БГ, $n=45$), (Фиг. 1). Те са селектирани въз основа на морфологични стандарти за породите, както и на база на родословието им, за да се избегне изследването на родствени животни. По-голяма част от индивидите са от развъдници, а останалата част са от частни собственици.



Фигура 1. Географско разпространение на изследваните популации кучета.

III.1.2. Събиране на археозооматериал от древни кучета в България

Изследвани са двадесет и пет проби от древни кучета (кости и зъби) от колекцията на НПНМ-БАН. Те обхващат периода Ранен неолит 6500-5500 пр.н.е. до Късна античност IV век сл. Хр. (Фиг. 2).



Фигура 2. Карта показваща местата на пробовземане на археозоологичния материал.

III.2.Методология

III.2.1. Изолиране на геномна ДНК от местни породи кучета

Геномна ДНК беше изолирана от космени фоликули и стебла посредством използването на комерсиален кит (GeneMATRIX Tissue and Bacterial DNA purification Kit, Cat. No. E3551-01, EURx Ltd., Poland) според инструкциите на производителя. Концентрацията на изолираната ДНК се определяше спектрофотометрично, а качеството посредством 1% агарозна гел електрофореза оцветен с Greensafe premium – Cat. No. MB13201,

Nzytech, Portugal) под УВ светлина. Изолираната ДНК се съхраняваше при -20°C до PCR анализа.

III.2.2. Изолиране на древна ДНК (дДНК) от археозооматериал

Известно е, че при работа с древна ДНК е необходимо да се спазват някои важни и специфични условия поради обстоятелствата, че е в малки количества, силно фрагментирана, екзогенно контаминирана и съществува възможност на контаминиране със съвременна ДНК.

Това налага обособяване на независими лаборатории (помещения и сгради), третиране на повърхности и разтвори с UV радиация (45W, 72 ч), термична обработка (над 180°C , 12ч), третиране с киселина (2.5M HCl, 48ч) и/или натриев хипохлорид (40%, 48ч), измиване с ултрачиста вода и филтриране на въздуха в помещенията.

Предварителната обработка на костния материал следваше протокола на Yang et al. (1998) с известни модификации (Hristov et al., 2017). Изолирането на дДНК беше осъществено чрез силико-мембранна технология, включваща използване на колонки за пречистване на PCR продукти (PCR/DNA Clean - Up, Кат. номер - E3520, EURx, Poland) и 5M GuSCN (Sigma-Aldrich) свързващ реагент V/V. дДНК свързана към силициевите колонки беше пречистена двукратно с промиващ разтвор 70% етилов алкохол и разтворена в ултрачиста вода. Изолираната дДНК беше съхранена на -20°C .

III.2.3. PCR намножаване и пречистване на намножените продукти

Част от гена за tPHK за пролина и началото на HVR1 (част от D-loop региона) беше амплифициран посредством праймери: прав - 5'-CCCTGACACCCCTACATTCA-3' и обратен - 5'-

CCATTGACTGAATAGCACCTTGA-3' (Vila et al., 1999). Всички PCR реакции бяха проведени с термоциклер Little Genius (BIOER Technology Co., Ltd.) при следните условия: начална денатурация при 94 °C за 5 минути; 30 цикъла (денатуриране при 94 °C в продължение на 30 секунди, хибридизация на праймерите при 50 °C в продължение на 30 секунди, удължаване при 72 °C в продължение на 1 минута) и крайно удължаване при 72 °C в продължение на 10 минути. PCR продуктите се визуализираха върху 1% агарозен гел оцветен с Greensafe premium (Кат. № MB13201, Nzytech, Португалия). Размерът на фрагмента се определяше посредством молекулен маркер Gene-Ruler™ 100 bp Ladder Plus (Кат. № SM0323, ThermoFisher Scientific Inc.).

Успешно амплифицираните продукти се пречистваха чрез PCR пречистващ кит (Gene Matrix, PCR почистващ комплект, EURx, Полша) според инструкциите на производителя. Секвенирането на намножените PCR продукти се извършваше посредством PlateSeq кит (Eurofins Genomics Ebersberg, Германия).

III.2.4. PCR-намножаване и пречистване на намножените продукти на дДНК

Поради ниския добив на дДНК и високата и степен на фрагментация се използват модифицирани методи за PCR намножаване:

- намножават се три къси припокриващи се фрагменти от 100 нд до 300 нд от HVR 1 региона:
- поради ниския добив на дДНК се използват по голям брой цикли на намножаване (40х, 80х до 120х последователни цикъла);
- при получаване на неспецифично намножаване се използва нестед PCR намножаване (използване на вътрешни праймери) :

(15527 нд - 15703 нд (177 нд); 15433 нд – 15703 нд (270 нд); 15680 нд – 15804 нд (125bp); 15781 нд – 16090 нд (310 нд).

- при всяка PCR реакция се използват отрицателни контроли, за да се отхвърли възможното замърсяване с екзогенна ДНК.

Праймерите за размножаване на фрагменти от D-loop региона при древни проби са посочени в Таблица 2 на Дисертацията.

Пречистването на размножените продукти и секвенционният анализ се извършиха както при работа със съвременна ДНК.

III.2.5. Секвенционен и филогенетичен анализ при съвременни проби

Всички 130 изследвани проби бяха успешно размножени по отношение HVR1 регион. Получените секвенции от местните породи кучета бяха ръчно подравнени посредством MEGA софтуер версия 7.0 (Kumar et al., 2016) като се използваше референтен пълен митохондрион под номер NC_002008 (Kim et al., 1998).

Всички секвенции използвани за филогенетичен анализ са депозиран в генетичната база данни на Националния център за биотехнологична информация (NCBI) GenBank под номера MG920357 - MG920486. Нуклеотидните последователности са анализирани чрез SNPs анализ и митохондрилните хаплогрупи са определени съгласно класификацията на Duleba et al. (2015). Хаплогрупната принадлежност е определена и с помощта на програмата MitoToolPy (<http://www.mitotool.org/mp.html>) чрез използването на референтна секвенция с номер EU789787 (Pang et al., 2009).

III.2.6. Секвенционен и филогенетичен анализ при древни проби

Получените секвенции се редактират ръчно и се подравняваха чрез софтуер MEGA, версия 7.0 (Kumar et al., 2016),

като се използваше референтна секвенция NC_002008 (Kim et al., 1998) и EU789787 (Pang et al., 2009). Секвенциите се анализираха по отношение на единични полиморфни замени и хаплогрупите се определяха съгласно класификациите на Duleba et al. (2015) и Song et al. (2016), както и чрез програмата MitoToolPy (Peng et al., 2015), (<http://www.mitotool.org/mp.html>) с референтна секвенция EU789787 (Pang et al., 2009). Получените данни от изследването се сравняваха с всички налични секвенции за древни кучета в GenBank.

Получените нуклеотидни последователности, включени в това изследване бяха депозирани в GenBank под номера за достъп (NCBI: MN937186-MN937206).

.IV.Резултати

IV.1. Генетично разнообразие при местни породи кучета

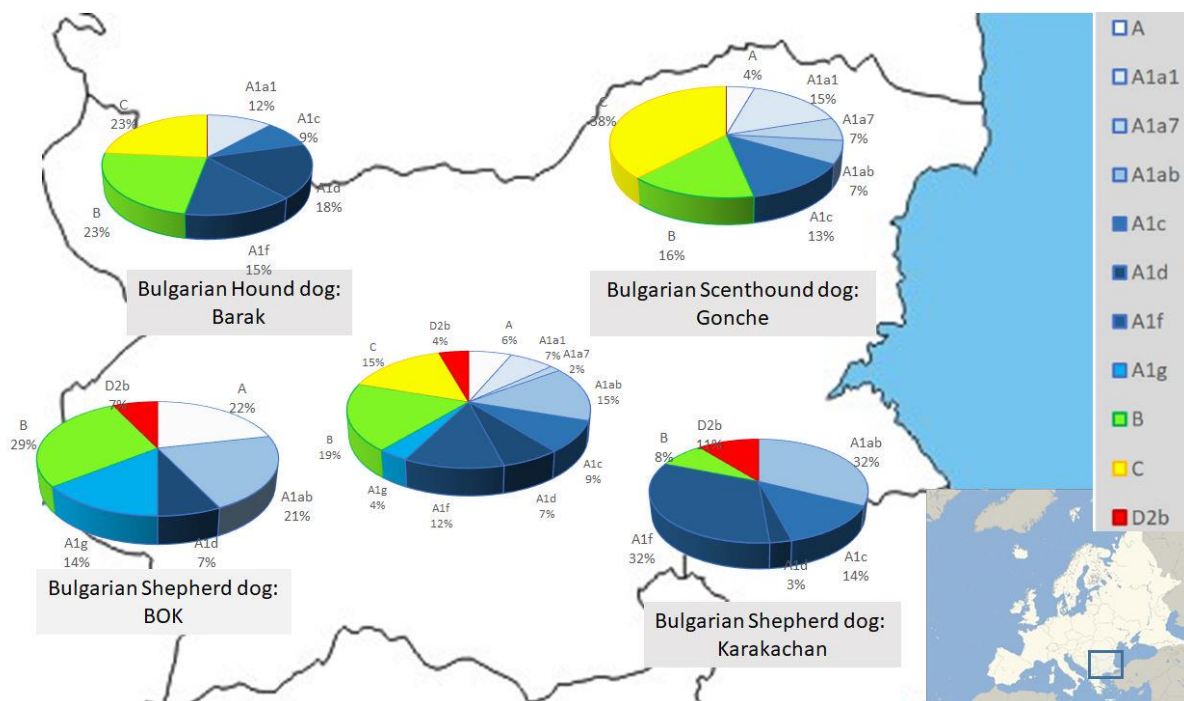
Праймерите HVI-F15453 и HVI-R16107 размножават фрагмент обхващащ гена за транспортната РНК за пролина и началото на HVR1 от D-loop региона. При всички секвенции се наблюдаваше инсерция състояща се от 23 нд от позиция 15 514 нд спрямо референтна секвенция EU789787 (Pang et al., 2009). Бяха дефинирани общо 38 различни хаплотипи, от които 19 уникални в рамките на получените 130 секвенции.

IV.2. Филогенетичен анализ при местни породи кучета

Всяка хапло- и субхаплогрупа при изследваните породи е дефинирана въз основа на специфични единични полиморфни замени в HVR1 региона спрямо референтен пълен митохондрион под номер NC_002008 (Kim et al., 1998), както и с помощта на програмата MitoToolPy (<http://www.mitotool.org/mp.html>) чрез използването на референтна секвенция с номер EU789787 (Pang et al., 2009). Митохондрилните хапло- и субхаплогрупи са определени съгласно класификацията на Duleba et al. (2015).

При филогенетичния анализ се установиха четири основни клада - A, B, C и D (Фиг. 3). Получените резултати показват най-висока честота на европейско-специфичния субклад A1 – 54.78%, следван от клад B1 – 18.94%, клад C1 – 15.33% и средиземноморския - D2b около 5%. Наблюдават се значителни разлики в честотата на хаплогрупите между ловните и овчарските породи (Фиг. 3). В рамките на клад A са дефинирани 8 субклада (A, A1a1, A1a7, A1ab, A1c, A1d, A1f и A1g). В рамките на клад B са определени 2 субклада (B1a1 и B1a4). Клад C и D показват най-

малко разнообразие - наблюдава се само по една субхаплогрупа C1b3 и D2b, съответно (Фиг. 3).



Фигура 3. Честота и разпределение на мтДНК хапло- и субхаплогрупи при изследваните породи кучета.

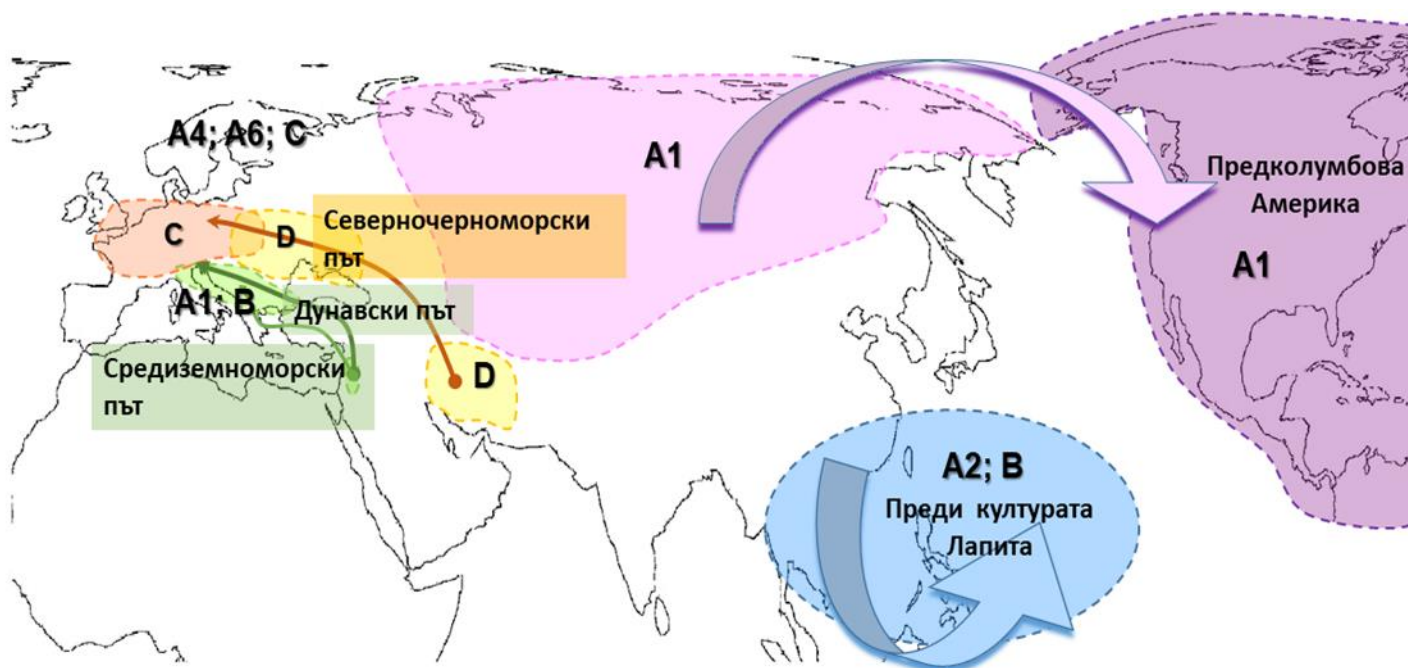
Получените резултати относно разпредлението на различните хапло- субхаплогрупи при отделните породи, дава информация не само за съществените разлики между ловните и овчарските кучета, но позволява да се установят специфични субхаплогрупи, които могат да се използват като маркери при характеризирането на генетичния профил на всяка порода.

IV.3. Генетично разнообразие при древни кучета

дДНК беше успешно амплифицирана при 21 от всичките 25 изследвани проби. От всички 21 сполучливо намножени проби за филогенетичен анализ бяха използвани 16, тъй като обхващат и трите фрагмента от HVR1. Във филогенетичния анализ беше

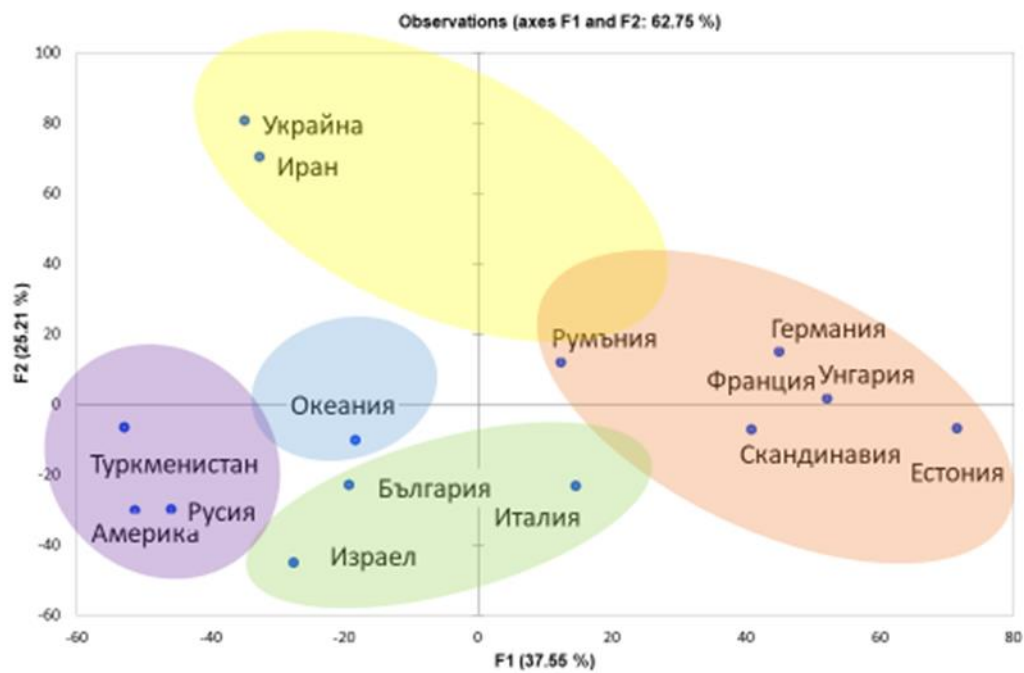
включен само първия фрагмент от HVR1(15 595 bp до 15784 bp (189 bp); EU789787, Pang et al., 2009).

Около 230 секвенции от древни кучета, налични в генетичната база данни GenBank и Dryad Digital Repository (Ollivier et al., 2018a; Oliver et al., 2018b), бяха изследвани и анализирани чрез програмата Reduce-median network. При древните проби са установени и четирите основни групи: A, B, C и D. Наблюдава се ясно географско разпределение на основните кладове, а именно: C и D кладовете са специфични за Централна, Западна и Източна Европа; клад A се разделя на няколко подкладове, A2 за Югоизточна Азия и Тихия океан, A1 за Сибир и Централна Азия, и предколумбова Америка, A4 и A6 за Северна Европа (Скандинавия) A и B кладове характерни за Средиземноморския регион (Италия, България и Израел), (Фиг. 4).



Фигура 4. Популационна структура на древни кучета (мтДНК анализ).

РСА анализът групира всички древни проби в четири различни сегмента в зависимост от честотата на хаплогрупите. Първият включва древни проби от Централна, Западна и Източна Европа (хаплогрупи C и D), вторият включва предколумбова Америка и Централна Азия (Русия - Сибир, Туркменистан), (субхаплогрупи A1), Скандинавия (суб-хаплогрупи A4, A6 и C), и последните сегменти се отнасят за средиземноморския регион (суб-хаплогрупа A1 и B) и Океания (суб-хаплогрупа A2 и B), (Фиг. 5).



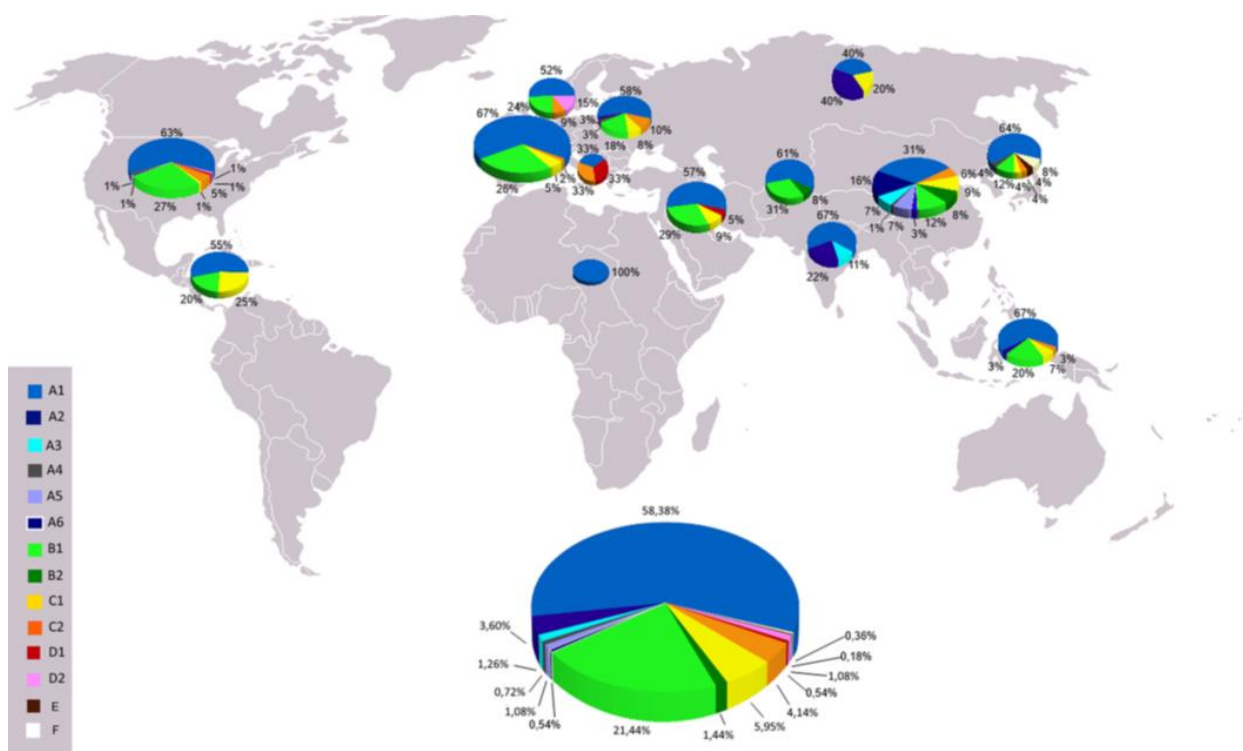
Фигура 5. PCA анализ при древни кучета.

V. Дискусия

Произходът и филогенията на кучето са обект на многобройни изследвания в световен мащаб, но районът на Балканския полуостров остава непроучен. Настоящото изследване предоставя първи данни за произхода, одомашняването и филогенията на древни и съвременни местни кучета. **През Ранния неолит (около 8 000 пр.н.е.) основната дейност на хората е лова и събирането.** В края на ледниковия период преди 15 000 г. и затоплянето на климата (Clark et al., 2005) в южните части на Евразия (Балкански полуостров и Мала Азия) човешките общества преминават от лов и събиране към земеделско-скотовъдски уседнал начин на живот. **В тази връзка се предполага, че настъпва и втория етап от одомашняването на кучето, а именно породообразуването и различните роли, които то изпълнява.**

V.1. Митохондриално разнообразие при местни породи кучета

Универсална филогенетична система, която унифицира досега известната номенклатура (Savolainen et al., 2002; Savolainen et al., 2004; Pereira et al., 2004; Pang, et al., 2009) на митохондриалните хаплогрупи при кучето е предложена от Duleba et al. (2015). Според тази класификация се определят шест основни клади: A, B, C, D, E и F (Фиг. 6).



Фигура 6. Честоти на основните мтДНК хаплогрупи при кучета в света (Duleba et al., 2015).

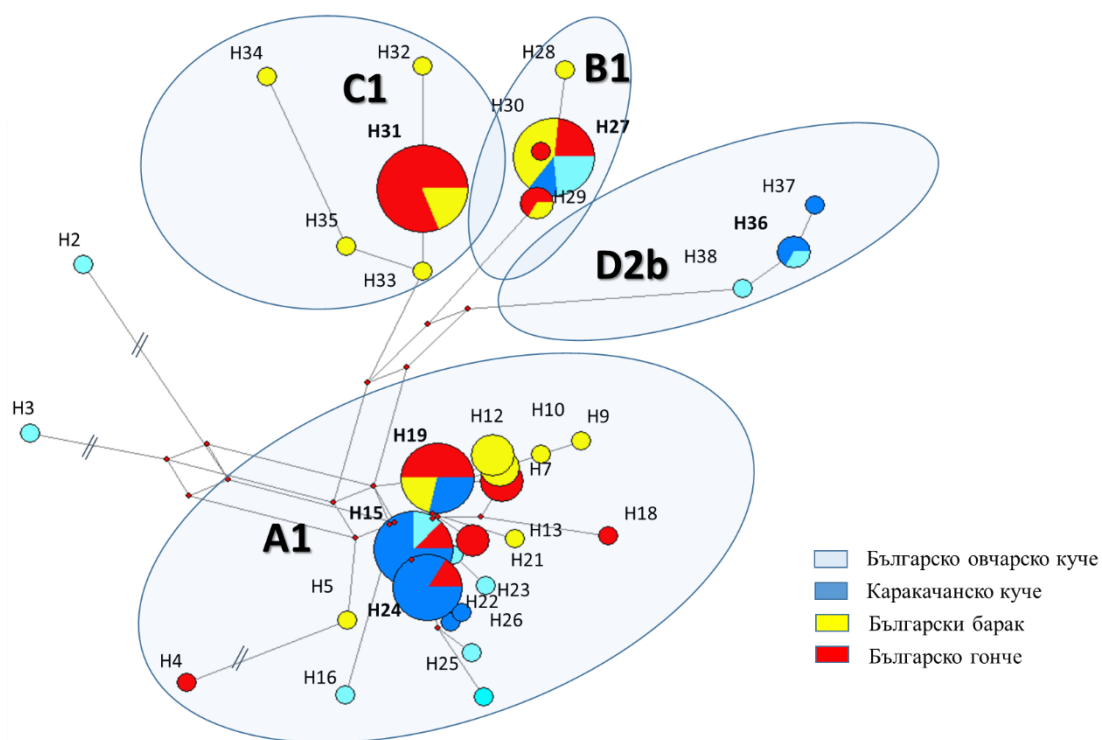
Въпреки, че митохондриалният профил на съвременните породи кучета е подобен в световен мащаб, детайлният анализ на най-широко разпространените хаплогрупи А, В, С и D позволява идентифицирането на типично европейски и азиатски субхаплогрупи. Като типично азиатски такива са определени А2 – А6, В2 и С2b. За типично европейски субхаплогрупи са определени А1а1а3, А1b1а1а, А1b2а1а1, В1а1а, В1а1р, С1а2, С1а4, С2а2, С2а3 (Duleba et al., 2015).

Получените резултати относно честотата на хаплогрупите показват ясни различия при ловните и овчарските породи (Фиг. 3 и Фиг. 7).

VII.1.1. Митохондриално разнообразие при местни ловни породи кучета

При тези породи се наблюдават трите основни клада А, В и С (Фиг. 3). И при двете породи се наблюдава необичайно висока

честота на субхаплогрупа С1 (при ББ около 25%, при БГ около 40%) Тази хаплогрупа е представена само с една субхаплогрупа С1b3. Известно, че тази субхаплогрупа при съвременните южноевропейски популации кучета е с подобна честота (около 20%) (Pires et al., 2006). Това ни дава основание да приемем, че южноевропейските кучета имат сходен генетичен профил. **Нашите данни показват, че тази субхаплогрупа - С1 е характерна за българските ловни породи кучета - Барак и Гонче и не се наблюдава при овчарските породи кучета, което показва изолирана популационна структура на двете групи породи.**



Фигура 7. Филогенетична мрежа на основните митохондриални хаплотипи при три местни и една съвременна породи кучета.

Логично възниква въпроса защо при тези две ловни породи тази субхаплогрупа е с толкова висока честота? Възможни са

няколко обяснения. Едно от тях е свързано с т.нар. “bottleneck” (гърло на бутилка) ефект т.е. случайното наличие на тази субхаплогрупа в малко на брой предшественици в тези породи и запазването и в поколенията. Друго възможно обяснение е запазването на тази група от древни Европейски популации кучета. Както е известно от изследванията на Frantz et al. (2016), преди около 14 000 - 6 000 г. (Ранен неолит – Бронзова епоха). Хаплогрупа С е била доминираща при древните популации кучета (около 60%) в Западна и Централна Европа (Фиг. 2).

Друга характерна особеност при ловните породи спрямо овчарските е наличието на субхаплогрупа А1а1 (около 15%). Тази субхаплогрупа се среща с най-висока честота при европейските популации кучета (около 20%). Тези резултати потвърждават европейският произход на двете ловни породи и могат да бъдат използвани като маркери при определяне генетичният им профил както и за разграничаване от овчарските породи кучета (Фиг. 3).

V.1.2. Митохондриално разнообразие при местни овчарски породи кучета

Предполага се, че овчарските породи на Балканите произлизат от изчезналия Тракийски молос, който е обитавал териториите на древна Гърция, Илирия и Тракия (Kitchell and Kenneth, 2014). Аристотел и Ксенофонт също потвърждават този произход в своите произведения (Cynegeticus) преди около 2000г. Въпросът за произхода на овчарските кучета все още не е напълно изяснен. Получените резултати показват, че А и В хаплогрупите са с най-висока честота при тези породи. За разлика от ловните породи при овчарските не се наблюдава широко разпространената хаплогрупа С.

За разлика от ловните при овчарските породи се наблюдава неустановената досега субхаплогрупа D2b (при БОК около 7%, при КК около 10%) (Фиг. 3). Субхаплогрупа D2 се наблюдава с честота около 2% при планински и овчарски кучета в Португалия и Испания, както и при турското овчарско куче (Кангал) в Мала Азия (Pires et al., 2006; Savolainen et al., 2002). Нашите резултати показват, че субхаплогрупа D2b е представена с уникалните хаплотипи H36 и H37. Тези хаплотипи се различават от всички останали D2 секвенции с транзиция на позиция 15 955T/C според референтна секвенция с номер NC_002008 (Kim et al., 1998) и обхващат 80% от D2 субхаплогрупата.

Фактът, че тези хаплотипи са уникални и се наблюдават само на Балканския полуостров при овчарските породи предполага местния произход на тези породи.

V.3. Генетични изследвания при древни кучета в световен мащаб

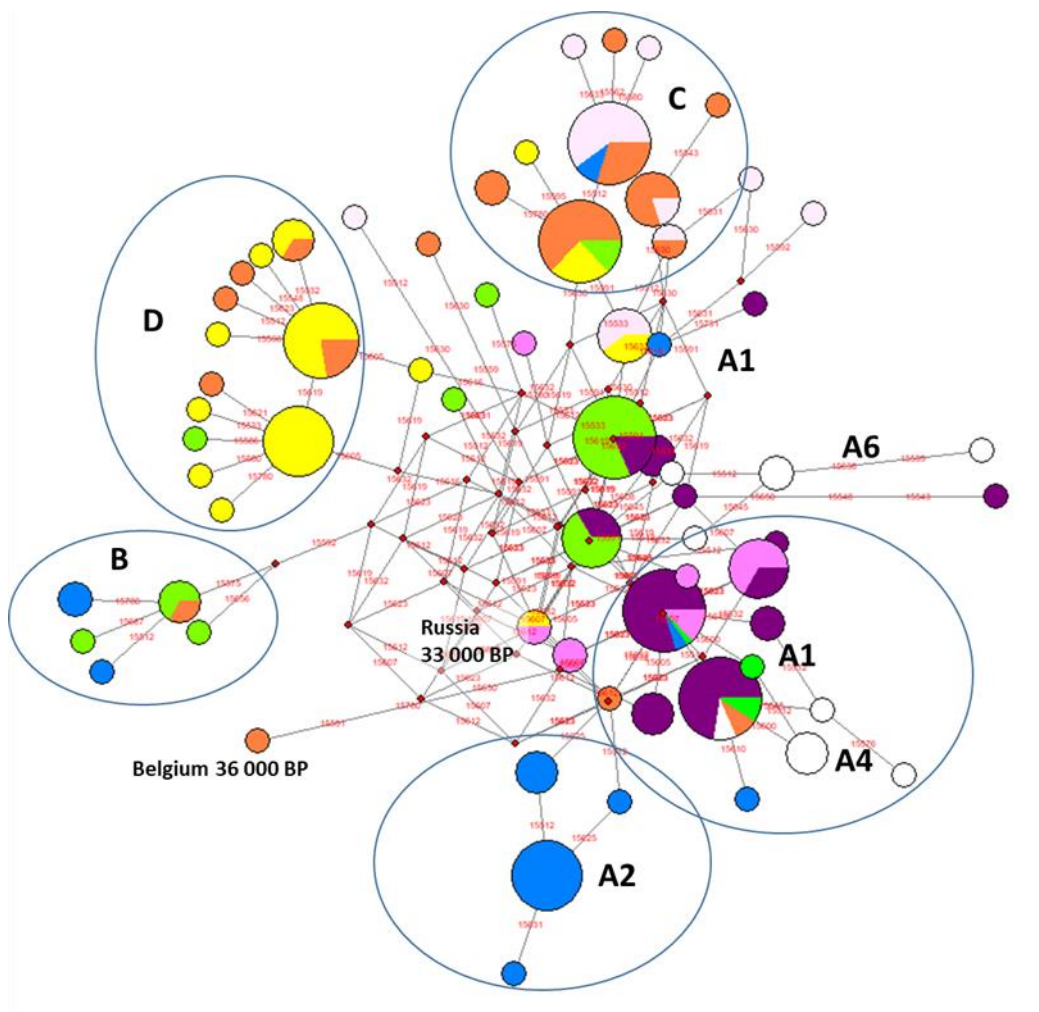
За разлика от молекулярните данни при съвременните кучета, данните от древните кучета показват хомогенна генетична структура на праисторическите популации (Фиг. 4 и Фиг. 8). Установено е, че основните хаплогрупи А, В, С и D при древните кучета показват специфична честота в зависимост от географските региони. Така например за Западна и Централна Европа присъстват кладове С и D като доминантен е клад С (Deguilloux et al., 2009; Pionnier-Capitan, 2010; Thalmann et al, 2013; Frantz et al., 2016). Обратно в Източна Европа (Румъния, Молдова и Украйна) преобладава клад D и наличие на клад С (Pionnier-Capitan, 2010; Thalmann et al, 2013; Frantz et al., 2016; Ollivier et al., 2018a). В Северна Европа (Скандинавия) присъстват специфични субхаплогрупи (A4 и A6) на хаплогрупа А, както и наличие на

хаплогрупа С (Malmstrom et al, 2005; Pionnier-Capitan, 2010; Thalmann et al, 2013). В Близкия Изток (Иран) е установен само клад D (Pionnier-Capitan, 2010). Данните за Югоизточна Азия, Австралия и Тихоокеанските острови, показват идентични хаплогрупи (A2 и B), поради наличие на миграционни процеси от континенталните азиатски части към тихоокеанските острови (Frantz et al., 2016; Greig et al., 2009; 2018a; Greig et al., 2018b). Популациите от предколумбова Америка, притежават субхаплогрупа A1 (Deguilloux et al., 2009; Pionnier-Capitan, 2010; Thalmann et al, 2013; Frantz et al., 2016; Losey et al., 2013; Witt et al, 2015; Bartholdy et al., 2017), (Фиг. 4). Все още голям брой географски региони, не са достъчно добре проучени – Близък Изток, Централна, Южна Азия (Китай и Индия) и др.

V.3.1 Генетични изследвания при древни кучета от България

Нашите данни са първи за района на Балканския полуостров и показват преобладаване на кладове A (70 %) и B (25%) при кучета от Неолита до Античния период (Фиг. 4). През това време честотите на тези кладове се запазват с малки промени. Макар и малко на брой изследваните проби показват резултати в пряк контраст с граничните региони в северната посока, като река Дунав служи за граница (Фиг. 2). От друга страна данните ни корелират с проби от древни кучета от Италия (две проби) и Израел (една проба), от които е установено наличие на кладове A и C за Италия и клад A за Израел (Verginelli et al., 2005; Pionnier-Capitan et al., 2010; Thalmann et al., 2013; Ollivier et al., 2018a). Тези данни, предполагат ясна граница на популациите кучета с преобладаващ клад A. Поради високата честота на клад A в съвременните популации кучета (около 65%), логично е да се

предположи, че древните южноевропейски популации (с преобладаване на клад А и В) са заменили европейските популации, при които преобладават кладове С и D.

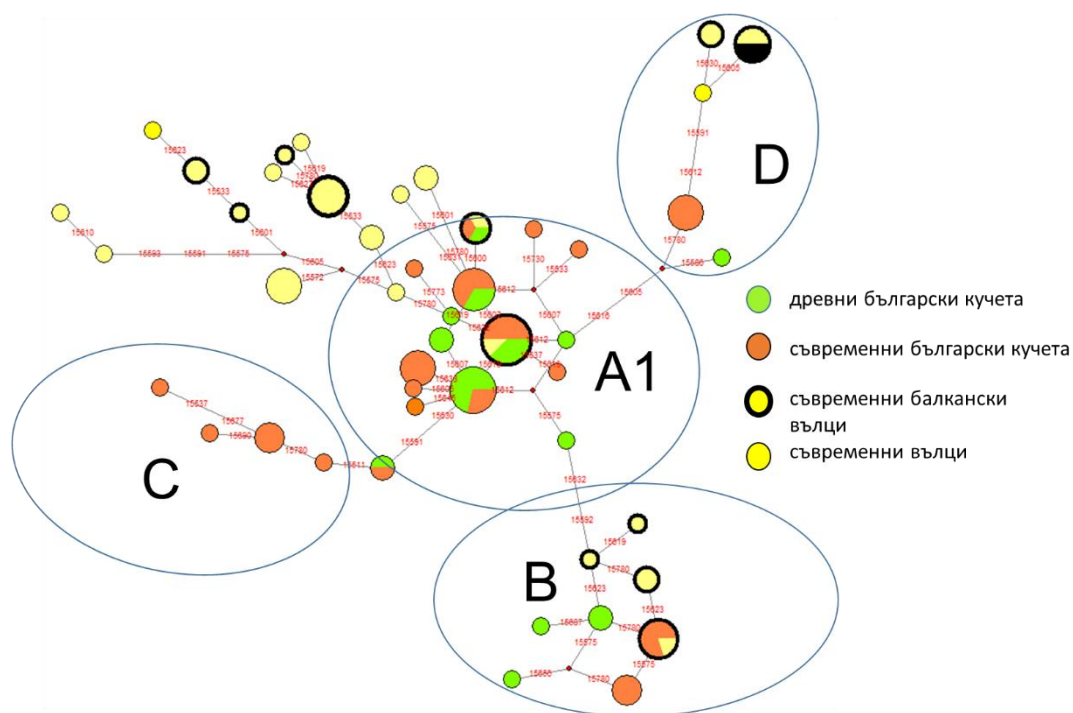


Фигура 8. Филогенетична мрежа, отразяваща мтДНК хаплогрупи и включените в тях хаплотипи при древни проби от различни географски региони. Със син цвят са обозначени пробите от Югоизточна Азия и Океания; в лилаво – американски; цикламено – Сибир и Туркменистан; в жълто – Източна Европа и Иран; в оранжево – Централна и Западна Европа; в бяло – Скандинавия и в зелено - Югоизточна Европа (България).

При съвременните кучета клад В е широко разпространен с честота над 20% (Savolainen et al., 2002; Duleba et al., 2015). Този клад се състои от два субклада В1 и В2. Субкладът В1 присъства

в световен мащаб с честота около 21%, а субкладът B2 е с регионално разпространение главно в Югоизточна Азия с честота около 10% (Duleba et al., 2015; Fregel et al., 2015). Въпреки че клад В е с висока честота в съвременни популации кучета, в древни проби до този момент, този клад се наблюдава с честота около 1% - във Франция, Туркменистан и няколко проби от Югоизточна Азия и Океания (Pionner-Capitan et al., 2010; Ollivier et al., 2018a; Greig et al., 2018). Тези данни не са много изненадващи, тъй като хаплогрупа В е необичайно широко разпространена в съвременни популации на балкански вълци, идентифицирани в няколко изследвания (Tsuda et al., 1997; Vila et al., 1997; Randi et al., 2000; Thalman et al., 2013; Koblmuller et al., 2016). Тези проучвания показват, че клад В е с възможен произход от Балканите, въпреки че има някои случаи на вълци притежаващи клад В в целия свят.

Наличие на клад В с висока честота в древните проби от България предполага възможно одомашняване в Югоизточна Европа (Балканите) от местни балкански вълци (Фиг. 9). В проучването на местните български кучета клад В е наблюдаван с честота около 20% (Marinov et al., 2018), (Фиг. 3).



Фигура 9. Филогенетична мрежа базирана на мтДНК хаплотипи при вълци и древни и съвременни български кучета

Единственото изследване относно Южна Европа за древните кучета и вълци е извършено от Verginelli et al. (2005 г.). В това проучване са изследвани три вълка (или големи кучеподобни) преди 14 000 - 10 000 години и две кучета със среден размер преди 4 000 години. Анализът на пробите от вълци идентифицира кладове А, В и С, а пробите от кучетата спадат към кладове А и В. Поради високите честоти на клад В в популациите на балканските вълци и особено в България (Tsuda et al., 1997; Vila et al., 1997; Randi et al., 2000), Verginelli et al. (2005) препологат възможен произход на клад В при домашните кучета в Югоизточна Европа.

Наличието на хаплогрупи А и В едновременно при съвременните вълци и древните и съвременни югоизточноевропейски кучета предполага хибридизация между вълци и кучета, през мезолитния период (след последния ледников период).

VI. Заключение

Резултатите от проведените изследвания показват специфичен митохондриален профил при местните породи кучета. Очаквано, с най-голяма честота са трите най-широко разпространени хаплогрупи: А (около 55%), В (около 20%) и С (около 15%). По отношение на митохондриалния профил установихме специфични разлики между ловните и овчарските породи. При ловните породи кучета Български барак и Българско гонче се наблюдават високи честоти на хаплогрупа С - около 25% и 40%. Хаплогрупа С присъства с висока честота (около 60%) при древните западноевразийски популации кучета преди повече от 12 000 г. Това е доказателство, че ловните породи са първите създадени такива след одомашняването.

При овчарските породи, за разлика от ловните, се наблюдава наличие на хаплогрупа D: при Българското овчарско куче - около 7%; при Каракачанското куче около - 10%. Спрямо хаплогрупа С, хаплогрупа D възниква много по-късно (преди около 8 000 г.) в Европа. Това доказва, че овчарските породи кучета са създадени много по-късно от ловните породи. Хаплогрупа D присъства единствено при южноевропейските съвременни популации кучета с ниска честота (около 2%). Възможно е наблюдаваната висока честота на хаплогрупа D при съвременните българските овчарски кучета (около пет пъти повече, отколкото при Европейските популации) да се дължи на запазен древен европейски произход.

Резултатите от митохондриалния профил при местните породи кучета потвърждава различният им филогенетичен произход. Специфичният митохондриален профил при ловните и овчарските породи кучета показва отсъствие на хибридизация във

времето между двете групи породи. Това предполага не само различен период на възникване, но и географска изолация.

Резултатите от изследванията на древните проби показват високи честоти на кладове А и В в Югоизточна Европа. Това предполага, че този район е един от няколко възможни центрове на одомашняване. Интересно е, че на територията на Европа се наблюдават четири генетично различни мезолитни и неолитни популации кучета. Това може да се обясни със структурата на древните европейски популации хора и прехода от лов и събиращество към земеделие и скотовъдство, известен като „неолитна революция“.

Всички налични данни досега за хаплогрупа В са доказателство за балканския произход на европейските кучета, притежаващи тази хаплогрупа.

VII. Изводи

Получените резултати от проведените изследвания позволяват да бъдат направени следните изводи:

1. Установен е специфичен митохондриален профил при съвременните местни породи кучета.

1.1. Установено е наличието на основните хаплогрупи А (55%), В (20%) и С (15%).

1.2. Определени са общо 38 хаплотипи при всички изследвани породи, от които 19 уникални.

1.3. Установен е различен митохондриален профил при ловните и овчарски породи.

1.3.1. Ловните породи показват наличие на висока честота на хаплогрупа С (Български Барак - 25%, Българско Гонче – 40%).

1.3.2. Овчарските породи показват наличие на Южноевропейската субхаплогрупа D2 (Българско овчарско куче – 7%, Каракачанско куче – 10%).

1.3.3. Овчарските породи показват наличие на европейската субхаплогрупа A1ab (Българско овчарско куче – 20%, Каракачанско куче – 30%).

2. Установен е специфичен митохондриален профил при древни кучета.

2.1. Установено е наличието на субхаплогрупи A1(70%), B1(25%) и хаплогрупа D(5%) при древни кучета от България.

2.2. Подобен профил е установен единствено при древни кучета от Италия, което говори за изолираност на Балканите и Апенините от останалите части на Европа.

2.3. Наличието на хаплогрупа В с висока честота едновременно при древни кучета и съвременни вълци предполага

локално одомашняване на древни вълци притежаващи тази хаплогрупа.

2.4. Високата честота на хаплогрупа С (около 30%) при съвременни местни ловни породи кучета на Балканския полуостров и отсъствието и при древни кучета на Балканите може да се обясни посредством миграционни процеси на хората във времеви и географски аспект.

VIII. Приноси

1. Приноси с оригинален характер.

1.1. За първи път за района на Балканите е проведено целенасочено изследване на местни ловни и овчарски породи кучета на базата на мтДНК (HVR1) анализ.

1.2. На базата на секвенционен анализ са получени 130 секвенции, които са публикувани в генетичната база данни (GenBank) под номера MG920357 – MG920486.

1.3. На базата транзиция 15 955 C/T спрямо референтна секвенция NC_002008 е определен специфичен хаплотип за територията на България при Каракачанската овчарка.

1.3. Установен е независим във времето филогенетичен произход при ловните и овчарски породи, дължащ се най-вероятно на продължителна териториална изолация.

1.4. Установено, е че всяка една от изследваните породи показва специфичен генетичен профил, който може да бъде използван при генетично определяне на породата.

1.5. От изследваните 25 археозоологични проби (обхващащи периода 6 000 пр.н.е. до 300 н.е.) успешно са намножени участъци от мтДНК на HVR1 региона от 20 проби (депозирани в GenBank с номера MN937186–MN937206).

1.6. Получените резултати от изследването на древни проби допринасят за изясняване произхода, одомашняването и биогеографията на вида *Canis lupus familiaris*.

2. Приноси с потвърдителен характер.

2.1. Митохондриалният анализ установи местен европейски произход на изследваните местни породи кучета.

2.2. Митохондриалният анализ на изследваните местни породи показва сходни честоти на световните хаплогрупи А, В и С (65%, 20% и 10% респективно).

IX. Публикации свързани с темата на дисертацията

Marinov, M., Teofanova, D., Gadjev, D., Radoslavov, G., & Hristov, P. (2018). Mitochondrial diversity of Bulgarian native dogs suggests dual phylogenetic origin. PeerJ, 6, e5060. doi: 10.7717/peerj.5060. Импакт фактор - 2,1.

Yankova, I., **Marinov, M.**, Neov, B., Petrova, M., Spassov, N., & Hristov, P. Radoslavov, G (2019). Evidence for Early European Neolithic Dog Dispersal: New Data on South-Eastern European subfossil dogs from Prehistory and Antiquity Ages. Genes (Basel), 10(10). pii: E757. doi: 10.3390/genes10100757. Импакт фактор - 3,3.

Х. Участие на национални форуми

1. **Miroslav Marinov**, Peter Hristov, Ani Georgieva, Daniela Sirakova, Boiko Neov, Georgi Radoslavov. 2017. Mitochondrial profile in Bulgarian native breeds of dogs. Ветеринарната медицина в полза на хората – Международна научна конференция, 6-7 октомври 2017, Стара Загора. Презентация.
2. Miroslav Marinov, Denitsa Teofanova, Georgi Radoslavov, Peter Hristov. 2018. Mitochondrial diversity of bulgarian native dogs suggests dual phylogenetic origin. 11-th Annual “Seminar of Ecology – 2018” with international participation, 26-27 April 2018, Sofia. Презентация.
3. Miroslav Marinov, Denitsa Teofanova, Georgi Radoslavov, Peter Hristov. 2018. Mitochondrial diversity of Bulgarian native dogs. Международна научна конференция „Българското европредседателство – иновации и просперитет 31 май - 1 юни. Презентация.
4. Искра Янкова, Miroslav Marinov, Georgi Radoslavov, Peter Hristov. 2018. Comparative genetic analysis of subfossil dogs (from the neolithic age and late antiquity) and present-day local dogs 130 години Софийски университет „Св. Климент Охридски“ Климентови дни Биологически факултет. Постер.

Литература

1. Ardalan A, Kluetsch CF, Zhang AB, Erdogan M, Uhlén M, Houshmand M, Tepeli C, Reza S, Ashtiani M, Savolainen P. (2011). Comprehensive study of mtDNA among Southwest Asian dogs contradicts independent domestication of wolf, but implies dog–wolf hybridization. *Ecology and Evolution* 1:373-385. DOI: 10.1002/ece3.35.
2. Bartholdy, B. P., Murchie, T. J., Hacking, K., & Verwoerd, C. (2017). Dog days on the Plains: a preliminary aDNA analysis of canid bones from southern Alberta and Saskatchewan. *Canadian Journal of Archaeology*, 41, 17. Goebel, T., Waters, M. R., & O'Rourke, D. H. (2008). The late Pleistocene dispersal of modern humans in the Americas. *science*, 319(5869), 1497-1502.
3. Boyko, A. R., Boyko, R. H., Boyko, C. M., Parker, H. G., Castelhamo, M., Corey, L., Ostrander, E. A. (2009). Complex population structure in African village dogs and its implications for inferring dog domestication history. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(33), 13903-13908. Brown, S. K. Darwent, C. M. & Sacks, B. N. (2013). Ancient DNA evidence for genetic continuity in arctic dogs. *Journal of Archaeological Science* 40, 1279-1288 <https://doi.org/10.1016/j.jas.2012.09.010>.
4. Brown, S. K. Darwent, C. M. & Sacks, B. N. (2013). Ancient DNA evidence for genetic continuity in arctic dogs. *Journal of Archaeological Science* 40, 1279-1288 <https://doi.org/10.1016/j.jas.2012.09.010>.
5. Dimitrijević, V. & Vuković, S. Was the dog locally domesticated in the Danube Gorges? (2015). Morphometric study of dog cranial remains from four Mesolithic–Early Neolithic archaeological sites by comparison with contemporary wolves. *International Journal of Osteoarchaeology* 25, 1-30, <https://doi.org/10.1002/oa.2260>.
6. Duleba A, Skonieczna K, Bogdanowicz W, Malyarchuk B, Grzybowski T. (2015). Complete mitochondrial genome database and standardized classification system for *Canis lupus familiaris*. *Forensic Science International: Genetic* 19:123-129.
7. Frantz LA, Mullin VE, Pionnier-Capitan M, Lebrasseur O, Ollivier M, Perri A, Linderholm A, Mattiangeli V, Teasdale MD, Dimopoulos EA, Tresset A, Duffraisse M, McCormick F, Bartosiewicz L, Gál E, Nyerges ÉA, Sablin MV, Bréhard S, Mashkour M, Bălăşescu A, Gillet B, Hughes S, Chassaing O, Hitte C1, Vigne JD, Dobney K, Hänni C, Bradley DG, Larson G. (2016). Genomic and archaeological evidence suggest a dual origin of domestic dogs. *Science*, 352(6290): 1228-1231.
8. Germonpré M, Sablin M, Stevens R, Robert E.M.Hedges R, Hofreiter M, Stillere M, Després V. (2009). Fossil dogs and wolves from Palaeolithic sites in Belgium, the Ukraine and Russia: osteometry, ancient DNA and stable isotopes. *J. Archaeol. Sci.* 36: 473–490 .
9. Greig, K., Boocock, J., Allen, M. S., Walter, R. & Matisoo-Smith, E. (2018b). Ancient DNA evidence for the introduction and dispersal of dogs in New Zealand. *Journal of Pacific Archaeology* 9, 1–10.

10. Greig, K., Gosling, A., Collins, C. J., Boocock, J., McDonald, K., Addison, D. J., Liu, F. (2018a). Complex history of dog (*Canis familiaris*) origins and translocations in the Pacific revealed by ancient mitogenomes. *Scientific reports*, 8(1), 9130.
11. Hristov P, Spassov N, Iliev N, Radoslavov G. (2015). An independent event of Neolithic cattle domestication on the South-eastern Balkans: evidence from prehistoric aurochs and cattle populations. *Mitochondrial DNA*. 28(3):383-391.
12. Ivanov S. (1959) The food with animal origin of the inhabitants of the Southern Gate of Preslav. *Archaeological Institute and Museum*, 22, p. 208 p. Note: The material is from the unpubl. Coll. of S. Ivanov (1957-1959, labeled IX-X century).
13. Kim KS, Lee SE, Jeong HW, Ha JH. (1998). The complete nucleotide sequence of the domestic dog (*Canis familiaris*) mitochondrial genome. *Molecular phylogenetics and evolution*, 10(2): 210-220.
14. Kitchell Jr, Kenneth F. (2014). *Animals in the Ancient World from A to Z*. Routledge, p. 262
15. Klimscha, F. (2011). Flint axes, ground stone axes and “battle axes” of the Copper Age in the Eastern Balkans. DAVIS, V.; EDMONDS, M. *Stone axe studies III*. Oxford: Oxbow, 361-382.
16. Larson G, Karlsson EK, Perri A, Webster MT, Ho SY, Peters J, Stahl PW, Piper PJ, Lingaas F, Fredholm M, Comstock KE, Modiano JF, Schelling C, AgoulNIK AI, Leegwater PA, Dobney K, Vigne JD, Vilà C, Andersson L, Lindblad-Toh K. (2012). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 109: 8878–8883.
17. Leshtakov P. & Klasnakov M. (2010). Rescue Archaeological Excavations of the Praehistoric Site in the region of Acladi Cheiri near Chernomorets Village. *Archeologicheski otkritia I razkopki prez 2009* (Archaeological discoveris and excavations in 2009). *Natl. Archaeological Inst. And Museum, Bulg. Acad Sci Sofia*, 2009, pp 58-61.
18. Lindblad-Toh, K., Wade, C. M., Mikkelsen, T. S., Karlsson, E. K., Jaffe, D. B., Kamal, M., ... & Mauceli, E. (2005). Genome sequence, comparative analysis and haplotype structure of the domestic dog. *Nature*, 438(7069), 803.
19. Macaulay, M. Richards, E. Hickey, E. Vega, F. Cruciani, V. Guida, R. Scozzari, B. Bonn  -Tamir, B. Sykes, A. Torroni, The emerging tree of West Eurasian mtDNAs: a synthesis of control-region sequences and RFLPs, *Am. J. Hum. Genet.* 64 (1) (1999) 232–249. <http://dx.doi.org/10.1086/302204>.
20. Malmstrom, H., Stora, J., Dalen, L., Holmlund, G., & Gotherstrom, A. (2005b). Extensive human DNA contamination in extracts from ancient dog bones and teeth. *Molecular biology and evolution* 22, 2040-2047, <https://doi.org/10.1093/molbev/msi195>
21. Marinov, M., Teofanova, D., Gadjev, D., Radoslavov, G., Hristov, P. (2018). Mitochondrial diversity of Bulgarian native dogs suggests dual phylogenetic origin. *PeerJ*, 6, e5060.
22. Mathieson, I., Alpaslan-Roodenberg, S., Posth, C., Sz  cs  nyi-Nagy, A., Rohland, N., Mallick, S., Fernandes, D. (2018). The genomic history of southeastern Europe. *Nature*, 555(7695), 197.

23. Ollivier, M., Tresset, A., Frantz, L. A., Bréhard, S., Bălăşescu, A., Mashkour, M., Bartosiewicz, L. (2018). Dogs accompanied humans during the Neolithic expansion into Europe. *Biology letters*, 14(10), 20180286.
24. Pang JF, Kluetsch C, Zou XJ, Zhang AB, Luo LY, Angleby H, Ardalan A, Ekström C, Skölleremo A, Lundeberg J, Matsumura S, Leitner T, Zhang YP, Savolainen P. (2009). mtDNA data indicate a single origin for dogs south of Yangtze River, less than 16,300 years ago, from numerous wolves. *Molecular Biology and Evolution*. 26: 2849-2864.
25. Peters HB. (1938). "Der Karakatschan hund, Zeitschrift für Hundeforschung", Verlag Dr. Paul Schöps, Leipzig.
26. Pires AE, Ouragh L, Kalboussi M, Matos J, Petrucci-Fonseca F, Bruford MW. (2006). Mitochondrial DNA sequence variation in Portuguese native dog breeds: diversity and phylogenetic affinities. *Journal of Heredity* 9:318-330. DOI: 10.1093/jhered/esl006.
27. Randi, E., Lucchini, V., Christensen, M. F., Mucci, N., Funk, S. M., Dolf, G., & Loeschcke, V. (2000). Mitochondrial DNA variability in Italian and East European wolves: detecting the consequences of small population size and hybridization. *Conservation Biology*, 14(2), 464-473.
28. Richards, M. B., Macaulay, V. A., Bandelt, H. J., & Sykes, B. C. (1998). Phylogeography of mitochondrial DNA in western Europe. *Annals of human genetics*, 62(3), 241-260.
29. Sablin M, Khlopachev G. (2002). The Earliest Ice Age Dogs: Evidence from Eliseevichi 1. *Curr. Anthropol*. 43: 795–799.
30. Savolainen P, Zhang Y-P, Luo J, Lundeberg J, Leitner T. (2002). Genetic evidence for an East Asian origin of dogs. *Science*. 298: 1610–1613 .
31. Savolainen, P., Leitner, T., A.-N. Wilton, A.-N., Matisoo-Smith E., Lundeberg, J (2004). A detailed picture of the origin of the Australian dingo, obtained from the study of mitochondrial DNA, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*101(33)12387–12390.
32. Sedefchev At, Sedefchev S. (2007). "Karakachan Dog. Preservation of the aboriginal guarding dog of Bulgaria", *PADS Newsletter* 18.
33. Spassov, N. & Iliev, N. (2002). The animal bones from the prehistoric necropolis near Durankulak and the latest record of *Equus hydruntinus* Regalia (NE Bulgaria). *Durankulak*, 2, 249-261.
34. Spassov, N., Hristova, L., & Iliev, N. (2018). The domesticated horses from the submerged prehistoric village of Urdoviza (Kiten) on the Bulgarian Black Sea coast—among the oldest known. *Historia naturalis bulgarica*, 25, 11-14.
35. Spassov, N., Iliev, N., Boev, Z. (2001). Animal remains from the Eneolithic site near the village of Dolnoslav, Plovdiv District, South Bulgaria. *Historia naturalis bulgarica* 13, 159-179.
36. Tsuda, K., Kikkawa, Y., Yonekawa, H., & Tanabe, Y. (1997). Extensive interbreeding occurred among multiple matriarchal ancestors during the domestication of dogs: evidence from inter-and intraspecies polymorphisms in the D-loop region of mitochondrial DNA between dogs and wolves. *Genes & genetic systems*, 72(4), 229-238.

37. Verginelli F, Capelli C, Coia V, Musiani M, Falchetti M, Ottini L, Palmirotta R, Tagliacozzo A, De Grossi Mazzorin I, Mariani-Costantini R. (2005). Mitochondrial DNA from prehistoric canids highlights relationships between dogs and South-East European wolves. *Molecular Biology and Evolution*, 22(12): 2541-2551.
38. Witt, K. E., Judd, K., Kitchen, A., Grier, C., Kohler, T. A., Ortman, S. G., & Malhi, R. S. (2015). DNA analysis of ancient dogs of the Americas: Identifying possible founding haplotypes and reconstructing population histories. *Journal of human evolution*, 79, 105-118.
39. Yang, D. Y., Eng, B., Wayne, J. S., Dudar, J. C., Saunders, S. R. (1998). Improved DNA extraction from ancient bones using silica-based spin columns. *American Journal of Physical Anthropology: The Official Publication of the American Association of Physical Anthropologists*, 105(4), 539-543.

SUMMARY

Molecular-Population Research of Local Dogs in Bulgaria

The history of dog domestication is still under debate, but it is doubtless the process of an ancient partnership between dogs (*Canis familiaris*) and humans. Although data on ancient DNA for dog diversity are still incomplete, it is clear that several regional dog populations had formed in Eurasia up to the Holocene. During the Neolithic Revolution and the transition from hunter-gatherer to farmer societies, followed by civilization changes in the Antiquity period, the dog population structure also changed. This process was due to replacement with newly formed dog populations. In this study, we present for the first time mitochondrial data of ancient dog remains from the Early Neolithic (8000 years before present (BP)) to Late Antiquity (up to 3th century AD) and three native dog breeds from Bulgaria.

A total of 16 samples were analyzed, using the mitochondrial D-loop region (HVR1). The results show the presence of A (70%) and B (25%) clades throughout the Early and Late Neolithic Period. In order to clarify the position of our results within the ancient dog population in Eneolithic Eurasia, we performed phylogenetic analysis with the available genetic data sets. This data showed a similarity of the ancient Bulgarian dogs to Italian (A, B, and C clades) and Iberian (clades A and C) dogs' populations. A clear border can be seen between southern European genetic dog structure, on the one hand, and on the other hand, central-western (clade C), eastern (clade D) and northern Europe (clades A and C). This corresponds to genetic data for European humans during the same period, without admixture between dog populations. Also, our data have shown the presence of clade B in ancient Eurasia. This is not unexpected, as the B haplogroup is widely distributed in extant Balkan dogs and wolves. The spreading of this clade across Europe, together with the A clade, is related to the possible dissemination of newly formed dog breeds from Ancient Greece, Thrace, and the Roman Empire.

We also perform phylogenetic analysis of three native Bulgarian dog breeds. A total of 130 samples were analyzed at HVR1 (hypervariable region, D-loop region). The samples were taken from two hunting dog breeds (Barak, n=34; Gonche, (n=45) as well as from a Bulgarian Shepherd Dog (n=51). The results have shown the presence of almost all main clades A, B, C and D in the three dog breeds taken together, as expected. With regard to haplogroups distribution, there are clear differences among investigated breeds. While hunting breeds exhibit a prevalence of clade C, the mountainous Shepherd dog shows presence of the D2 haplogroup but absence of the C clade. The results in native hunting and shepherd dogs have revealed a clear difference of haplogroups dissemination, which suggests a dual independent phylogenetic origin. The Bulgarian native dog population is characterized by the highest frequency of clade A (55%), followed by clade B and C (about 18%) and the specific South-European clade D2 (about 10%).

РЕЗЮМЕ

Молекулярно-популационни изследвания на местни породи кучета в България

Историята на опитомяването на кучетата все още е неясна, но несъмнено процесът е партньорство между древните кучета и хората. Въпреки, че данните от древната ДНК от кучетата, все още са непълни, ясно е, че няколко регионални популации на кучета са се образували в Евразия до холоцена. По време на неолитната революция и прехода от ловци-събирачи към фермерски общества и последващите цивилизационни промени в периода на античността, структурата на популацията на кучета също се изменя. Този процес се обуславя от заместването на старите местни кучета с новообразувани нови породи. В това проучване за първи път представяме данни за митохондриалната ДНК от древни кучета от ранния неолит (8000 години преди настоящето) до късната античност (III в. сл. Хр.) както и от три съвременни местни породи кучета от България.

Бяха анализирани общо 16 древни проби, по хипервариабилният митохондриален D-loop регион (HVR1). Резултатите показваха наличието на А (70%) и В (25%) митохондрилни групи през целия ранен и късен неолит. За да изясним позицията на нашите резултати за древните кучета в енеолитна Евразия, извършихме филогенетичен анализ с наличните генетични данни. Тези анализи показаха сходство на древните български кучета с италианските (А, В и С) и иберийските (А и С) популации. Установена е ясно разграничаване между генетичната структура на кучетата в Южна Европа, от една страна, и от друга страна, централно-западна (С), източна (D) и северна Европа (А и С) през Неолита. Това съответства на генетичните данни и за европейците през същия период. Също така, нашите данни показват наличието на клад В в древна Евразия. Това не е неочаквано, тъй като група В е широко разпространена сред съвременните балкански кучета и вълци. Разпространението на тази група в Европа, заедно с група А, е свързано с възможно разселване на новообразувани породи кучета от Древна Гърция, Тракия и Римската империя.

Направихме също и филогенетичен анализ на трите местни български породи кучета. Общо 130 проби бяха анализирани по хипервариабилният митохондриален D-loop регион. Изследвани са две породи ловни кучета (Барак, n=34; Гонче, (n=45), както и от българско овчарско куче (n=51). Резултатите показаха наличието на почти всички основни кладове А, В, С и D в трите породи кучета, взети заедно, както се очаква. По отношение на разпределението на групите има ясни разлики между изследваните породи. Докато ловните породи се характеризират с клад С, планинското овчарско куче показва присъствие на специфичната D2 хаплогрупа и отсъствие на клад С. Резултатите при местните ловни и овчарски кучета показват двоен независим филогенетичен произход. Българската популация на кучетата се характеризира с най-висока честота на клад А (55%), следвана от клад В и С (около 18%) както и специфичната южноевропейска група D2 (около 10%).