

# АНАЛИЗ АССОЦИАЦИЙ МЕЖДУ ХОЗЯЙСТВЕННО-ПОЛЕЗНЫМИ ПРИЗНАКАМИ РОМАНОВСКИХ ОВЕЦ И ISSR-PCR МАРКЕРАМИ

## ANALYSIS OF ASSOCIATIONS BETWEEN ECONOMIC USEFUL TRAITS OF ROMANOV SHEEP AND ISSR-PCR MARKERS

*L. Nesteruk  
N. Makarova  
G. Svishcheva  
Yu. Stolpovsky*

### Annotation

The article presents the results of the analysis of association between the economic useful traits and ISSR-PCR markers of Romanov sheep breed. For the first time, the impact of the genetic structure represented by anonymous sequences flanked by inverted repeats of microsatellite loci on the variability of phenotypic traits is found. Using F-test, reliable relationship with several ISSR-PCR markers was determined for 9 traits of productivity. In addition, correlations between of selected economic useful traits and the influence of factors such as sex, population origin and breeding line were studied. Using the method of Pearson's correlation coefficient, significant correlation between productivity characters (live weight, wool yield, wool density, average fertility and others) is identified.

**Keywords:** Romanov breed, ISSR-PCR, sheep genetics, genetic structure, economic useful traits, F-test, Pearson's test.

*Нестерук Любовь Викторовна  
Н.с., ФГБУН Институт общей генетики  
им. Н.И. Вавилова РАН, Москва  
Макарова Наталья Николаевна  
Директор по животноводству  
ООО "АгриВолга", Углич  
Свищева Гульнара Рустамовна  
К.б.н., с.н.с., ФГБУН  
Институт общей генетики  
им. Н.И. Вавилова РАН, Москва  
Столповский Юрий Анатольевич  
Д.б.н., зав. лаборатории  
сравнительной генетики животных,  
ФГБУН Институт общей генетики  
им. Н.И. Вавилова РАН, Москва*

### Аннотация

Выполнен анализ ассоциаций между хозяйственно-полезными признаками и ISSR-PCR маркерами у романовской породы овец. Впервые установлено влияние генетической структуры, представленной анонимными последовательностями, фланкированными инвертированными повторами микросателлитных локусов, на изменчивость фенотипических признаков. С помощью критерия Фишера были выявлены достоверные ассоциации с несколькими ISSR-PCR маркерами для 9 признаков продуктивности. Кроме того, были изучены корреляционные связи между селекционируемыми хозяйственно-полезными признаками и влияние таких факторов как пол, популяционная принадлежность и заводская линия. С использованием метода Пирсона выявлена достоверная высокая взаимосвязь между признаками продуктивности (живая масса, настриг шерсти, густота шерсти, средняя плодовитость и другие).

### Ключевые слова:

Романовская порода, ISSR-PCR, генетика овец, генетическая структура, хозяйственно-полезные признаки, критерий Фишера, тест корреляции Пирсона.

## ВВЕДЕНИЕ

Романовская порода овец – это уникальная отечественная порода. Она относится к грубошерстным породам шубного направления продуктивности и сочетает в себе ряд ценных продуктивных качеств, таких как высокая плодовитость, великолепное качество овчины и скороспелость. Романовские овцы всегда были и остаются гордостью российского животноводства.

Стремления повысить продуктивность сельскохозяйственных животных существовали всегда. Селекционно-племенная работа направлена на отбор фенотипических признаков, характеризующих продуктивность, жизнеспособность и экстерьер. В дополнение к традиционной селекционной работе по количественным признакам необходимо познание наследственной основы их продуктивности. В последние десятилетия произошло стремительное развитие молекулярно-генетических методов по

выявлению и оценки ДНК полиморфизма. Использование ДНК-макеров в селекционном процессе позволяет успешно решать ряд задач, связанных с отбором и подбором, воспроизводством необходимых генотипов, выявлением хозяйственно-ценных и породоспецифических ассоциаций генов, сохранением генофондов животных и т.д. Информация на молекулярном уровне поможет оценить потенциальную продуктивность животных и повысить точность селекции, а следовательно и селективный ответ (Ерохин, Ерохин, 2004; Абонеев и др., 2006; Глазко и др., 2014; Марзанов и др., 2012). Поиск данных маркеров и построение на их основе генных карт уже привели к существенным положительным результатам по некоторым видам сельскохозяйственных животных. Так например, для крупного рогатого скота и свиньи достигнуто значительное насыщение генных карт маркерными локусами (Глазко, Глазко, 2001; Юдин, Воевода, 2015). Однако генная карта овцы исследована в меньшей степени и требует дальнейших насыщения, доработок и изучения взаимосвязи "фенотип-генотип". В настоящее время по программе международного консорциума секвенированы геномы двух особей породы тексель, но продолжается работа по улучшению текущей сборки и ее аннотации (Jiang et al., 2014; <http://www.sheepmap.org/>).

В многочисленных работах отечественных ученых, в том числе и по романовской породе, изучалось влияние различных факторов на фенотип и генотип животных и исследовалась взаимосвязь этих признаков между собой, в результате чего установлено, что изменчивость одного из селекционных признаков зависит от изменчивости других признаков (Арсеньев, Арсеньева, 1976; Арсеньев, 1989; Ерохин, 2000; 2005; Эрнст, Зиновьева, 2008; Канева и др., 2013). Таким образом, чтобы разрабатывать эффективные методы селекции необходимы знания о взаимосвязи между хозяйственно-полезными признаками, то есть умелое использование закона соотносительной (коррелятивной) изменчивости.

С учетом современного состояния генофонда романовской овцы, ее уникальных качеств и относительно небольшой численности (64.9 тыс. голов на конец 2013 г.

(Фураева и др., 2015; Ежегодник по племенной работе ..., 2014)) разработка генетико-селекционных программ по ее сохранению и совершенствованию остается весьма актуальной задачей (Москаленко и др., 2014). Для достижения этой цели необходима комплексная оценка генетического потенциала и внедрение новых методологий селекционной работы по совершенствованию изучаемой породы.

Ранее с использованием ISSR-фингерпринтинга нами была исследована генетическая структура генофонда романовской породы овец из хозяйств Ярославской области с помощью двух динуклеотидных праймеров ((AG)<sub>9</sub>C и (GA)<sub>9</sub>C) (Столповский и др., 2008; Макарова и др., 2013).

Целью данного исследования являются анализ влияния выявленной генетической структуры (AG- и GA-ISSR-маркеры) на изменчивость хозяйственно-полезных признаков романовских овец и оценка взаимосвязи анализируемых признаков продуктивности овец романовской породы.

#### Материалы и методы

Исследование выполняли на объединенной выборке романовских овец из 5 ведущих племенных и генофондных хозяйств Угличского района Ярославской области (табл. 1). Материалом послужили данные индивидуальных карточек, бонитировок и продуктивности, предоставленные из компьютерных баз данных хозяйств. В анализ вошли данные по 268 особям, которые были измерены по всем исследуемым фенотипическим признакам.

Для обнаружения ассоциаций между хозяйственно-полезными признаками и генетическими маркерами использовали критерий Фишера, основанный на F-статистике. Для проверки значимости устанавливали нулевую гипотезу ( $H_0: \gamma=0$ , эффект генотипов равен 0) против альтернативной ( $H_1: \gamma \neq 0$ ). Для отклонения или принятия гипотез вычисленные p-значения сравнивали с номинальным значением 0.05.

Таблица 1.

Исследованные популяции романовской породы овец

Популяция	Объем выборки, гол.	Место отбора проб
Авангард	78	ООО "Агрофирма Авангард"
Земледелец	30	ООО "Агрофирма Земледелец"
Дружба	39	ООО "Дружба"
Заречье	98	ООО "Заречье"
Красный Перекоп	23	ООО "Красный Перекоп"

Все анализируемые показатели были условно разделены на основные признаки и ковариаты. В качестве основных признаков были взяты 11 хозяйственно-полезных признаков: "живая масса" (кг), "настриг шерсти" (кг/год), "уравненность шерсти", "густота шерсти", "соотношение ости и пуха (по количеству)", "оброслость брюха", "комплексный класс", "соотношение ости и пуха (по длине)", "средняя плодовитость", "максимальное число ягнят (за один окот)" и "наличие мертворожденных (м/р) ягнят", а в качестве ковариат – показатели, неменяющиеся во времени: "пол", "популяционная принадлежность", "заводская линия" и "тип рождения". Все основные признаки были поправлены на ковариаты.

Генетические маркеры представлены ISSR-PCR маркерами – анонимными последовательностями, фланкированными инвертированными повторами микросателлитных локусов (по 38 локусов по праймерам (AG)<sub>9</sub>C и (GA)<sub>9</sub>C).

В качестве модели наследования каждого изучаемого признака использовали регрессионную линейную модель фиксированных эффектов, с помощью которой осуществляется поиск ассоциаций между *i*-ым признаком и *j*-ым локусом:

$$y_i = X\alpha + G_j\beta + g_j\gamma + e$$

где

$y_i$  - ( $n \times 1$ ) вектор значений *i*-ого признака;

$n$  – число особей ( $n=268$ );

$X$  - ( $n \times c$ ) матрица ковариат;

$c$  – число ковариат ( $c=5$ );

$\alpha$  - ( $c \times 1$ ) вектор регрессионных коэффициентов, показывающий эффект с ковариат;

$G_j$  - ( $n \times (m-1)$ ) матрица генотипов  $m-1$  локусов ( $m=76$ ), исключая *j*-ый локус;

$\beta$  - ( $m \times 1$ ) вектор регрессионных коэффициентов, показывающий эффект генотипов  $m-1$  локусов;

$g_j$  - ( $n \times 1$ ) вектор генотипов *j*-ого локуса,  $\gamma$  – эффект генотипов *j*-ого локуса;

$e$  - ( $n \times 1$ ) вектор случайных эффектов, обусловленных внешней средой.

Предполагается, что каждый анализируемый признак  $y_i$  распределен мультиномально с вектором математических ожиданий и ковариационной матрицей соответственно:

$$E(y_i) = X\alpha + G_j\beta + g_j\gamma$$

$$Cov(y_i) = \sigma^2 I$$

где

$I$  – единичная матрица (диагональные элементы равны 1, а недиагональные – 0) и  $\sigma^2$  – общая дисперсия признака.

Корреляционную связь между пятнадцатью анализируемыми признаками вычисляли параметрическим методом Пирсона. Для оценки достоверности отличия коэффициента корреляции от нуля вычисляли *p*-значения теста корреляции Пирсона. Для анализируемых показателей "пол", "популяционная принадлежность", "заводская линия" в силу их категориальных значений не оценивалось направление корреляционной связи.

Статистическую обработку данных осуществляли с помощью программы Microsoft Excel и специально разработанных программ в среде R (<http://www.R-project.org/>).

## Результаты и обсуждение

В настоящем исследовании выявленный ранее полиморфизм по AG- и GA-ISSR-фрагментам рассматривается как фактор влияния генетической структуры на продуктивные качества овец романовской породы. Для 268 животных романовской породы выполнен поиск возможных ассоциаций данных по генетическому полиморфизму с результатами бонитировок из баз данных исследуемых хозяйств.

Анализ был осуществлен с помощью построения модели наследования признака как регрессионной линейной модели и применения критерия Фишера. Достоверная взаимосвязь с генетическими маркерами была определена для 9 признаков продуктивности (табл. 2). Данные признаки представлены в основном показателями, характеризующими шубные качества романовских овец и плодовитость. Шесть признаков связаны с двумя и более ISSR-PCR маркерами. Например, с признаками "настриг шерсти" и "число мертворожденных ягнят" достоверно ассоциированы по пять ISSR-PCR маркеров (табл.2).

Для некоторых ISSR-PCR маркеров установлена связь с несколькими фенотипическими признаками. Так, например, для фрагмента A6 определена достоверная взаимосвязь с показателями воспроизводства (средняя плодовитость и наличие мертворожденных ягнят), для фрагмента G28 – с признаками шерстной продуктивности (настриг шерсти и соотношение ости и пуха (по количеству)), а фрагмент A12 достоверно ассоциирован наряду с признаками шерстной продуктивности (настриг шерсти и соотношение ости и пуха (по количеству)) с показателем "максимальное число ягнят", также как и G36 наряду с признаком "густота шерсти" связан с показателем воспроизводства "наличие мертворожденных ягнят". Объяснить данные факты можно, предположив существование плейотропного эффекта или ассоциаций генов, влияющих на фенотипическое проявление данных признаков. При плейотропном действии имеет место полная коррелятивная связь признаков между собой (Дубинин, 1986). В наших примерах мы наблюдаем данную связь только между признаками, связанными с фраг-

Таблица 1.

Достоверные ассоциации между признаками продуктивности романовских овец и генетическими локусами (значения  $p < 0.05$ )

Признак	ISSR-PCR маркеры ( $p$ -значения)
Настриг шерсти	A12 (0.0029), A29 (0.0156), A32 (0.0047), G12 (0.0177), G28 (0.0300)
Уравненность шерсти	A34 (0.0283?10-5), G29 (0.0397)
Густота шерсти	A34 (0.0073), A36 (0.0392), G36 (0.0034)
Соотношение ости и пуха (по количеству)	A12 (0.0264), G3 (0.0385), G8 (0.0319), G28 (0.0363)
Оброслость брюха	A23 (0.0214)
Комплексный класс	A24 (0.0225), A31 (0.0307)
Средняя плодовитость	A6 (0.0329)
Максимальное число ягнят	A12 (0.0462)
Наличие мертворожденных ягнят	A6 (0.0057), A21 (0.0049), A30 (0.0470), G27 (0.0292), G36 (0.0005)

\* Примечание. В скобках указаны вычисленные  $p$ -значения.

ментами A6 и G36. В случае, когда "ген одновременно вызывает и полезные и вредные для особи признаки, перед селекционерами, желающими использовать данный полезный признак и ликвидировать вредный, встают очень трудные задачи" (Дубинин, 1986). В нашей работе фрагмент G36 является подобным примером, но "полезный" признак (густота шерсти) и "вредный" признак (наличие мертворожденных ягнят) имеют слабую отрицательную корреляцию (см. табл. 3). Таким образом знание направления корреляционной связи, вероятно, облегчит селекционную работу по данному комплексу признаков, дав возможность в полной мере использовать "полезный" признак, одновременно уменьшая действие "вредного" признака.

Полученные данные являются результатом одного из первых этапов настоящего исследования генетической природы изменчивости хозяйственно-полезных признаков романовских овец. Следующим этапом работы является локализация в геноме ISSR-фрагментов, для которых была установлена достоверная ассоциация с признаками продуктивности, а также дальнейшие исследования по изучению природы влияния отдельных ISSR-фрагментов на хозяйственно-полезные признаки романовских овец. Полиморфизм ассоциированных генетических структур может маркировать изменчивость конкретных структурных генов, связанных напрямую с фенотипическим проявлением признака, или локусов, тесно сцепленных с ними. Таким образом, возможно выявление новых генов-кандидатов, а также в дальнейшем определение способности полиморфных вариантов ДНК в этих генах влиять на интересующий селекционеров фенотип.

В данной работе нами также была изучена взаимосвязь между 15 анализируемыми признаками романов-

ских овец с помощью параметрического метода Пирсона. Коэффициенты корреляции Пирсона  $r$  и вычисленные  $p$ -значения для теста корреляции Пирсона представлены в табл. 3. Наглядно взаимосвязь признаков представлена на рис. 1 в виде теплокарты, где степень насыщенности цвета соответствует степени сопряженности.

Для всех 15 признаков романовских овец отмечены достоверные ( $p < 0.05$ ) корреляции разной направленности и степени с одним или несколькими анализируемыми признаками. Большинство выявленных взаимосвязей подтвердили ранее известные селекционерам зависимости, например положительная корреляция живой массы с большинством хозяйственно-полезных признаков (Арсеньев, Арсеньева, 1976; Ерохин и др., 2005; Москаленко, Филинская, 2014) или положительные корреляции между показателями шубной продуктивности (настриг шерсти, густота шерсти, уравненность шерсти, соотношение ости и пуха (по количеству), соотношение ости и пуха (по длине)), а также между показателями воспроизводства (средняя плодовитость, максимальное число ягнят, наличие мертворожденных ягнят).

На признаки "настриг шерсти" (0.616) и "живая масса" (0.481) овец значительно влияет пол. Данный факт является закономерным с учетом биологии (полового диморфизма) вида *Ovis aries*. Связь признака принадлежности к популяции/хозяйству с живой массой и густотой шерсти можно предопределить как паратипический фактор (влияние внешних условий в хозяйстве) на продуктивные качества овец.

Знание направления и степени корреляции между признаками поможет решать вопросы о методах отбора и подбора родительских пар при селекции по комплексу признаков.

Таблица 3.

Корреляционные коэффициенты Пирсона между признаками (над диагональю) и их р-значения (под диагональю)

Признак	Пол	Популяция	Заводская линия	Тип рождения	Комплексный класс	Живая масса	Настриг шерсти	Уравненность шерсти	Густота шерсти	Соотношение ости и пуха (по оличеству)	Оброслость брюха	Соотношение ости и пуха (по длине)	Средняя плодовитость	Максимальное число ягнят	Наличие м/р ягнят
	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.	10.	11.	12.	13.	14.	15.
1.		0.103	0.116	0.033	0.184	0.481	0.616	0.185	0.130	0.072	0.044	0.129	0.000	0.000	0.000
2.	0.094		0.068	0.070	0.060	0.292	0.112	0.143	0.236	0.055	0.017	0.024	0.084	0.067	0.126
3.	0.058	0.268		0.047	0.097	0.013	0.113	0.027	0.137	0.014	0.060	0.052	0.051	0.047	0.035
4.	0.591	0.256	0.448		0.107	-0.022	-0.039	-0.009	-0.178	-0.020	-0.106	-0.003	0.003	0.007	0.092
5.	0.002	0.328	0.114	0.081		0.053	0.138	0.192	-0.004	0.111	0.141	0.089	-0.121	-0.052	-0.032
6.	0.000	0.000	0.838	0.724	0.390		0.600	0.032	0.223	-0.007	0.044	0.025	0.080	0.088	0.026
7.	0.000	0.067	0.066	0.526	0.023	0.000		0.226	0.292	0.093	0.055	0.066	-0.020	0.001	0.005
8.	0.002	0.019	0.658	0.887	0.002	0.603	0.000		-0.078	0.329	-0.051	0.152	0.039	-0.051	0.055
9.	0.033	0.000	0.025	0.003	0.946	0.000	0.000	0.204		-0.043	0.048	-0.013	-0.066	-0.138	-0.238
10.	0.237	0.366	0.823	0.748	0.069	0.907	0.128	0.000	0.479		-0.044	0.253	-0.050	-0.085	0.059
11.	0.472	0.776	0.327	0.083	0.021	0.472	0.366	0.406	0.437	0.473		0.063	-0.010	-0.037	-0.053
12.	0.035	0.701	0.392	0.960	0.147	0.682	0.282	0.013	0.828	0.000	0.302		-0.067	-0.127	-0.133
13.	1.000	0.172	0.406	0.956	0.047	0.194	0.740	0.530	0.284	0.414	0.870	0.273		0.675	0.269
14.	1.000	0.271	0.440	0.907	0.399	0.152	0.981	0.401	0.024	0.165	0.549	0.038	0.000		0.326
15.	1.000	0.039	0.570	0.132	0.606	0.669	0.932	0.370	0.000	0.335	0.386	0.029	0.000	0.000	

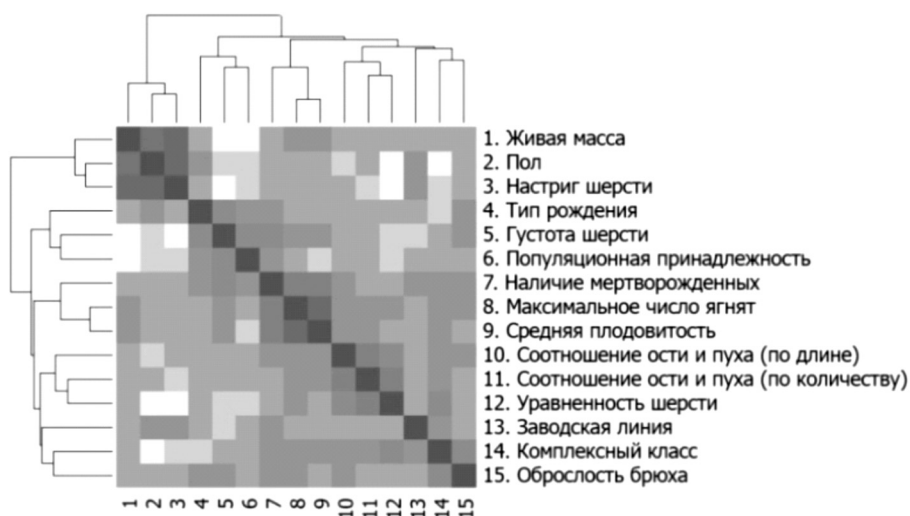


Рисунок 1. Корреляционные связи между признаками романовских овец.

## ВЫВОДЫ

В данной работе на основании результатов анализа ассоциаций впервые установлено влияние генетической структуры, представленной ISSR–PCR маркерами, на изменчивость фенотипических признаков романовских овец. Достоверная взаимосвязь с одним или более ISSR–PCR маркерами была определена для 9 признаков продуктивности. Дальнейшие исследования по ISSR–фрагментам, ассоциированным с фенотипическим проявлением признаков романовских овец, может способствовать выявлению и уточнению вклада потенциальных генов–кандидатов в изменчивость количественных признаков овец.

С помощью корреляционных коэффициентов Пирсона были выявлены достоверные взаимосвязи между анализируемыми фенотипическими признаками. Большинство выявленных взаимосвязей подтвердили ранее известные селекционерам зависимости, а также влияние таких факторов как пол, популяционная принадлежность и заводская линия на селекционируемые хозяйственно–полезные признаки.

Полученные данные можно использовать на практике для оптимизации различных селекционных задач, и предлагается использовать для повышения эффективности селекционно–племенной работы при разведении автохтонных пород domestцированных видов животных.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Абонеев В.В., Чижова Л.Н., Геращенко Л.В. Биологическая разнокачественность молодняка овец разных пород и ее связь с энергией и составом прироста живой массы // Овцы, козы, шерстяное дело. 2006. № 4. С. 71–74.
2. Арсеньев Д.Д., Арсеньева Т.В. Особенности разведения романовских овец. М.: Россельхозиздат, 1976. 79 с.
3. Арсеньев Д.Д. Пути совершенствования породных и продуктивных качеств романовских овец // Сборник научных трудов "Интенсивные технологии производства продуктов животноводства". Москва, 1989. С. 12–19.
4. Глазко В.И., Глазко Г.В. Введение в ДНК–технологии и биоинформатику. К.: Норадрук, 2001. С. 436.
5. Глазко В.И., Юлдашбаев Ю.А., Кушнир А.В., Салаев Б.К., Арилов А.Н. Традиционная и метаболомическая селекция овец: Монография. – М.: КУРС: ИНФРА–М, 2014. 560 с.
6. Дубинин Н.П. Общая генетика. М.: Наука, 1986. 559 с.
7. Ежегодник по племенной работе в овцеводстве и козоводстве в хозяйствах Российской Федерации (2013) М.: Изд–во ВНИИплем, 2014.
8. Ерохин А.И. Значение соотносительной изменчивости признаков в селекции овец // Материалы межвузовской научно–методической конференции "Селекционные и технологические основы повышения продуктивности сельскохозяйственных животных". Ярославль, 2000. С. 7–13.
9. Ерохин А.И., Ерохин С.А. Овцеводство. М.: Изд–во МГУП, 2004. 480 с.
10. Ерохин А.И., Карасев Е.А., Ерохин С.А. Романовская порода овец: состояние, совершенствование, использование генофонда. М.: ФГБУ "Росинформагротех", 2005. 329 с.
11. Канева Л.А., Жариков Я.А., Матюков В.С. Мясо–шерстное овцеводство на севере. Сыктывкар – Усть–Цильма, 2013. 378 с.
12. Макарова Н.Н., Нестерук Л.В., Столповский Ю.А., Москаленко Л.П., Николаева Е.А. Перспективы использования мультилокусных маркеров ДНК при сохранении и разведении романовской породы овец // Вестник АПК Верхневолжья. 2013. № 2 (22). С. 75–80.
13. Марзанов Н.С., Насибов М.Г., Девришов Д.А. и др. Использование генетических маркеров в разведении овец: учеб. пособие. М.: ФГБНУ "Росинформагротех", 2012. 116 с.
14. Москаленко Л.П., Филинская О.В., Костылев М.Н. Мониторинг состояния романовского овцеводства // Вестник АПК Верхневолжья. 2014. № 2 (26). С. 28–34.
15. Москаленко Л.П., Филинская О.В. Селекционно–генетические параметры хозяйственно–полезных признаков романовских овец разных генеалогических групп // Овцы, козы, шерстяное дело. 2014. № 2. С. 16–18.
16. Столповский Ю.А., Лапшин А.В., Кол Н.В., Сулимова Г.Е., Глазко В.И. Полиморфизм молекулярно–генетических маркеров у овец романовской породы // Известия ТСХА. 2008. № 2. С. 125–134.
17. Фураева Н.С., Хрусталева В.И., Соколова С.И., Григорян Л.Н., Марзанов Н.С. Состояние и перспективы романовского овцеводства в России // Овцы, козы, шерстяное дело. 2015. № 1. С. 6–9.
18. Эрнст Л.К., Зиновьева Н.А. Биологические проблемы животноводства и XXI веке. М.: РАСХН, 2008, 508 с.
19. Юдин Н.С., Воевода М.И. Молекулярно–генетические маркеры экономически важных признаков у молочного скота // Генетика. 2015. Т. 51. № 5. С. 600–612. DOI: 10.7868/S0016675815050082
20. International Sheep Genomics Consortium. <http://www.sheepmap.org/>
21. Jiang Y., Xie M., Chen W., Talbot R. et al. The sheep genome illuminates biology of the rumen and lipid metabolism. Science. 2014;344(6188):1168–1173. DOI: 10.1126/science.1252806
22. R Core Team (2015) R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, URL <http://www.R-project.org/>