

## КОМПАРАТИВНА ВАРИЈАБИЛНОСТ НА МИКРОСАТЕЛИТСКА DNA КАЈ ИЗВОРЕН И ИЗВОРНО СЕЛЕКТИРАН СОЈ НА ШАРПЛАНИНСКИОТ ОВЧАРСКИ ПЕС

Есмеров Игор<sup>1</sup>, Панов Сашо<sup>2</sup>, Стојковски Велимир<sup>1</sup>, Славковска Адријана<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Каџедра за биохемија, Факултет за ветеринарна медицина - Скопје

<sup>2</sup>Каџедра за молекуларна биологија, Природно математички факултет - Скопје,

<sup>3</sup>Министерство за земјоделство, шумарство и водостопанство, Р. Македонија

e-mail: esmerov@fvm.ukim.edu.mk

### АБСТРАКТ

DNA микросателитите претставуваа кодоминантен генетски маркер кој наоѓа широка примена во карактеризирањето на биодиверзитетот на одредени популации.

Генетската варијабилност на популацијата на шарпланинците беше одредена преку анализа на 10 DNA микросателитски локуси (FH2361, DGN10, FH3287, FH3924, FH3608, FH3023, FH3489, FH3721, FH4027 и FH2141).

Во студијата беа вклучени 37 изворни примероци на шарпланинското овчарско куче (19 низински шарпланински и 18 планински).

Информативноста на DNA микросателитски локуси беше одредена според (Polymorphism Informative Content-PIC), како и според бројот на детектирани алели по локус. Сите десет DNA микросателитски локуси беа високо полиморфни.

Во генотипот на шарпланинецот највисока вредност за PIC (Polymorphism Informative Content) беше детерминирана кај локус FH3023 (0.975), а најниска за локусот FH3924 (0.812).

Бројот на детектирани алели по локус кај шарпланинецот варираше од 16 кај локусот FH2361, па до 33 кај локусите FH3023 и FH3489.

Интрапопулационата генетска варијабилност беше утврдена преку бројот на детектирани алели за секој DNA микросателитски локус, просечниот број на алели за сите осум DNA микросателитски маркери и вкупниот број на детектирани алели, карактеристични за дадената популација.

Кај популациите на шарпланински бројот на заеднички алели беше највисок во локусот FH2141 и изнесуваше 49, од кои 35 хетерозиготни и 14 хомозиготни.

Според добиените резултати од оваа студија може да се заклучи дека постои релативно ниска генетска варијабилност во однос на испитуваните параметри кај популација на шарпланински. Ова сознание, согласно сличните студии на поголем број автори имплицира дека шарпланинецот е релативно чиста раса која при одгледувањето не е премногу вкрстувана со други раси на кучиња, кои се фенотипски слични, со цел подобрување на некои карактеристики на расата.

**Клучни зборови:** куче, DNA микросателити, генетска варијабилност

### ВОВЕД

Првите контакти помеѓу човекот и кучето датират уште од пред 15.000 години, времето на раниот неолит, од кој што период постојат

: значајни археолошки податоци во форма на скици, цртежи, скулптури. Имено, најраните артефакти потекнуваат уште од времето на палеолитот, но тие сознанија се ограничени само на одредени каниди, како волкот или

чакалот, но сеуште не упатуваат на постоењето на кучето. Сепак најрано откриените кучешки коски датираат од 6.600 година пред нашата ера, а се пронајдени на планината Јарно, сегашната граница помеѓу Ирак и Иран, додека пак првите различни краниални и мандибуларни облици на кучешки коски датираат од 5.400-4.600 година пред нашата ера, а се откриени во коритото на реката Данубе, денешна Романија.(1)

Сите досегашни сознанија како од социолошко-културолошки, така и од научен аспект укажуваат дека корените на зближувањето помеѓу човекот и кучето треба да се бараат во постојаното менување на начинот на живот, преминувањето на човекот во интелегентно суштество, потребата од зголемување на моќта, менувањето на начинот на исхрана, потрагата по нови извори на храна и изнаоѓање на начини за полесно совладување на егзистенцијалните проблеми. Сублимирањето на овие состојби во кој се наоѓале предците на денешниот човек би можеле да се сведат на обична еволуција на две суштества кои иладници години живееле едно покрај друго, а зближувањето и domestикацијата станала неизбежна.

Повеќе од 150 раси се идентификувани само од American Kenel Club, кој ги класифицирал во седум групи, претежно врз база на способностите со кои се одликуваат, историскиот развој и морфологијата.

Кучињата имаат 38 пара на автозомни хромозоми и два полови, во споредба со човечките 23, а нивниот геном содржи околу 0.5 Gbp повеќе DNA отколку хуманиот (International Human Genome Sequencing Consortium). Разликата во основа може да се објасни со постоењето на некоку повторувачки сегменти во геномот, а некои се добиени со делеции на секвенците кои биле присутни кај предците на кучето, а одсуствувале кај човековите предци. Компарацијата на различните раси на кучиња покажуваат дека постои разлика од 1 SNP на 1000 базни пара, слично како и кај човечката популација(2)

Шарпланинецот претставува автохтона раса на овие простори, а негово изворно живеалиште претставуваат Шарпланинскиот предел, надморска височина од над 1000 метри, додека во зимскиот период се спушта во потоплите низински предели, како следбеник на големите овчи стада (слика 1). Негова основна употребна вредност пред сè

се однесува на обезбедувањето и заштитата на стадата овци од различните предатори, волци, рисови, лисици.



Слика 1. Шарпланински овчарски пес  
(*Canis lupus domesticus*)

Според некои податоци шарпланинска раса потекнува од пред 1600-2000 години и се смета за најстара раса на овие простори. За прв пат расата е опичана во FCI (Federation Cynologique Internationale) во 1939 година под името Илирски овчарски пес. Во 1957 е регистриран и во Југословенскиот кинолошки сојуз под името Југословенски овчарски пес - "Шарпланинец". Според Меѓународната кинолошка федерација (FCI), две земји се сметаат како место на потекло на ова куче, Македонија и Србија. Предците на шарпланинецот сè се уште контраверзни, односно некои сметат дека тој потекнува од Тибетанскиот мастиф, некои римски раси на кучиња и некои раси кои потекнуваат од турските степи. Како нејверодостојна се смета теоријата дека потекнуваат од некои азиски борбени раси на кучиња(3)

Анализите на митохондријалната DNA (mtDNA) сугерираат дека domestификацијата асоцира на генетски блок во кој учествуваат само неколку предци во генетскиот пул. Како и да е, големиот генетски диверзитет меѓу кучињата дава можност на оваа хипотеза, како и за другите раси на животни (2). Ова имплицира дека доколку настане вкрстување на одредени домашни животни со нивните живи предци може да дојде до повторна појава на одредени особини кои биле присутни и пред domestификацијата. Но сепак со истражувањата на митохондријалната DNA може да се дојде само до одредени сознанија бидејќи таа се наследува само од мајката.(4)

Постојат два типа на SSLP (Simple sequence length polymorphisms-SSLPs), минисателити и микросателити:

- а) Минисателити, исто така познати како варијабилен број на тандемски повторувања (variable number of tandem repeats VNTRs), каде повторувачките единици достигнуваат до 25bp.
- б) Микросателити, или едноставни тандемски повторувања short tandem repeats-STRs) се кратки секвенци на DNA, со големина од 1-6 bp кои се повторуваат повеќе пати едно по друго и се карактеризираат со висока информативност.

## МАТЕРИЈАЛИ И МЕТОДИ

Во студијата беа вклучени вкупно 37 шарпланинци и тоа 18 претставници на Низинскиот тип на шарпланинци и 19 претставници на Планинскиот тип шарпланинци.

Изолација на DNA од леукоцитните клетки со протеиназа К.

Изолацијата на DNA беше направена со фенол/хлороформ екстракција и преципитација со етил алкохол.

Концентрацијата на изолираната DNA беше одредена спектофотометриски на 260nm бранова должина. Во 980µl дејонизирана H<sub>2</sub>O беа додадени 20µl на растворена DNA. По хомогенизацијата на примерокот, истиот беше спектрофотометриран на 260nm бранова должина на која молекулата на DNA покажува оптичка активност. Остатокот на протеини како резултат на недоволното прочистување на DNA, во текот на изолацијата, беше одреден со спектрофотометрирање на 280nm бранова должина.

Вкупната количина на изолираната DNA беше одредена според следнава формула :

OD260 x 50 фактор и разредување x 40 =µg DNA/ml.

Прочистеноста на DNA беше одредувана преку односот и вредноста од спектрофотометрирањето на 260nm и 280nm. Доколку односот е 1.8 се смета дека изолираната DNA има добар квалитет.

Интактноста на добиената DNA е одредувана со електрофореза на 1% агарозен гел во 1xTBE раствор (90mM Tris, 90mM Борна киселина, 8mM EDTA, pH=8.3).

DNA микросателитските локуси беа амплифицирани со користење на полимераза верижна реакција (PCR-Polymerasis chain reaction) (5).

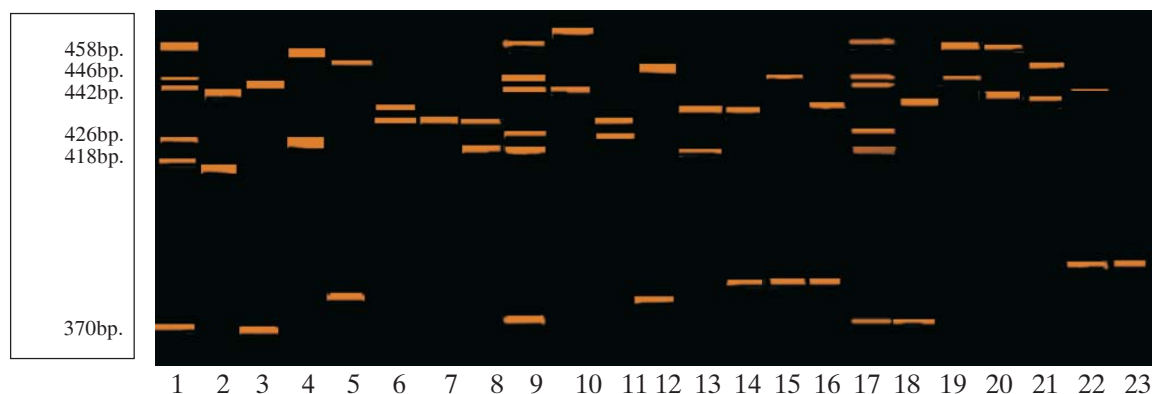
За амплификација на микросателитските локуси е користен Perkin-Elmer GeneAmp PCR System 2400.

Смеса за амплифицирање на автозомните микросателитски локуси беше правен во епендорфи од 200µl.

За амплификација на микросателитските локуси е користен следниов програм за PCR: почетна денатурација на 94 C°/ 10 минути, денатурација на 94 C°/ 1 минута, анилирање на прајмерите на 56 C°/ 1 минута, екстензија на 72 C°/ 1 минута, крајна екстензија на 72 C°/ 8 минути.

PCR реакцијата содржеше:

-H <sub>2</sub> O	14.0µl
-10xRb pufer	2.5µl
-2.5mmol MgCL2	1.5µl
-2.5mmol dNTP	1.0µl
-0.5U Ampli Taq Gold	0.3µl
-2.0 p.mol primer R/F	1.0µl
-DNA	4µl
-финалниот волумен на реакцијата	23.3µl



Слика 2. Денатуирачка полиакриламидна гел електрофореза од PCR амплификации на локусот FN3287

Големините на секвенците се отчитаа на нативна *DNA* електрофореза во полиакриламиден гел (*DNA-PAGE*).

Добиените параметри за алелната големина и генотипот за секоја индивидуа беа статистички обработени со програмот CERVUS (6), односно детерминирани алелната фреквенца, просечниот број на алели по локус, алелната големина и вредноста на Polymorphism Informativ Content (PIC) (7).

Големина на алелите на локусот 3287, генотипизирани со (*DNA-PAGE*). Од лево кон десно: Marker; SD1=418/442bp.; SD2=370/446bp.; SD3=426/454bp.; SD4=378/450bp.; SD5=430/434bp.; SD6=430bp.; SD7=422/430bp.; Marker; SD8=442/462bp.; SD9=426/430bp.; SD10=378/450bp.; SD11=418/434bp.; SD12=382/434bp.; SD13=382/446bp.; SD14=382/434bp.; Marker; SD15=370/434bp.; SD16=446/458bp.; SD17=434/458bp.; SD18=434/444bp.; SD19=386/434bp. (слика 2)

## РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА

Според резултатите од моите истражувања не произлегуваат сознанија за специфични алели кои се детектираат кај шарпланинците, а не се присутни кај останатите четири раси на кучиња.

Диференцијацијата на геномите на шарпланинецот, Collie, Boykin Spaniel, German Shepherd и Shetland Sheepdog може да се согледа и преку различната дистрибуција на карактеристичните или сопствени алели во геномот на шесте популации. При тоа за различните *DNA* микросателитски региони се детерминираат различен број на сопствени алели.

Сепак, (8) наведуваат дека доколку алелната фреквенца на уникатните приватни алели е помала од 0.1%, постои можност тие алели да се присутни во неколку популации, па доколку се скринираат поголем број на индивидуи, би се отфрлило тврдењето дека специфичните или приватни алели се карактеристични само за одредена популација.

Истражувањата се одвиваа со цел да се утврдат генетските варијации помеѓу популацијата на изворниот шарпланинец и изворно селектираниот шарпланинец со што би се дошло до одредени сознанија за степенот на хетерозиготност и алелната фреквенца.

Бројот на алелите кој *DNA* микросателитскиот локус ги поседува, ја покажува неговата полиморфност, односно неговата информативност. Според ФАО критериумите, *DNA* микросателитските локуси кои се употребуваат во ваков тип на студии треба да поседуваат најмалку 4 алели.

Од добиените резултати може да се забележи дека разликите помеѓу изворниот и изворно селектираниот сој на шарпланинецот се занемарливи, односно се сведуваат на неколку карактеристични алели за соодветната популација, кои можеби биле пронајдени и кај изворно селектираниот сој, доколку би се испитувал поголем број на индивидуи, пред се од областа на Косово и Метохија, каде што според сознанијата се уште постојат неколку линии на изворни шарпланинци. Забележителни се одредени фенотипски разлики, кои пред се се однесуваат на помасивното тело на изворно селектираниот сој на шарпланинците, должината на влакната и големината на краниумот, што асоцира на внесување на екстериерни особини од фенотипски сличните раси, како на пример Руска стража, Турски Карабаш и Бернандинец. Сепак, овие тврдења треба дополнително да се испитаат, бидејќи во оваа студија не беа внесени наведените раси на кучиња. Малите разлики во алелната фреквенца, обсервираната и очекуваната хетерозиготност не наведуваат на размислувања кои одат во правец на мали интервенции во изворните линии на шарпланинецот, со цел да се подобрат екстериерните особини на расата, поради барањата на пазарот. Сепак интервенцијата со внесување на линии од други раси во изворниот тип на шарпланинецот, како и менувањето на животната средина во подолг временски период, би резултирало со губење на одредени фенотипски карактеристики, карактеристични за изворните шарпланински кучиња.

Кај примероците SD127/1, SD128/2, SD96/3, SD114/4, SD126/5, SD20/6, SD109/7 (воени кучиња), за забележува мал број на карактеристични алели на сите локуси, што асоцира на можноста да примероците потекнуваат од две линии, односно да се парени во блиско крвно сродство, што би резултирало со мал број на позитивни мутации и губење на одредени карактеристики кај овие примероци.



Во студијата беше внесен и еден редок примерок на изворен бел шарпланинец. Бројот на карактеристичните алели во геномот на овие шарпланинци може да се смета за реален, бидејќи не биле предмет на облагодорување со други раси. Сепак, големината на популацијата може да се јави како фактор кој би го условил и со тоа би го ограничил бројот на алелите кои се карактеристични за белите изворни шарпланинци. Одредени алели беа детектирани само кај белиот изворен шарпланинец, што укажува на тоа дека се работи за карактеристични алели за популацијата. При тоа се добиени определени сознанија за постоење на карактеристични алели за одредени индивидуи во популацијата на изворните бели шарпланинци во два локуса (DGN 10 и FH3023, примерок SD9 со големина на алели од 370/402 и 338/350). Овие примероци внатре во изворната популација на шарпланинци се многу ретки, па упатно би било доколку се најдат во иднина вакви примероци да се подложат на испитувања на истите локуси, како би добиле посигнификантни резултати.

Диференцијацијата на геномите кај изворниот и изворно селектираниот шарпланинец се согледува и преку различната дистрибуција на карактеристичните алели во геномот на двете популации. При тоа за различни DNA микросателитски маркери се детерминирани различен број на карактеристични алели.

PIC (Polymorphic Informtion Content) е важен показател за полиморфизмот на микросателитската DNA, кој ја опушува информативноста на генетските маркери во популациските студии. Големината на PIC го индицира степенот на полиморфизмот. Под висока полиморфност се подразбира кога големината на  $PIC > 0.5$ , нормална полиморфност кога  $PIC < 0.5$  и ниска полиморфност кога  $PIC < 0.25$ . Според горенаведените добиени резултати можеме да кажеме дека сите десет маркери кај изворниот и изворно селектираниот тип на шарпланинецот се високо полиморфни, а нивната полиморфност се движи од 0.829-0.965.

Хетерозиготноста, мерка за генетскиот диверзитет ја рефлектира генетската варијанса на популацијата, при што во оваа студија не се забележува сигнификантна генетска диференцијација помеѓу популацијата на изворниот и изворно селектираниот шарпланинец.

Информациите кои се добиени од оваа студија, а кои се базираат пред се на големините на добиените алели, обсервираната и очекуваната хетерозиготност, вредностите на полиморфизмот на десетте маркери, како и карактеристичните алели за популацијата ни укажуваат дека не постојат одредени карактеристични алели по што на молекуларно ниво би се издвоил изворниот од изворно селектираниот тип на шарпланинецот.

Обсервираната хетерозиготност кај други 28 раси на кучиња, истражувани со 100 микросателитски маркери е различна од веќе детектираната кај Шарпланинското куче и изнесува кај Pembroke Welsh corgi 0.630, Belgian tervuren 0.650, Border collie 0.669, Australian shepherd 0.696 (овчарски раси), Borzoi 0.605, Norwegian elkhound 0.623, Rhodesian ridgeback 0.647, Greyhound 0.648 (ловни раси), Bulldog 0.581, Keeshond 0.650, Chow chow 0.666, American Eskimo dog 0.686 (неспортски раси), Weimaraner 0.614, Kabrador retriever 0.657, Golden Retriever 0.657, Brittany spaniel 0.666 (спортски раси), Bull terrier 0.387, Miniature bull terrier 0.474, Airedale terrier 0.515, Jack Russel terrier 0.758 (териери), Pug 0.566, Yorkshire terrier 0.684, Papillon 0.698, Pomeranian 0.750, Boxer 0.474, Doberman pincher 0.527, Bernese mountain dog 0.543, Akita 0.642 (работни раси). Популацијата која била истражувана броела 28-45 единки. Вкупната хетерозиготност на расите изнесува 0.618, односно се движела во границите 0.387-0.758 (9).

Во истражувањето на други 11 раси на Источно Азиски кучиња Sapsaree, Jindo, HAD, Kishy, Hokkaido, Akita, Shiba, Shih Tzu, Sakhalin, Eskimo, Taiwan и Average, обсервираната хетерозиготност изнесувала 0.310-0.718, со средна вредност од 0.580 (10).

## ЗАКЛУЧОЦИ

1. Добиените вредности, како и вредности за секој поединечно за пареметарот PIC како и за бројот на детектирани алели во геномот на анализираните популации укажуваат дека DNA микросателитските локуси кои беа применети во оваа студија ги задоволуваат критериумите кои треба да ги исполнуваат микросателитските маркери при употреба во популациски студии при детекција на алелната фреквенца и генетскиот диверзитет. DNA

- 
- микросателитските локуси кои беа одбра-  
ни за истражување на Шарпланинската раса  
се високоинформативни, што се потврдува  
преку бројот на детектирани алели по  
локус и вредностите на Polymorphic  
information content (PIC) по локус.
2. Големината на популацијата како и бројот  
на испитувани DNA микросателитски  
маркери го условува бројот на алели кои  
се карактеристични за геномите на  
анализираните популации. Сепак, според-  
бата на алелите помеѓу планинскиот и  
низинскиот шарпланинец со останатите  
четири раси на кучиња укажуваат на  
специфични алели во девет од десетте  
испитувани локуси.
  3. Врз база на вредностите за генетската  
дистанца, генетскиот идентитет, алелната  
фреквенца, очекуваната и обсервираната  
хетерозиготност, како и PIC-от на сите  
испитувани локуси можеме да дојдеме до  
заклучок дека степенот на дивергентност  
на шарпланинецот може да биде  
квантифициран со анализа на DNA ниво,  
преку користење на прајмери кои се  
употребени во истражувањето на други  
раси. Сепак неминовна е потребата од  
воведување на матична евиденција со  
строго специфични високо информативни  
DNA региони, со што би се спровела  
матична евиденција на изворните претста-  
вници на расата, но и истовремено би се  
спречило размножувањето во блиско  
крвно сродство, како и размножувањето со  
раси со сличен генотип.
  4. Степенот на обсервираната и очекуваната  
хетерозиготност се приближно слични кај  
низинскиот и планинскиот шарпланинец.
  5. Според добиените резултати од оваа студија  
може да се заклучи дека постои релативно  
ниска генетска варијабилност во однос на  
испитуваните параметри кај популација на  
шарпланински. Ова сознание, согласно  
сличните студии на поголем број автори  
имплицира дека шарпланинецот е  
релативно чиста раса која при одгледу-  
вањето не е премногу вкрстувана со други  
раси на кучиња, кои се фенотипски слични,  
со цел подобрување на некои каракте-  
ристики на расата.

## COMPARATIVE ANALYSIS OF MICROSATELLITE DNA IN WELL SARHPLANINIAN SHEPHERD AND WELL SELECTED SARHPLANINIAN SHEPHERD

Esmerov Igor<sup>1</sup>, Panov Sasho<sup>2</sup>, Stojkovski Velimir<sup>1</sup>, Slavkovska Adrijana<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Department of Biochemistry, Faculty of Veterinary Medicine - Skopje

<sup>2</sup>Department of Molecular Biology, Faculty of Natural Sciences - Skopje

<sup>3</sup>Ministry of Agriculture, forestry and water economy, R.Macedonia

e-mail: esmerov@fvm.ukim.edu.mk

### ABSTRACT

DNA Microsatellites are codominant genetic markers and they are widely used in the characterization of biodiversity.

Genetic variability of sarplaninian shepherds populations was determinate on the basis of analyses of ten DNA microsatellites loci (FH2361, DGN10, FH3287, FH3924, FH3608, FH3023, FH3489, FH3721, FH4027 and FH2141).

In this study we have included 37 representative individuals from sarplaninian shepherd (19 lowland sarplaninians and 18 mountain sarplaninians).

Informativnes of DNA microsatellites loci was determinate with parameter (Polymorphism Informative Content-PIC), and according to the determinate number of alleles for each locus. All ten DNA microsatellite loci were highly polymorphic.

In the genome of sarplaninian shepherd loci FH2141 showed highest PIC value (0.975), and the loci with lowest PIC value was FH3924 locus (0.812).

Number of detected alleles for each locus in the genome of sarplaninian shepherd varies from 16 (FH2361) to 33 (FH3023 and FH3489).

Intrapopulation genetic variability was determinate according to the number alleles for each locus separately in each population, mean number of alleles for all eight loci and with number of the characteristic alleles.

The most common alleles in populations of sarplaninian shepherds were detected in FH2141 loci, 49 (35 heterozygous and 14 homozygous).

Taking in consideration the research results from this study a conclusion can be drawn that the genetic variability in Sarplaninian shepherd population is very low. This conclusion and similar stand points in the studies from a significant number of other authors, implicates that the Sarplaninian shepherd is relatively pure breed rarely interbred with phonotypic similar dogs in order to improve the characteristics of the breed.

**Kew words:** dog, , DNA microsatellite, genetic variability.

### ЛИТЕРАТУРА

- Wayne R.K., 1993. Molecular evolution of the dog family. Trends Genetics, 9, 218-224.
- Lindblad K. T., Wade M. K., Mikkelsen T. S., 2005, Genome sequence, comparative analysis and haplotype structure of the domestic dog. Nature, 438/8, 803-819.
- Dimitrievic V., Jovanovic S, Savic M, Trailovic R., 2005. Genetic polymorphism of blood proteins in yugoslav shepherd dog. Acta Veterinaria (Beograd), 55, 5-6, 357-365.
- Gotherstrom A., 2005. Cattle domestication in the NearEast was followed by hybridization with auroch bulls in Europe. Proceedings of the Ryal Society, 272, 2337-2344.
- Mullis Kary B., 1993. Polymerase chain reaction (PCR) method. The Nobel Prize in Chemistry.
- Marshall T.C, 1988. Cervus 1.0 Edinburgh, University of Edinburgh press.
- Irion D. N., Schaffer A. L., Famula T. R., Eggleston M. L., Hughes S. S., and Pedersen N. C., 2003. Analysis of Genetic Variation in 28 Dog Breed Populations With 100 Microsatellite Markers J Hered 94: 81-87

- 
8. Botstein D., White R., Skolnick M., Davis R. W., 1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *American Journal of Human Genetics* 32, 314-331.
9. Griagaliunaite I., Tapio M., Viinalass H., Grislis Z., Kantanen J., Miceikiane I., 2003. Microsatellite variation in the baltic sheep breeds. *Veterinarija*, 21, 43-44.
10. Kim K. S., Tanabe Y., Park C. K., and Ha J. H. Genetic Variability in East Asian Dogs Using Microsatellite Loci Analysis, 2001. *The Journal of Heredity* 92:398-403