

## ГЕНЕТИЧНИЙ АНАЛІЗ УКРАЇНСЬКОЇ ПОПУЛЯЦІЇ СОБАК ПОРОДИ НІМЕЦЬКИЙ ДОГ З ВИКОРИСТАННЯМ МІКРОСАТЕЛІТНИХ ДНК-МАРКЕРІВ

С. Г. КРУГЛИК<sup>1</sup>, В. В. ДЗИЦЮК<sup>2</sup>, В. Г. СПИРИДОНОВ<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Українська лабораторія якості та безпеки продукції АПК (Чабани, Україна)

<sup>2</sup>Інститут розведення і генетики тварин НААН (Чубинське, Україна)  
dzitsiuk@yandex.ua

Досліджено рівень генетичного поліморфізму п'яти мікросателітних локусів у собак породи німецький дог (*Deutsche Dogge*), що розводяться в Україні. Виявлено у дослідженій вибірці тварин рідкісні алелі, суттєві значення показників поліморфності кожного локусу та комбінованої вірогідності. Виключення випадкового збігу алелів на рівні 99,8 % надають можливість щодо використання отриманої популяційно-генетичної інформації для підтвердження походження, індивідуальної ідентифікації і породної паспортизації собак.

**Ключові слова:** собаки породи німецький дог, мікросателіти, ДНК-маркери, поліморфізм, гетерозиготність, гомозиготність

### GENETIC ANALYSIS UKRAINIAN POPULATION OF GERMAN DOG BREED DOGS USING MICROSATELLITE DNA MARKERS

S. G. Kruglyk<sup>1</sup>, V. V. Dzitsiuk<sup>2</sup>, V. G. Spirydonov<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Ukrainian Laboratory of Quality and Safety of Agricultural Products (Chabany, Ukraine)

<sup>2</sup>The Institute of Animals Breeding and Genetics. (Chubynske, Ukraine)

The level of genetic polymorphism of five microsatellite loci in a German dog breed dogs (*Deutsche Dogge*), raised in Ukraine. Identified in the surveyed sample of animals rare alleles, significant values of polymorphism of each locus and the combined probability of exclusion coincidence alleles at the level of 99.8% in relation to enable the exploitation of population-genetic information to confirm the origin of individual identification and certification of breeding dogs.

**Key words:** dog breed German dog, microsatellite DNA markers, polymorphism, heterozygosity, homozygosity

### ГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ УКРАИНСКОЙ ПОПУЛЯЦИИ СОБАК ПОРОДЫ НЕМЕЦЬКИЙ ДОГ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МИКРСАТЕЛІТНИХ ДНК-МАРКЕРОВ

С. Г. Круглик<sup>1</sup>, В. В. Дзицюк<sup>2</sup>, В. Г. Спиридонов<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Украинская лаборатория качества и безопасности продукции АПК (Чабаны, Украина)

<sup>2</sup>Институт разведения и генетики животных НААН (Чубинское, Украина)

Исследован уровень генетического полиморфизма пяти микросателлитных локусов у собак породы немецкий дог (*Deutsche Dogge*), разводимых в Украине. Выявленные в исследуемой выборке животных редкие аллеля, существенные значения показателей полиморфности каждого локуса и комбинированной вероятности. Исключения случайного совпадения аллелей на уровне 99,8 % предоставляют возможность использования полученной популяционно-генетической информации для подтверждения происхождения, индивидуальной идентификации и породной паспортизации собак.

**Ключевые слова:** собаки породы немецкий дог, микросателлиты, ДНК-маркеры, полиморфизм, гетерозиготность, гомозиготность

**Вступ.** Домашня собака *Canis familiaris* є традиційним об'єктом біологічних досліджень, морфологія і фізіологія яких добре вивчені [1]. Однак, з генетичної точки зору, собаки і нині є одним з найменш вивчених об'єктів у нашій країні.

Нині у кінології однією із актуальних задач є розробка і використання методів контролю чистопородності племінних собак. Вирішити це завдання неможливо без стандартизації порід, єдиної світової системи розведення та загальної уніфікованої бази даних для генетичної оцінки собак. Таким законодавчим органом у кінології є Міжнародна кінологічна організація FCI (Federation Cynologique Internationale), створена з метою розвитку і захисту чистопородного собаківництва. За вимогами FCI (стаття 18 Міжнародних правил розведення, прийнята у новій редакції 2012 року) обов'язковим є проведення ДНК-тестування собак як способу контролю генофонду чистопородних племінних собак, відповідно до стандартів і методик Міжнародного Товариства Вивчення Генетики Тварин (ISAG). Для генетичної ідентифікації собак ISAG визначено і рекомендовано ряд мікросателітних локусів [2].

Мікросателітні локуси – це ділянки ДНК, тандемно розташовані короткі некодуючі послідовності ДНК, поширені по всьому геному. Завдяки високій поліморфності і успадкуванню за менделівським законами мікросателіти представляють собою ідеальні ДНК-маркери тварин, у тому числі і собак [3, 4]. Значна частина мікросателітів, за виключенням тісно зчеплених з функціональними локусами, є селективно нейтральними. Завдяки кодомінантному характеру успадкування локусів мікросателітної ДНК і чіткому прояву їх алельних варіантів існує реальна можливість визначення як генотипу окремої особини, так і родинних зв'язків у популяції тварин.

Зважаючи на це та використовуючи рекомендації ISAG, нами проведено генетичний аналіз популяції собак породи німецький дог з використанням панелі мікросателітних ДНК-маркерів. В Україні кількість німецьких догів, зареєстрованих у КСУ та ККУ, – близько 600 голів.

**Матеріали та методи досліджень.** Для ДНК-досліджень використовували клітини буккального епітелію від 22 тварин Київської обласної федерації службово-спортивного собаківництва. Матеріал відбирали шляхом потирання слизової оболонки щоки (зіскоб) спеціальними паличками (можна використовувати вушні палички), які одразу висушували. Проби відбирались співробітниками лабораторії за дотримання умов стерильності в одноразові пробірки. Для транспортування зразків використовували транспортувальний контейнер-холодильник з льодом. Зразки інкубували 3 години з додаванням однократного протеїназного буферу та протеїнази К за температури 65°C. ДНК виділяли за допомогою набору реактивів «ДНК-сорб В» («Амплісенс», Росія), згідно з інструкцією виробника.

Для генетичного аналізу було обрано п'ять мікросателітних локусів: PEZ1, PEZ6, PEZ8, FHC 2010, FHC2054 [ 2] з характеристиками, наведеними у табл. 1.

#### 1. Мікросателітні маркери для ідентифікації собак

Маркер	Локалізація у геномі, № хромосоми	Розмір алелів, п.н	Флуоресцентна мітка
PEZ1	9	104-124	FAM
PEZ6	12	174-204	FAM
PEZ8	9	222-248	FAM
FHC2010	11	226-238	FAM
FHC2054	11	148-168	FAM

Полімеразну ланцюгову реакцію проводили у термоциклері Applied Biosystems 2720 (Applied Biosystem, США) Ампліфікат денатурували формамідом (Sigma, США) та розділяли за допомогою капілярного електрофорезу на генетичному аналізаторі «ABI Prism 3130»

Genetic Analyzer (Applied Biosystem, США), згідно з рекомендаційним протоколом виробника. Для визначення розміру ампліфікованих фрагментів використовували внутрішній стандарт GeneScane-350-ROX (Applied Biosystem, США). Аналіз результатів проводили у програмі «Gene Mapper 3.7.» (Applied Biosystem, США).

Популяційно-генетичну обробку результатів здійснювали за допомогою програмного забезпечення Excel 2010, а також математично-статистичних програм, зокрема індекси очікуваної (He) та спостережуваної гетерозиготності (Ho), індекс поліморфізму (Pis) і вірогідність виключення випадкового збігу алелів (PE) обраховували програмою Cervus 3.0.3 та PowerStatsV12, а комбіновану вірогідність виключення випадкового збігу алелів (CPE) за допомогою математичної формули:

$$CPE=1-(1-PE_i),$$

де CPE – комбінована вірогідність виключення випадкового збігу алелів;

$PE_i$  – вірогідність випадкового збігу алелів, що вивчаються.

**Результати досліджень.** Вибір тварин породи німецький дог, як об'єкту генетичного дослідження, мотивувався тим, що тварини цієї породи мають ряд екстер'єрних і етологічних особливостей, є однією з найкрупніших порід у світі і мають вагоме суспільне значення, за призначенням належать до службових собак (охоронці та собаки-компаньйони) (рис.1).



Рис 1. Представники породи собак німецький дог

Аналіз генетичної структури дослідженого поголів'я собак за мікросателітними локусами показав, що у п'яти вивчених мікросателітних локусах ідентифіковано від 4 до 7 алелів. У процесі аналізу алелофонду групи тварин отримано дані, що характеризують поліморфізм кожного маркера (табл. 2). У дослідженій вибірці один локус, в середньому, містив 5,8 алелів, причому ця величина варіювала від 4 (FHC2010) до 7 (PEZ6, PEZ8). Тобто, найбільший поліморфізм спостерігали за локусами PEZ6 та PEZ8, а найменший – за локусом FHC2010.

Як видно з даних, отриманих у результаті досліджень, для локусу PEZ1 найвища частота відзначена для алеля М (0,250), найменша – 0,022 для алеля Р.

В цілому у дослідженій групі максимальну частоту (0,500) виявлено для алеля М локусу FHC2010, мінімальну, що зустрічається у групі 0,022 – для алеля Р локусу PEZ1.

З метою уніфікації використання отриманих у результаті досліджень даних та для зручності оперування статистичними результатами, зважаючи на похибку методу, нами розроблено власну систему кодування розмірів алелів – буквенну панель, яка кодує розміри визначених алелів за кожним з досліджуваних мікросателітних маркерів буквами англійського алфавіту [5] (табл. 2).

На відміну від локусів PEZ6 і PEZ8, локус FHC2010 є менш інформативним для даної вибірки, оскільки має лише 4 алельних варіанти, з яких алель М спостерігається з найбільшою (0,500), а алель К – найменшою частотою (0,027).

Локус PEZ1 має 6 алельних варіантів розміром від 104 до 124 пар нуклеотидів. Ліміти частот даного локусу варіюють від 0,250 у алеля М до 0,022 у алеля Р. А за локусом FHC2054

## 2. Ідентифіковані алелі та їх частоти у собак породи німецький дог (n=22)

Локус	Алелі (частоти)						
PEZ1	K(0.046)	L(0.205)	<b>M(0.250)</b>	N(0.181)	O(0.295)	<b>P(0.022)</b>	-
PEZ6	I(0.182)	<b>J(0.364)</b>	K(0.136)	<b>L(0.046)</b>	M(0.068)	P(0.013)	Q(0.091)
PEZ8	H(0.068)	<b>I(0.227)</b>	J(0.206)	K(0.159)	L(0.227)	<b>M(0.045)</b>	N(0.068)
FHC2010	<b>K(0.045)</b>	L(0.320)	<b>M(0.500)</b>	N(0.135)	-	-	-
FHC2054	<b>J(0.295)</b>	K(0.182)	<b>M(0,027)</b>	N(0.183)	O(0.113)	-	-

найчастіше (0,295) виявляли алель J розміром 154 п.н., а найменш часто (0,027) – алель M.

За показником частоти, з яким вони зустрічаються у вибірці, алелі розподілили на дві групи. Першу групу склали алелі, що мають частоту, нижчу показника рівня 0,05 і визначені нами як рідкісні. До другої групи віднесли алелі з частотою вище показника 0,05, охарактеризовані як типові (табл. 3).

## 3. Спектри ідентифікованих алелей мікросателітних локусів

Локус	Типові алелі $p > 0,05$	Рідкісні алелі $q < 0,05$
PEZ1	L, M, N, O	K, P
PEZ6	I, J, K	L, M, N
PEZ8	I, J, K, L	H, M, N
FHC2010	L, M, N	K
FHC2054	J, K, N, O	M

За результатами проведеного ДНК-аналізу дослідженої вибірки німецьких догів виявлено типові та рідкісні алелі у кожному локусі. Алелі, частоти яких зустрічаються рідше  $q < 0,05$  (тобто їх частота становить менше 0,05), є найбільш інформативними. За такою класифікацією алелів у даній вибірці німецьких догів, до типових алельних варіантів однозначно для всіх локусів належать O, I, J, а до рідкісних – P. Решта ж алельних варіантів: L, M, N, K можуть бути у різних локусах як типовими, так і рідкісними. Таким чином, алель P є інформативним і має особливе значення у проведенні ДНК паспортизації собак та встановлення їх батьківства.

Розраховані параметри гетерозиготності (табл. 4) свідчать про те, що дана група, в цілому, виявляє тенденцію до гомозиготизації (фактична гетерозиготність (0,809) є меншою за очікувану (0,852) і така тенденція спостерігається за всіма локусами.

## 4. Гетерозиготність, індекс поліморфізму та вірогідність виключення випадкового збігу алелів мікросателітних маркерів собак породи німецький дог української селекції

Назва маркера	Кількість алелів	Ho	He	PIС	PE
PEZ1	6	0,909	0,791	0,735	0,814
PEZ6	7	0,909	0,857	0,819	0,814
PEZ8	7	0,727	0,905	<b>0,874</b>	0,637
FHC2010	4	0,636	0,831	0,786	0,637
FHC2054	5	0,864	0,877	0,840	0,722
Середнє	5,8	0,809	0,852	0,810	0,724
<b>CPE</b>					0,998733

Середній показник рівня поліморфності локуса, що розрахований для всієї вибірки, склав 0,810. Розраховані індекси поліморфізму (PIС) свідчать про те, що загалом досліджувана група тварин характеризується досить високим рівнем поліморфізму, який в

середньому склав 0,810 і коливався у межах від 0,636 за локусом FHC2010 до 0,909 за локусами PEZ1 та PEZ6.

Максимальним рівнем поліморфності виділявся локус PEZ8 – 0,874. Решта – чотири локуси мікросателітів мали значення показника рівня поліморфності від 0,735 до 0,840.

Враховуючи, що рівень поліморфності є по суті показником ефективно діючих в популяції алелів, то ця величина мала б корелювати з числом алелів, які виявлені в кожному з досліджених локусів і відображати рівномірність розподілу алелів.

Відносно значень рівня очікуваної гетерозиготності, максимумом характеризувався локус PEZ8 (0,905), мінімальним значенням – PEZ1 (0,791). Значення фактичної гетерозиготності, в основному, дещо перевищує очікувану, за винятком локусів PEZ8 і FHC2010.

Для дослідженої групи собак встановлено, що вірогідність виключення випадкового збігу алелей (PE), в середньому, становила 0,724 з лімітами від 0,637 (у локусах PEZ8 та FHC2010) до 0,814 (PEZ1 та PEZ6). Комбінована вірогідність виключення випадкового збігу алелей (CPE) склала 0,998, тобто 99,8 %. Даний показник є підтвердженням високої достовірності отриманих результатів досліджень.

**Висновки.** Таким чином, аналіз поліморфізму локусів мікросателітної ДНК у собак породи німецький дог, виявлення їх особливостей за всіма генетико-популяційними показниками, дають змогу ефективно використовувати обрані маркерні системи для вирішення різних практичних завдань собаківництва – ідентифікації окремих особин, генетичної паспортизації порід та рівня їх генетичної мінливості.

**Вдячності** Автори виражають щире подяку Шельову Андрію Володимировичу за сприяння в організації проведення досліджень з даною породою тварин.

#### БІБЛІОГРАФІЯ

1. Dogs coined from adult somatic cells / В. С. Lee [et all.] // *Nature*. – 2005. – V.436. – P. 641.
2. Parker H. G. Molecular genetics: DNA analysis of a putative dog clone / H. G. Parker, L. Kruglyak, E. A. Ostranger // *Nature*. – 2006. – V. 440. – P. 1–2.
3. Geldermann H. Genome analysis in domestic animals. // *Genetics*. – 1994. – № 134. – P. 943–951
4. Olivier M. Random amplified polymorphic DNA as markers for canine genetic studies / M. Olivier, M. A. Meehl, G. Lust // *The Am. Genet. Assoc.* – 1999. – 90. – P. 78–82.
5. Малишева О. О. Генетична структура популяції стерляді (*ACIPENSERRUTHENUS*) за мікросателітними маркерами / О. О. Малишева, В. Г. Спиридонов, С. Д. Мельничук // *Вісник Сумського національного аграрного університету*. – 2014. – 2/1 (24). – С. 212–215.

#### REFERENCES

1. Lee, В. С, М. К. Kim, G. Jang, Н. J. Oh, F. Yuda, Н. J. Kim, М. S. Hossein, J. J Kim, S. K. Kang, G. Schatten, and W. S. Hwang. 2005. Dogs coined from adult somatic cells. *Nature*. 436:641.
2. Parker, H. G, L. Kruglyak, and E. A. Ostranger. 2006. Molecular genetics: DNA analysis of a putative dog clone. *Nature*. 440:1–2.
3. Geldermann, H. 1994. Genome analysis in domestic animals. *Genetics*. 134:943–951
4. Olivier, M., M. A. Meehl, and G. Lust. Random amplified polymorphic DNA as markers for canine genetic studies. *The Am. Genet. Assoc.* 90: 78-82.1999.
5. Malysheva O. O., V. H. Spirydonov, and S. D. Mel'nychuk. 2014. Genetic structure of populations of Sturgeon (*ACIPENSERRUTHENUS*) by microsatellite markers. *Visnyk Sums'koho natsional'noho ahrarnoho universytetu – Bulletin of Sumy National Agrarian University*. 2/1(24):212–215.