

УДК 636:575. 391

## ПОЛІМОРФІЗМ МІКРОСАТЕЛІТНИХ ПОСЛІДОВНОСТЕЙ ДНК У СОБАК ПОРІД РОСІЙСЬКИЙ ТОЙ-ТЕР'ЄР І НІМЕЦЬКИЙ ДОГ

*В. В. Дзіцюк<sup>1</sup>, С. Г. Круглик<sup>2</sup>, В. Г. Спиридонов<sup>2</sup>*  
dzitsiuk@yandex.ua

<sup>1</sup>Інститут розведення і генетики тварин імені М. В. Зубця НААН,  
вул. Погребняка, 1, с. Чубинське, Бориспільський р-н, Київська обл., 08321, Україна

<sup>2</sup>Українська лабораторія якості та безпеки продукції АПК  
Національного університету біоресурсів і природокористування України,  
вул. Машинобудівників, 7, смт Чабани, Києво-Святошинський р-н,  
Київська обл., 08162, Україна

*Досліджено рівень генетичного поліморфізму п'яти мікросателітних локусів у собак породи німецький дог і російський той-тер'єр, що розводяться в Україні. Дослідження спрямовані на оцінку мікросателітної панелі для перевірки спорідненості та ідентифікації у вітчизняних порід собак. Для генетичного аналізу використано п'ять мікросателітних локусів: PEZ1, PEZ6, PEZ8, які рекомендовані American Kennel Club, та FHC 2010, FHC2054, рекомендовані ISAG з метою генотипування собак.*

*Виявлено існування індивідуальних і породних відмінностей собак порід німецький дог і російський той-тер'єр. Встановлено, що середнє число алелів на локус у вибірці російських той-тер'єрів — 8,2, у німецьких догів — 5,8. Розраховані параметри гетерозиготності (показники Hobs і Hexр) свідчать про те, що обидві групи в загальному виявляють тенденцію до гомозиготизації: фактична гетерозиготність є меншою за очікувану. Розраховані індекси поліморфізму (PIC) свідчать про високий рівень поліморфізму обох досліджуваних вибірок. Показник PIC у групі російських той-тер'єрів коливався в межах від 0,580 за локусом FHC2010 до 0,866 за локусом PEZ6, у німецьких догів — від 0,735 за локусом PEZ1 до 0,874 за локусом PEZ8. Середньогрупові значення PIC свідчать про вищий поліморфізм мікропопуляції німецького дога (середнє значення — 0,810).*

*У досліджених тварин знайдено рідкісні алелі та відмічено поліморфізм кожного локусу. Включення випадкового збігу алелів на рівні 99,8 % надає можливість використання отриманої популяційно-генетичної інформації для підтвердження походження, індивідуальної ідентифікації і породної наспортизації собак.*

**Ключові слова:** СОБАКИ, ДНК-МАРКЕРИ, МІКРОСАТЕЛІТИ, ПОЛІМОРФІЗМ, ТОЙ-ТЕР'ЄР, НІМЕЦЬКИЙ ДОГ, АЛЕЛІ, ЛОКУС

## POLYMORPHISM OF MICROSATELLITE DNA SEQUENCES IN DOGS RUSSIAN TOY TERRIER AND GERMAN DOG

*V. Dzitsiuk<sup>1</sup>, S. Kruhlyk<sup>2</sup>, V. Spyrydonov<sup>2</sup>*  
dzitsiuk@yandex.ua

<sup>1</sup>The Institute of Animals Breeding and Genetics NAAS,  
Chubynske, Boryspil district, Kyiv region, 08321, Ukraine

<sup>2</sup>Ukrainian Laboratory of Quality and Safety of Agricultural Products,  
National University of Life and Environmental Sciences of Ukraine,  
Chabany, Kyiv-Sviatoshyn district, Kyiv region, 08162, Ukraine

*The level of genetic polymorphism of five micro-satellite loci for the German Dog and the Russian Toy-Terrier dog breeds which are bred in Ukraine is researched. The study is aimed to value the micro-satellite panel for checking and identifying the relationship of domestic dog breeds. The five micro-satellite loci were used for the genetic analysis: PEZ1, PEZ6, PEZ8, recommended by the American Kennel Club, and FHC 2010, FHC2054, recommended by ISAG in order to genotype the dogs.*

*The existence of individual and breed differences for the German Dog and Russian Toy-Terrier breeds is found. It is established that the average number of alleles per locus is 8.2 for the sample of Russian Toy-Terriers*

and 5.8 for the German Dogs. The parameters of heterozygosity were calculated. The Hobs and Hexp indices show that in general both groups tend to homozygotisation — the actual heterozygosity is lower than expected. The calculated polymorphism (PIC) indices display a high level of polymorphisms for both studied samples. The PIC Index ranged from 0.580 per locus FHC2010 to 0.866 per locus PEZ6 for the Russian Toy-Terrier group and from 0.735 per locus PEZ1 to 0.874 per locus PEZ8 for the German Dogs. The average group RIS values indicate a higher polymorphism for the German Dog micro-population (0.810 in average).

The rare alleles were discovered as well as the polymorphism was noted for each locus in the investigated samples of animals. The exclusions of coincidental match of alleles at 99.8 % provide the opportunity for using the resulting population-genetic information to confirm the origin, individual identification and breed certification of the dogs.

**Keywords:** DOG, DNA-MARKERS, POLYMORPHISM OF MICROSATELLITE, TOY-TERRIER, GERMAN DOG, FLLELES, LOCI

## ПОЛИМОРФИЗМ МИКРОСАТЕЛЛИТНЫХ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ ДНК У СОБАК ПОРОД РОССИЙСКИЙ ТОЙ-ТЕРЬЕР И НЕМЕЦКИЙ ДОГ

В. В. Дзицюк<sup>1</sup>, С. Г. Круглик<sup>2</sup>, В. Г. Спиридонов<sup>2</sup>  
dzitsiuk@yandex.ua

<sup>1</sup>Институт разведения и генетики животных имени М. В. Зубца НААН,  
ул. Погребняка, 1, с. Чубинское, Бориспольский р-н, 08321, Украина

<sup>2</sup>Украинская лаборатория качества и безопасности продукции АПК  
Национального университета биоресурсов и природопользования Украины,  
ул. Машиностроителей, 7, п.г.т. Чабаны, Киево-Святошинский р-н, 08162, Украина

Исследован уровень генетического полиморфизма пяти микросателлитных локусов у собак пород российский той-терьер и немецкий дог, разводимых в Украине. Исследования направлены на оценку микросателлитной панели с целью проверки возможности идентификации отечественных пород собак. Для генетических исследований использовано пять микросателлитных локусов, из которых три (PEZ1, PEZ6, PEZ8) рекомендованы American Kennel Club и два (FHC 2010, FHC2054) рекомендованы ISAG с целью генотипирования собак.

Выявлено существование индивидуальных и породных отличий собак пород немецкий дог и российский той-терьер. Встановлено, что среднее число аллелей на локус в выборке российских той-терьеров — 8,2, немецких догов — 5,8. Рассчитаны параметры гетерозиготности — показатели Hobs и Hexp свидетельствуют о том, что обе группы животных выявляют тенденцию к гомозиготизации: фактическая гетерозиготность имеет меньшее значение, чем ожидаемая. Вычисленные индексы полиморфизма (PIC) указывают на высокий уровень полиморфизма обеих исследованных выборок. Показатель PIC в группе российских той-терьеров варьирует в пределах от 0,580 по локусу FHC2010 до 0,866 по локусу PEZ6, у немецких догов — от 0,735 по локусу PEZ1 до 0,874 по локусу PEZ8. Среднегрупповые значения PIC свидетельствуют о более высоком полиморфизме микропопуляции немецкого дога.

В исследуемой выборке животных выявлено редкие аллели, отмечено 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, РОССИЙСКИЙ ТОЙ-ТЕРЬЕР, НЕМЕЦКИЙ ДОГ, ПОЛИМОРФИЗМ, МИКРОСАТЕЛЛИТЫ, ЛОКУСЫ

Домашні собаки (*Canis familiaris* L.) є прикладом особливої фенотипової мінливості. Інтенсивний штучний добір створив морфологічно найрізноманітніший вид ссавців, який нараховує понад 400 порід.

Високонсолідовані породи є відображенням високого рівня генетичної однорідності і водночас мають певні ризики інбредної депресії і спадкових дефектів. Для розвитку ефективної стратегії у племінній роботі необ-

хідна надійна перевірка достовірності походження та ідентифікації тварин. З цією метою у кінології використовують молекулярно-генетичні методи, зокрема дослідження мікросателітних ділянок ДНК відповідно до стандартів і методик Міжнародного Товариства Вивчення Генетики Тварин (ISAG) та за рекомендаціями АКС (*American Kennel Club*) [3]. Результатом ДНК-дослідження є профіль ДНК тварини — специфічний розподіл у капілярному електрофорезі фрагментів ДНК у вигляді піків, який є молекулярно-генетичним паспортом тварини.

Такі дослідження ДНК стали стандартним інструментом для перевірки походження та ідентифікації окремих собак у багатьох країнах, однак в Україні метод ще не набув поширення.

Наші дослідження спрямовані на оцінку мікросателітної панелі для перевірки спорідненості та ідентифікації у вітчизняних порід собак, зокрема собак порід той-терер і німецький дог.

### Матеріали і методи

У дослідженні залучено 22 собаки породи німецький дог і 22 собаки породи російський той-тер'єр. Для аналізу використали клітини буккального епітелію, які відбирали зіскобом слизової оболонки ротової порожнини рота тварини спеціальними паличками. Зразки інкубували протягом 3 годин з дода-

ванням протеїназного буферу та протеїнази К за температури 65 °С. ДНК виділяли за допомогою набору реактивів «ДНК-сорб В» («Амплісенс», Росія) згідно з інструкцією виробника.

Для генетичного аналізу використано п'ять мікросателітних локусів: PEZ1, PEZ6, PEZ8, які рекомендовані *American Kennel Club*, та FHC 2010, FHC2054, рекомендованих ISAG з метою генотипування собак (Табл. 1). Дизайн олігонуклеотидних праймерів та флуоресцентно мічених зондів для ДНК-маркерів собак для досліджень добирались за допомогою програми *Primer Express*, наданої фірмою *Applied Biosystems*.

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 *GeneScan-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 *Microsoft Excel 2010*, а також математично-статистичних програм,

Таблиця 1

### Перелік праймерів, відібраних для аналізу

Праймер	Локалізація в геномі, № хромосоми	Нуклеотидна послідовність праймера	Розмір алелів, п. н	Флуоресцентна мітка
PEZ1	9	GGCTGTCACTTTTCCCTTC CACCACAATCTCTCTCATAAATAC	92–136	FAM
PEZ3	7	CACTTCTCATACCCAGACTC CAATATGTCAACTATACTTC	95–154	FAM
PEZ6	12	ATGAGCACTGGGTGTTATAC ACACAATTGCATTGTCAAAC	164–212	FAM
PEZ8	9	TATCGACTTTATCACTGTGG ATGGAGCCTCATGTCTCATC	221–257	FAM
FHC2010	11	AAATGGAACAGTTGAGCATGC CCCCTTACAGCTTCATTTTCC	208–260	FAM
FHC2054	11	GCCTTATTCATTGCAGTTAGGG ATGCTGAGTTTTGAACCTTCCC	141–181	FAM

зокрема визначали індекси очікуваної (He) та спостережуваної гетерозиготності (Ho), індекс поліморфізму (PIC) і вірогідність виключення випадкового збігу алелів (PE).

### Результати й обговорення

У генетичному плані порода є генотипом (чи комбінацією генотипів), який за своїми ознаками відрізняється від інших порід тварин. Генотип характеризується таким набором алелів, який унікально диференціює групу генетично однорідних особин від інших. Молекулярна генетика дає можливість ідентифікації і реєстрації порід сільськогосподарських тварин, зокрема собак, за використання молекулярних маркерів [1, 5].

Методом фрагментарного аналізу мікросателітних локусів ДНК собак з детекцією результатів через капілярний електрофорез виявили існування індивідуальних і породних відмінностей собак порід російський той-тер'єр і німецький дог. Всі п'ять локусів (PEZ1, PEZ6, PEZ8, FHC2054, FHC2010) були поліморфними, що дозволило встановити різницю у гене-

тичній структурі обох досліджених мікропопуляцій.

У мікропопуляції собак породи російський той-тер'єр за п'ятьма мікросателітними локусами встановлено паттерн розміром від 100 до 202 пар нуклеотидів, в мікропопуляції собак породи німецький дог-паттерн — розміром від 104 до 242 пар нуклеотидів (Табл. 2).

Загальна кількість виявлених алелів за п'ятьма дослідженими локусами в обох порід складає 83, майже порівну в кожній породі — 41 алель у собак породи російський той-тер'єр і 42 — у німецьких догів. У той-тер'єрів найбільшу кількість алелів виявлено за локусом PEZ6 (11 алелів), у німецьких догів — за локусом PEZ8 (13 алелів).

Мінімальне число алелів (в обох порід — по 6) виявили у локусі FHC2010 у той-тер'єрів та PEZ1 — у німецьких догів.

У російських той-тер'єрів найінформативнішим у дослідженні цієї мікропопуляції є локус FHC2010, оскільки у ньому алель розміром 236 п.н. трапляється з частотою 0,575. У німецьких догів з найбільшою частотою — 0,265 — зустрічається алель роз-

Таблиця 2

### Характеристика частот алелів за обраними мікросателітними локусами у собак порід російський той-тер'єр (n=22) німецький дог (n=22)

Локус	Алель (частота)										
Російський той-тер'єр											
PEZ1	100 (0,275)	102 (0,050)	108 (0,300)	110 (0,100)	112 (0,125)	114 (0,050)	118 (0,025)	126 (0,025)			
PEZ8	222 (0,150)	224 (0,125)	226 (0,325)	230 (0,100)	234 (0,050)	242 (0,050)	246 (0,200)				
FHC2010	224 (0,125)	226 (0,025)	228 (0,175)	230 (0,025)	236 (0,575)	240 (0,075)					
PEZ6	174 (0,125)	176 (0,175)	178 (0,100)	180 (0,150)	186 (0,050)	188 (0,075)	190 (0,025)	192 (0,025)	196 (0,025)	200 (0,150)	202 (0,100)
FHC2054	148 (0,225)	150 (0,100)	154 (0,125)	160 (0,150)	162 (0,050)	164 (0,025)	166 (0,150)	168 (0,175)			
Німецький дог											
PEZ1	104 (0,046)	108 (0,205)	112 (0,250)	116 (0,181)	120 (0,265)	124 (0,022)					
PEZ8	222 (0,023)	224 (0,045)	226 (0,045)	228 (0,182)	230 (0,137)	232 (0,069)	234 (0,045)	236 (0,114)	238 (0,045)	240 (0,182)	242 (0,045)
FHC2010	226 (0,045)	228 (0,160)	230 (0,160)	232 (0,250)	234 (0,250)	236 (0,090)	238 (0,045)				
PEZ6	174 (0,182)	176 (0,273)	178 (0,091)	180 (0,136)	186 (0,046)	188 (0,068)	200 (0,113)	202 (0,091)			
FHC2054	148 (0,136)	150 (0,159)	154 (0,182)	160 (0,136)	162 (0,091)	164 (0,024)	166 (0,159)	168 (0,113)			



міром 120 п.н. у локусі PEZ. Найменшу частоту у російських той-тер'єрів (0,025) виявили у шести алелів — з розмірами 126 у локусі PEZ1, 226 і 230 у локусі FHC2010 та 190, 192, 196 у локусі PEZ6. У німецьких догів з найменшою частотою (0,022) трапляється алель розміром 124 п.н. у локусі PEZ1.

Середнє число алелей на локус у вибірці російських той-тер'єрів — 8,2, у німецьких догів — 5,8. За результатами досліджень Slaska et al. (2008) [7], у собак породи хорт цей показник становив 2,5 алелі/локус, у лабрадорів — 3,3, у німецької вівчарки — 3,3 та у такси — 5,6 алелей на локус.

Розраховані параметри гетерозиготності — показники Hobs і Hexр — свідчать про те, що обидві групи в цілому виявляють тенденцію до гомозиготизації: фактична гетерозиготність є меншою за очікувану (Табл. 3). Така тенденція спостерігається за всіма локусами. Аналіз даних таблиці показує, що серед п'яти вивчених локусів у той-тер'єрів локус PEZ1 відрізняється близьким до рівноваги розподілом, а локуси PEZ8, FHC2054 характеризуються зміщенням рівноваги в сторону недостатності гетерозигот. У німецьких догів найближчим до рівноваги є локус FHC2054, зміщеними в сторону нестачі гетерозигот — локуси PEZ8, FHC2010, в сторону переваги гетерозигот — локус PEZ1.

Індекс поліморфізму (PIC) був уведений для аналізу поліморфізму у роботі Botstein et al. (1980) [2] з метою визначення інформативності мікросателітного маркера. Помірно інформативним вважається маркер, у якого значення PIC є меншим, ніж 0,50. У ви-

бірках російського той-тер'єра і німецького дога таких маркерів немає: у всіх маркерів значення PIC більше 0,50. Результати високого поліморфізму локусу PEZ8 узгоджуються з результатами, отриманими De Nise S. et al. [4], де саме цей локус був найінформативнішим у популяції з 9561 собаки, які представляли 108 порід. Найменш інформативним у їх дослідженні виявився локус FHC2010, що цілком узгоджується з нашими дослідженнями. Аналогічні результати отримані і Volkel et al. [8], Zenke [9].

Розраховані індекси поліморфізму (PIC) свідчать, що загалом обидві досліджувані вибірки характеризуються високим рівнем поліморфізму, який у групі російських той-тер'єрів коливався в межах від 0,580 за локусом FHC2010 до 0,866 за локусом PEZ6, а у німецьких догів — відповідно, від 0,735 за локусом PEZ1 до 0,874 за локусом PEZ8. Середньогрупові значення PIC свідчать про вищий поліморфізм мікропопуляції німецького дога (0,810).

У досліджуваній мікропопуляції собак породи російський той-тер'єр вірогідність виключення випадкового збігу алелей (PE) у середньому становила 0,870 з лімітами від 0,606 до 1,000. Цей же показник у німецьких догів у середньому встановлений на рівні 0,724 з мінімальною величиною (0,722) у локусі FHC2054 і з максимальною (0,814) — у локусах PEZ1 і PEZ6.

В аналогічних дослідженнях, проведених Pribanova [6], для визначення поліморфізму мікросателітних локусів у популяції югославської вівчарки комбінована вірогідність виключення випадкового збігу алелей

Таблиця 3

**Гетерозиготність, індекс поліморфізму та вірогідність виключення випадкового збігу алелей мікросателітних маркерів собак породи німецький дог та російський той-тер'єр**

Маркери	російський той-тер'єр					німецький дог				
	кількість алелів	Hobs	Hexр	PIC	PE	кількість алелів	Hobs	Hexр	PIC	PE
PEZ1	9	0,800	0,821	0,774	1,000	6	0,909	0,791	0,735	0,814
PEZ6	11	0,800	0,901	0,866	0,606	7	0,909	0,857	0,819	0,814
PEZ8	7	0,500	0,822	0,775	0,745	7	0,727	0,905	0,874	0,637
FHC2010	6	0,600	0,632	0,580	1,000	4	0,636	0,831	0,786	0,637
FHC2054	8	0,750	0,867	0,826	1,000	5	0,864	0,877	0,840	0,722
Середнє значення	8,2	0,690	0,808	0,764	0,870	5,8	0,809	0,852	0,810	0,724

(CPE) дорівнювала 1,000, тобто становила 100 %, що є підтвердженням високої вірогідності одержаних даних.

### Висновки

Таким чином, проведені дослідження встановили певні відмінності у поліморфізмі мікросателітних локусів ДНК, що є важливим для визначення породних особливостей собак. Генетичні дослідження дають можливість кінологу-селекціонеру розширити і поглибити його уявлення про особливості племінного матеріалу, з яким він працює. У процесі селекції, наукових досліджень, експериментальної та пошукової роботи створюються або виявляються бажані генотипи, які є вихідним матеріалом для удосконалення наявних порід собак і виведення нових. Актуальним є питання впровадження генетичної експертизи собак за поліморфними системами ДНК в українській кінології, як це зроблено у більшості країн світу. Методичні засади й експериментальне забезпечення молекулярно-генетичної оцінки собак вже проводять в Українській лабораторії якості продукції АПК та в Інституті розведення та генетики тварин НААН України.

### Перспективи подальших досліджень.

Подальші дослідження передбачають проведення комплексу робіт з генетичної паспортизації собак порід ротвейлер та вівчарки.

1. Adams J. R., Leonard J. A. Waits L. P. Wide-spread occurrence of domestic dog mitochondrial DNA haplotype in southeastern U.S. coyotes. *Molecular Ecology*, 2008, 12, pp. 541–546.

2. Botstein D., White R., Skolnick M., Davis R. Construction of a Genetic Linkage Map in Man using restriction fragment length polymorphism. *Am. J. Hum. Genet.*, 1980, 32, pp. 314–331.

3. [http://www.akc.org/news/index/cfm.article\\_id=4592](http://www.akc.org/news/index/cfm.article_id=4592)

4. De Nise S., Johnston E., Halverson J., Marshall K., Rosenfeld D., McKenna S., Shap T., Edwards J. Power of exclusion for parentage verification and probability of match for identity in American kennel club breeds using 17 canine microsatellite markers. *Anim. Genet.*, 2004, 35, pp. 14–17.

5. Geldermann H. Genome analysis in domestic animals. *Genetics*, 1994, 134, pp. 943–951.

6. Pribanova M., Horak P., Schroffellova D., Urban T., Bechynova R., Musilova L. Analysis of genetic variability in the Czech Dachshund population using microsatellite markers. *J. Anim. Breed. Genet.*, 2009, 126, pp. 311–318.

7. Slaska B., Jezewska G., Zieba G., Pierzchała M. Genetic variability and linkage of selected microsatellite markers in the Chinese raccoon dog. *Arch. Tierz., Dummerstorf*, 2008, 51, 2, pp. 187–198.

8. Volkel I. Breed identification in *Canis familiaris*: Various approaches based on molecular genetic studies. PhD Diss. Hannover, Germany, Tierärztlichen Hochschule. 2005, 153 pp. Available at University electronic library: [http://elib.tiho-hannover.de/dissertations/voelkeli\\_ws05.pdf](http://elib.tiho-hannover.de/dissertations/voelkeli_ws05.pdf)

9. Zenke P., Egyed B., Zoldag L., Padar Z. Population genetic study in Hungarian canine populations using forensically informative STR loci. *Forensic Sci. Int.-Gen.*, 2011, 31, 5, pp. 31–36.