

17. Popescu, C. P. 1990. Consequences of abnormalities of chromosome structure in domestic animals. *Reproduction, nutrition, development*. 1:105–116.
18. Logue, D. N. 1978. Meiosis and spermatogenesis in bull heterozygous for presumptive 1/29 Robertsonian translocation. *J. Reprod. Fertil.* 54:159–165.
19. Slota, E., B. Danielak-Gzech, and M. Koscielny. 1996. Analiza genomu zwierząt w aspekcie praktycznego wykorzystania w hodowli – Analysis of the genome of animals in terms of practical use in breeding. *Biul. Inf. Inst. zootechn.* 34(3):11–26.
20. Gustavsson, I., and G. Rockborn. 1964. Chromosome abnormality in three cases of lymphatic leukemia in cattle. *Nature*. 203:990.
21. Villagomez-Zavala, D. A. F. 1993. Synaptonemal complex analysis of chromosome translocations in pigs and cattle. *Animal Breeding and Genetics*. 102:1–56.
22. Kovács, A. 1996. Chromosome investigations of bulls in Hungary. *Arch. Zootech.* 45:195–197.



УДК 636:575.391

ГЕНЕТИЧНИЙ АНАЛІЗ СОБАК ПОРОДИ НІМЕЦЬКА ВІВЧАРКА З ВИКОРИСТАННЯМ МІКРОСАТЕЛІТНИХ МАРКЕРІВ ДНК

В. В. ДЗИЦЮК¹, С. Г. КРУГЛИК², В. Г. СПИРИДОНОВ²

¹Інститут розведення і генетики тварин ім. М.В.Зубця НААН (Чубинське, Україна)

²Українська лабораторія якості та безпеки продукції АПК (Чабани, Україна)

dzitsiuk@yandex.ua

Результати дослідження собак породи німецька вівчарка з використанням п'яти мікросателітних локусів ДНК: PEZ1, PEZ6, PEZ8, FHC2010 і FHC2054, встановили, що найбільш інформативними є локуси PEZ6, PEZ8, FHC2010 і FHC2054, які мають високу варіабельність генотипу за рідкісними алелями, до яких відносяться: L, M, I, N, P, J, K і які становлять 70% виявлених алелів. Типові алелі: K, L, O, J, M складають 30% від загальної кількості. Встановлено рідкісний, алель P за локусом PEZ6 для даної вибірки собак, оскільки він не має повторів в інших локусах і вказує на унікальність, яку слід розглядати для подальшого моніторингу генетичного різноманіття та ідентифікації собак. У подальших дослідженнях необхідно використовувати додаткові ДНК маркери для породи німецька вівчарка, які збільшать комбіновану вірогідність випадкового збігу алелів (CPE) з 93,3% до 99,9%.

Ключові слова: німецька вівчарка, мікросателіти, ДНК, поліморфізм, генотип, гомозиготність, гетерозиготність

GENETIC ANALYSIS GERMAN SHEPHERD BREED DOGS USING MICROSATELLITE DNA MARKERS

V. V. Dzitsiuk¹, S. G. Kruhlyk², V. G. Spirydonov²

¹Institute of Animal Breeding and Genetics nd. a. M.V.Zubets of NAAS (Chubynske, Ukraine)

²Ukrainian Laboratory of Quality and Safety of Agricultural Products (Chabany, Ukraine)

According to research dog breeds German Shepherd dog using five microsatellite DNA loci: PEZ1, PEZ6, PEZ8, FHC2010 and FHC2054, found that the more informative is, loci PEZ6, PEZ8, FHC2010 and FHC2054, which have a high variability of the genotype of the rare alleles which include : L, M, I, N, P, J, K which becomes 70% of all alleles. Typical alleles: K, L, O, J, M are becoming 30% of the total. Installed a rare allele of the locus P PEZ6 for this sample of dogs, because it is not repeated in other loci, and points to the uniqueness that should be considered when monitoring the genetic diversity is the identification of dogs. In further research is necessary to use additional

DNA markers for dog breed German shepherd, which will increase the combined probability of random coincidence of alleles (CRE) from 93.3% to 99.9%.

Keywords: German Shepherd, microsatellite, DNA markers, polymorphism, genotype

ГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ СОБАК ПОРОДЫ НЕМЕЦКАЯ ОВЧАРКА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МИКРОСАТЕЛИТНЫХ МАРКЕРОВ ДНК

В. В. Дзицюк¹, С. Г. Круглик², В. Г. Спиридонов²

¹*Институт разведения и генетики животных им. М.В.Зубца НААН (Чубинское, Украина)*

²*Украинская лаборатория качества и безопасности продукции АПК (Киев, Украина)*

По результатам исследования собак породы немецкая овчарка с использованием пяти микросателлитных локусов ДНК: PEZ1, PEZ6, PEZ8, FHC2010 и FHC2054, установлено, что более информативными есть локусы PEZ6, PEZ8, FHC2010 и FHC2054, которые имеют высокую вариабельность генотипа за редкими аллелями к которым относятся: L, M, I, N, P, J, K которые становятся 70% всех аллелей. Типичные аллели: K, L, O, J, M становятся 30% от общего количества. Установлен редкий аллель P за локусом PEZ6 для данной выборки собак, поскольку он не повторяется в других локусах и указывает на уникальность, которую следует рассматривать при мониторинге генетического разнообразия та идентификации собак. У дальнейших исследованиях необходимо использовать дополнительные ДНК маркеры для породы собак немецкая овчарка, которые увеличат комбинированную вероятность случайного совпадения аллелей (CRE) с 93,3% до 99,9%.

Ключевые слова: немецкая овчарка, микросателлиты, ДНК, полиморфизм, генотип, гомозиготность, гетерозиготность

Вступ. Сучасні методи розведення собак ґрунтуються на отриманні сталих фенотипових однорідностей за використання тісного інбридингу чи розведення за однією лінією, але така стратегія призводить до втрати генетичної різноманітності, як наслідок, у породах з'являються генетичні дефекти, які не мають зовнішнього прояву або проявляються у зрілому віці собаки та передаються з покоління в покоління. Тому, для запобігання використанню у племінній справі собак з генетичними аномаліями, а також, для розробки стандартів породи та складання точних родоводів, необхідно проводити генетичну оцінку тварин.

Одним із сучасних інструментів у проведенні генетичної оцінки собак є ДНК – тестування за допомогою микросателітних локусів, які дозволяють ефективно підбирати батьківські пари, ідентифікувати (паспортизувати) тварин, провести комплексну оцінку за гетерозиготними і гомозиготними генотипами у популяціях, які допускаються для використання у селекційному процесі та дозволяє наглядно проілюструвати вплив штучного відбору на генетичні особливості в породах.

Мікросателітні ДНК-локуси при дослідженні різних порід і популяцій собак у нашій країні вивчені недостатньо, тому дослідження генетичної структури за молекулярно-генетичними маркерами потребують подальшого аналізу, як на індивідуальному, так і на популяційному рівнях.

Метою даної роботи було проведення генетичної оцінки популяції собак породи німецька вівчарка вітчизняної селекції за микросателітними локусами ДНК і вивчення поліморфізму микросателітних локусів для оцінки біорізноманіття цієї породи.

Однією найпопулярніших порід у всьому світі є – німецька вівчарка (German shepherd dog, стандарт FCI.N-166 від 23.12.2010 EN). Незважаючи на постійну мінливу моду на домашніх тварин, вівчарки залишаються поза конкуренцією, оскільки ці сильні і граціозні собаки легко піддаються дресуванню і є практично універсальною породою, ідеально пристосованою для життя і використання людиною. З точки зору науки до представників породи німецька вівчарка також є особливий інтерес, оскільки порода була повністю сформована протягом двох десятиліть, тоді, як іншим породам потрібно було кілька століть для удосконалення морфологічних якостей і передачі генетичної спадковості потомкам[1, 2].

Матеріали і методи. Дослідження проводили в Українській лабораторії якості і безпеки продукції АПК в відділі молекулярно-біологічних досліджень. Для генетичного аналізу було відібрано 42 собаки породи німецька вівчарка, яких використовують для розведення у розплідниках Кінологічного союзу України (КСУ). Матеріалом для досліджень була ДНК виділена з клітин букального епітелію і крові собак. Геному ДНК екстрагували за допомогою стандартного набору реактивів для виділення ДНК [3].

У генетичних дослідженнях аналізували мікросателітні ДНК маркери PEZ1, PEZ6, PEZ8, FHC2010 і FHC 2054, які рекомендовані Міжнародним товариством генетики тварин (ISAG), Міжнародною Кінологічною Федерацією (FCI) та Американським клубом собаківників (АКС). Олігонуклеотидні праймери мічені флуоресцентним барвником, поєднували в мультиплексну полімеразну ланцюгову реакцію (ПЛР) таким чином щоб розміри праймерів не перекривалися і відповідали за забарвленням мітки один одному. ПЛР проводили згідно з протоколом оптимальних параметрів ампліфікації для генотипування собак. Продукти ампліфікації розділяли на генетичному аналізаторі «ABI Prism 3130» Genetic Analyser (Applied Biosystems, USA). Розміри алелей визначали у програмі «Gene Mapper 3.7» (Applied Biosystems, USA) із використанням внутрішнього розмірного стандарту S450 (Applied Biosystem, США) [3].

Популяційно-генетичні показники, такі як; частоти алелей і генотипів, фактична і теоретично очікувана гетерозиготність, розраховували за допомогою програми Cervus 3.0.3, Power Stats V12 (Promega) і Statistica 6.0. Для зручності форми запису використали кодування алельних варіантів, шляхом градування розміру мікросателітного локусу відповідно до повтору праймера та привласнення кожній із цифрових позицій відповідну букву латинської абетки [4].

Результати дослідження. Проведений нами аналіз показав генетичні відмінності мікросателітних локусів ДНК у дослідженій популяції собак породи німецька вівчарка.

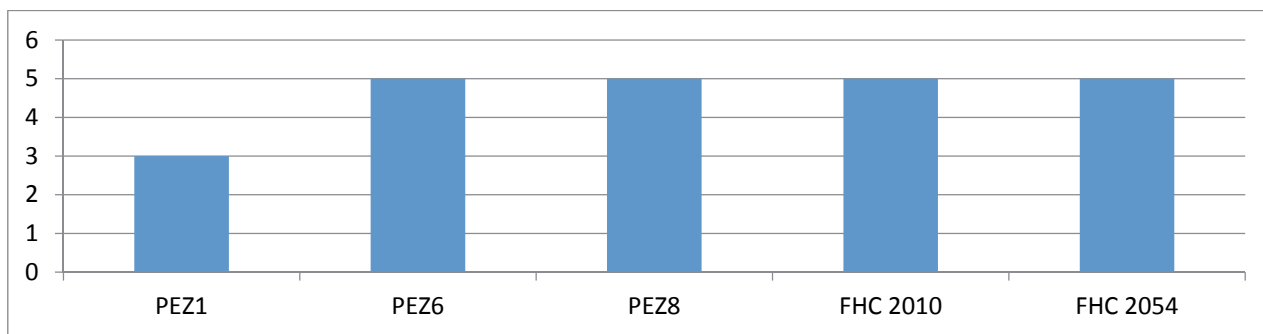


Рис. 1. Кількість ідентифікованих алелів у кожному локусі

В результаті досліджень п'яти локусів було виявлено 23 алелі, кількість яких коливалась від трьох до п'яти з середньою кількістю алелів на локус (N_a) 4,3, причому за чотирма з п'яти мікросателітних локусів виявлено однакову кількість алельних варіантів – 5. І лише за локусом PEZ 1 виявлено лише 3 алельні варіанти (рис. 1). За повідомленням китайського дослідника J.-H. Ye локус FHC 2010 також ідентифікувався 5 алельними варіантами, тоді як локуси PEZ1 і PEZ6 мали 8, а PEZ8 - 10, FHC2054 – 11 алельних варіантів у дослідженій ним вибірці з 259 собак [5].

1. Ідентифіковані алелі і частоти собак породи німецька вівчарка

	I	J	K	L	M	N	O	P
PEZ1			0,0710	0,1430	0,7860			
PEZ6	0,1430			0,0710		0,1430	0,0710	0,5710
PEZ8	0,2860	0,1430		0,2860	0,1430	0,1430		
FHC 2010	0,1430	0,0710	0,1430	0,0710		0,5710		
FHC 2054		0,5710		0,1430	0,0710	0,1430	0,0710	
	n=23							

У локусі PEZ1 виявлено найменше алельних варіантів: К з частотою 0,0710, L з частотою 0,1430 і М з частотою 0,7860. Локус PEZ6, як і решта, ідентифікувався п'ятьма алельними варіантами I (0,1430), L (0,0710), N (0,1430), O (0,0710) і P (0,5710). У локусі PEZ8 виявлено два алелі I і L з частотами 0,2860 та три алелі J, M і N з частотою 0,1430 відповідно.

Локус FHC 2010 ідентифікований за п'ятьма алельними варіантами I і К з частотою 0,1430, J і L з частотою 0,0710 та алель N, що мав найбільшу частоту - 0,5710. Локус FHC2054, як і FHC2010, мав теж п'ять виявлених алельних варіантів (J, L, M, N, N) з частотами від 0,0710 до 0,5710 (табл. 1).

За результатом розподілу у відповідності: частота повтору алельного варіанту у цифрах = латинська буква, тоді їх можна класифікувати на типові алелі, частота повтору яких становить менше 0,05 ($p > 0,05$) та рідкісні алелі частоти яких більше 0,05 ($q < 0,05$) (табл. 2).

2. Спектр 23 алельних варіантів породи німецька вівчарка

Локус	К-ть алелів на локус (N_a)	Типові алелі $p > 0,05$	Рідкісні алелі $q < 0,05$
PEZ1	3	К	L, M
PEZ6	5	L, O	I, N, P
PEZ8	5	-	I, J, L, M, N
FHC 2010	5	J, L	I, K, N
FHC 2054	5	M, O	J, L, N

Проаналізувавши молекулярно-генетичні особливості собак породи німецька вівчарка, встановлено високу варіабельність генотипу за рідкісними алелями, до яких відносяться алелі: L, M, I, N, P, J, K і які становлять 70% від загальної кількості ідентифікованих алелів. Алель Р за локусом PEZ6 унікальний для даної вибірки собак, оскільки він не повторюється в жодному іншому локусі. Типові алелі: К, L, O, J, M становлять 30% від загальної кількості. Слід звернути увагу, що алель Р локусу PEZ 6 вказує на унікальність даної вибірки тварин, яку слід враховувати для подальшого моніторингу алелофонду, генетичної паспортизації та ідентифікації собак.

На основі розрахунку частот алелів розраховали значення фактичної (*Hobs*) і очікуваної (*Hexp*) гетерозиготності, індекс поліморфізму досліджених локусів (*PIC*).

Величина фактичної гетерозиготності коливається від 0,429 (PEZ1, FHC2054) до 0,857 (PEZ8) з середнім значенням 0,629 (табл. 3).

Рівень теоретично очікуваної гетерозиготності (*Hexp*) варіював в межах від 0,385 (PEZ1) до 0,835 (PEZ8). В середньому теоретично очікувана гетерозиготність з коефіцієнтом 0,657 мала не значну перевагу середнього значення фактичної гетерозиготності (0,629), що теж свідчить про стан даної вибірки собак, близький до рівноваги. Теж саме спостерігається у показників очікуваної і фактичної гетерозиготності за локусами PEZ 6 (0,629) та PEZ 8 (0,657), що теж свідчить про рівновагу.

3. Показники поліморфізму собак породи німецька вівчарка ($n=23$)

назва локусу	к-ть алелів на локус (N_a)	<i>Hobs</i>	<i>Hexp</i>	<i>PIC</i>	<i>PE</i>
PEZ 1	3	0,429	0,385	0,325	0,132
PEZ 6	5	0,714	0,725	0,632	0,451
PEZ 8	5	0,857	0,835	0,740	0,709
FHC 2054	5	0,429	0,670	0,587	0,132
FHC 2010	5	0,714	0,670	0,587	0,451
середнє	4,6	0,629	0,657	0,574	0,675
CPE					0,933886

За локусами FHC2010 фактична гетер збільшення кількості гетерозиготних особин. А в локусі FHC 2054 навпаки теоретично очікувана гетерозиготність (0,670) переважає над фактичною (0,429), що вказує на недостачу гетерозиготних генотипів у даній мікропопуляції.

Значення *PIC* (індекс поліморфності локуса) проаналізованих локусів варіювало від 0,325 до 0,740 з середнім значенням 0,574. Локуси PEZ6, PEZ8, FHC 2010 і FHC 2054 оптимально відповідають вимогам щодо їх придатності до генетичної паспортизації генотипів, оскільки їх частота варіює в межах від 0,587 до 0,740. Знижений середній індекс поліморфізму викликаний локусом PEZ1 з коефіцієнтом 0,325 підтверджує недостатній рівень його поліморфізму для повної генетичної оцінки даної мікропопуляції собак породи німецька вівчарка ($PIC < 0,500$), що підтверджується і даними китайського дослідника J.-H. Ye, значення *PIC* в його даних за локусом PEZ1 0,320, що співвідносно з нашими результатами, а за локусом PEZ8 значення *PIC* у наших дослідженнях 0,740, в той час як у J. -H. Ye – 0,720, що, навпаки, вказує на високий поліморфізм і підтверджує ефективність його використання у генотипуванні собак.

Значення вірогідності виключення випадкового збігу алелів (*PE*), що складає в середньому 0,675, свідчить про недостатню кількість і інформативність обраних мікросателітних маркерів для породи німецька вівчарка, оскільки комбінована вірогідність (*CPE*) випадкового збігу алелів в цьому випадку перебуває на рівні 0,933886, тобто становить 93,3%.

Висновки. Обрані мікросателітні локуси, для вивчення генетичної структури даної мікропопуляції собак породи німецька вівчарка, свідчать про досить високий рівень інформативності обраної системи молекулярно-генетичних маркерів ДНК, проте є необхідність використання додаткових мікросателітних маркерів, які збільшать комбіновану вірогідність випадкового збігу алелів (*CPE*) з 93,3% до 99,9%.

Результати аналізу гетерозиготності відіграють важливу роль у вивченні динаміки генетичних процесів у популяції, оскільки на гетерозиготність впливає багато чинників, зокрема мутації, відбір, невідповідне спаровування, дрейф генів та інші [6], тому потрібен постійний моніторинг стану генетичного різноманіття для своєчасного їх виявлення та розробки заходів покращення племінної роботи із збереження біорізноманіття у різних породах собак.

БІБЛІОГРАФІЯ

1. Кирджер, М. Разведение собак популярных пород / М. Кирджер. – Ростов : Феникс, 2002. – 448 с.
2. Полищук, Ф. Й. Кинология / Ф. Й. Полищук. А. Л. Трофименко. – Ирпень : ВТО «Перун», 2007. – 1000 с.
3. Генетична ідентифікація собак (методичні рекомендації) / В. В. Дзіцюк, В. М. Ященко. С. Г. Круглик, О. В. Мельник, А. В. Шельов, В. Г. Спиридонов, С. Д. Мельничук. – К., 2012. – 24 с.
4. Microsatellite-based Genetic Diversity and Evolutionary Relationships of Six Dog Breeds / J. -H. Ye, D.-R. Ren, A.-F. Xie, X.-P. Wu, L. Xu, P.-F. Fu, H.-A. Zhao, Q.-Y. Yang // Asian-Aust. J. Anim. Sci. – 2009. – Vol. 22, No. 8. – P. 1102–1106.
5. An international parentage and identification panel for the domestic cat (*Felis catus*) / M. J. Lipinski, Y. Amigues, M. Blasi, T. E. Broad, C. Cherbonnel, G. J. Cho, S. Corley, P. Daftari, D. R. Delattre, S. Dileanis, J. M. Flynn, D. Grattapaglia, A. Guthrie, C. Harper, P. L. Karttunen, H. Kimura, G. M. Lewis, M. Logneri, J.-C. Meriaux, M. Morita, R. C. Morrin-O'Donnell, T. Niini, N. C. Pedersen, G. Perrotta, M. Polli, S. Rittler, R. Schubbert, M. G. Strillacci, H. Van Haeringen, L. A. Lyons // Animal Genetics. – 2007. – 38. – P. 371–377.
6. Левонтин, Р. Генетические основы эволюции / Р. Левонтин. – М. : Мир, 1978. – 351 с.

REFERENCES

1. Kirdzher, M. 2002. *Razvedenie sobak populyarnyih porod – Dog breeding popular breeds*. Rostov : Feniks, 448 (in Russian).

2. Polischuk, F. Y., and A. L. Trofimenko. 2007. *Kinologiya – Cynology*. Irpen, VTO «Perun», 1000 (in Ukrainian).
3. Dzisiuk, V. V., V. M. Jashhenko, S. G. Kruglyk, O. V. Mel'nyk, A. V. Shel'ov, V. G. Spyrydonov, and S. D. Mel'nychuk. 2012. *Genetychna identyfikaciya sobak (metodychni rekomendacii) – Genetic identification of dogs (guidelines)*. Kyiv, 24 (in Ukrainian).
4. Ye, J. H, D. R. Ren, A. F. Xie, X. P. Wu, L. Xu, P. F. Fu, H. A. Zhao, and Q. Y. Yang. 2009. Microsatellite-based Genetic Diversity and Evolutionary Relationships of Six Dog Breeds Asian-Aust. *J. Anim. Sci.* 22 (8):1102–1106.
5. Lipinski, M. J., Y. Amigues, M. Blasi, T. E. Broad, C. Cherbonnel, Cho G.J., Corley S., P. Daftari, D. R. Delattre, S. Dileanis, J. M. Flynn, D. Grattapaglia, A. Guthrie, C. Harper, P. L. Karttunen, H. Kimura, G. M. Lewis, M. Logneri, J.-C. Meriaux, M. Morita, R. C. Morrin-O'Donnell, T. Niini, N. C. Pedersen, G. Perrotta, M. Polli, S. Rittler, R. Schubbert, M. G. Strillacci, H. Van Haeringen, and L. A. Lyons. 2007. An international parentage and identification panel for the domestic cat (*Felis catus*). *Animal Genetics*. 38:371–377.
6. Levontin, R. 1978. *Geneticheskie osnovy jevoljucii – Genetic basis of evolution*. Moskow, 351 (in Russian).

УДК 638.1:[577.213.3:591.34]

ОПТИМІЗАЦІЯ МЕТОДІВ ВИДІЛЕННЯ ДНК З БІОЛОГІЧНОГО МАТЕРІАЛУ БДЖІЛ РІЗНИХ СТАДІЙ МЕТАМОРФОЗУ

М. Д. ПАЛЬКІНА, О. І. МЕТЛИЦЬКА

Інститут розведення і генетики тварин ім. М.В.Зубця НААН (Чубинське, Україна)
mariya_palkina@yahoo.com

Проведено порівняльний аналіз найбільш розповсюджених методів виділення ДНК а) механічна обробка зразків, 5% «Chelex-100», ІМ ДТТ, протеїназа К, час інкубування 30 та 180 хвилин; б) механічна обробка зразків, 20% «Chelex-100», тривалість інкубування 180 хвилин, в) виділення ДНК стандартним комерційним набором реагентів «ДНК-сорб Б», згідно з рекомендаціями виробника. Аналіз отриманих нами результатів виявив, що найбільш економічним підходом було інкубування зразків у розчині 20% «Chelex-100», але застосована методика поступається «ДНК Сорб-Б» за кількісними та якісними показниками екстрагованої ДНК із незначними відхиленнями, що не мають суттєвого впливу на результати проведення ПЛР.

Ключові слова: ДНК, «ДНК Сорб-Б», «Chelex -100», протеїназа К, екзувії, екстинкція

OPTIMIZATION OF DNA EXTRACTION METHODS FROM BIOLOGICAL MATERIALS OF HONEY BEES IN A DIFFERENT METAMORPHOSIS PHASE

M. Palkina, O. Metlitska

Institute of Animal Breeding and Genetics nd. a. M.V. Zubets of NAAS (Chubynske, Ukraine)

In recent comparative investigation analysis of most common methods of DNA extraction using ion exchange resin «Chelex-100» in different concentration this combination of reagents and incubation time in comparison of commercial kit «DNA Sorb B», content with recommendation of extraction protocol. The analysis of our results showed that the most economical approach would incubating samples in a solution of 20% «Chelex-100» time of incubation 180 minutes. It should be noted that applied method acquiesce to commercial kit «DNA Sorb B» for quality and quantitative scores of DNA solution that set in minor deviation that do not have significant impact in PCR results.

Keywords: DNA, «DNA Sorb - B», «Chelex® -100», proteinase K, exuviae, extinction

ОПТИМІЗАЦІЯ МЕТОДІВ ВИДЕЛЕННЯ ДНК ІЗ БІОЛОГІЧЕСЬКОГО МАТЕРІАЛУ ПЧЕЛ РАЗНИХ СТАДІЙ МЕТАМОРФОЗА

© М. Д. ПАЛЬКІНА, О. І. МЕТЛИЦЬКА, 2016