



ПОЛИМОРФИЗМ ДНК СОБАК (*CANIS FAMILIARIS* L.). II. RAPD-АНАЛИЗ

¹Кириянова О.Ю., ²Гарафутдинов Р.Р., ³Чемерис Д.А., ⁴Гиниятов Ю.Р., ^{1,5}Губайдуллин И.М., ²Чемерис А.В.

¹Уфимский государственный нефтяной технический университет
Россия, 450062, Уфа, ул. Космонавтов 1
E-mail: olga.kiryanova27@gmail.com

²Институт биохимии и генетики – обособленное структурное подразделение Федерального государственного бюджетного научного учреждения Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук, Россия, 450054, Уфа, Проспект Октября, 71

³ООО «Максим Медикал», Россия, 123423, Москва, ул. Народного Ополчения, д. 34, стр. 1

⁴ООО Рамстор, 450064, Уфа, ул. Мира, 14

⁵Институт нефтехимии и катализа – обособленное структурное подразделение Федерального государственного бюджетного научного учреждения Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук, Россия, 450075, Уфа, пр. Октября, 141

Резюме

Рассмотрен достаточно простой способ выявления полиморфизма ДНК у собак в виде амплификации неких случайных участков генома с помощью RAPD-анализа с праймерами с произвольными нуклеотидными последовательностями, не требующий предварительного знания последовательностей азотистых оснований детектируемых фрагментов ДНК. Однако информация о полных геномах исследуемых видов организмов и в данном случае собак позволяет провести предварительный *in silico* RAPD-анализ с целью прогнозировать ожидаемые результаты по каждому праймеру и их мультиплексной композиции, что дает возможность на этом этапе до проведения «мокрых» экспериментов произвести отбраковку неподходящих праймеров. В случае известных геномов ряда близких организмов, что как раз имеет место для собак, то проведенный *in silico* мультиплексный RAPD-анализ с шестью декамерными праймерами, последовательности которых исключают образование в ПЦР гомо- и гетеродимеров показал как геномное сходство, так и отличия между разными породами, а также с их диким ближайшим из ныне живущих сородичем – серым волком. Мультиплексный *in silico* RAPD-анализ представляет собой виртуальную ПЦР и если удалять из такой амплификации общие для всех исследуемых организмов ампликоны, оставляя только значимые, то этот инструмент в виде созданной нами программы ABCDNA_GS может использоваться для установления филогенетического родства особенно тех организмов, чьи геномы высоко коллинеарны, что как раз свойственно геномам разных пород собак.

Ключевые слова: собака, *Canis familiaris*, ДНК, геном, полиморфизм, RAPD-анализ, ПЦР, праймеры, генетическое штрих-кодирование

Цитирование: Кириянова О.Ю., Гарафутдинов Р.Р., Чемерис Д.А., Гиниятов Ю.Р., Губайдуллин И.М., Чемерис А.В. Полиморфизм ДНК собак (*Canis familiaris* L.). II. RAPD-анализ // *Biomics*. 2021. Т.13(3). С.309-320. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2021-22

© Авторы

DNA POLYMORPHISM OF DOGS (*CANIS FAMILIARIS* L.). II. RAPD-ANALYSIS

¹Kiryanova O.Yu., ²Garafutdinov R.R., ³Chemeris D.A., ⁴Giniyatov Y.R., ^{1,5}Gubaydullin I.M., ²Chemeris A.V.

¹Ufa State Petroleum Technological University,

1 Kosmonavtov str., Ufa, 450062, Russia, E-mail: olga.kiryanova27@gmail.com

²Institute of Biochemistry and Genetics, Ufa Federal Research Center, Russian Academy of Sciences,
71 Pr. Oktyabrya, Ufa, 450054, Russia

³Maxim Medical LLC, 34-1 Narodnogo Opolcheniya str., Moscow, 123423, Russia

⁴Ramstor LLC, 14 Mira str., 450064, Ufa, Russia

⁵Institute of Petrochemistry and Catalysis, Ufa Federal Research Center, Russian Academy of Sciences,
141 Pr. Oktyabrya, Ufa, 450075, Russia

Resume

A rather simple method of detecting DNA polymorphism in dogs in the form of amplification of random fragments of the genome using RAPD analysis with primers with arbitrary nucleotide sequences, which does not require prior knowledge of the sequences of nitrogenous bases of the detected DNA fragments, is considered. However, information about the complete genomes of the investigating species of organisms and, dogs in particular, allows with a preliminary *in silico* RAPD analysis to predict the expected results for each primer and their multiplex composition, which makes it possible at this stage to reject unsuitable primers before conducting "wet" experiments. In the case of known genomes of a number of related organisms for example in this case dogs, the multiplex RAPD analysis conducted *in silico* with six decameric primers, the sequences of which exclude the formation of homo- and heterodimers in PCR showed both genomic similarities and differences between different breeds, as well as as well as with their wild closest now living relative gray wolf with their wild closest now living relative gray wolf. Multiplex *in silico* RAPD analysis is a virtual PCR and if amplicons common to all studied organisms are removed from such amplification, leaving only significant ones, then this tool in the form of the ABCDNA_GS program created by us can be used to establish phylogenetic kinship, especially of those organisms whose genomes are highly collinear, which is just typical of the genomes of different dog breeds.

Keywords: dog, canine, *Canis familiaris*, DNA, genome, polymorphism, RAPD analysis, PCR, primers, genetic barcoding

Citation: Kiryanova O.Yu., Garafutdinov R.R., Chemeris D.A., Giniyatov Yu.R., Gubaydullin I.M., Chemeris A.V. DNA polymorphism of dogs (*Canis familiaris* L.). II. RAPD-analysis. *Biomcs*. 2021. V.13(3). P.309-320. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2021-22 (In Russian)

© The Authors

Введение

В основе различий между разными особями одного вида, в том числе фенотипическими, лежит отличие их генетической структуры, известной как полиморфизм ДНК, методов выявления которого существует достаточно большое количество. При этом их можно подразделить на требующие предварительного знания нуклеотидных последовательностей отдельных генов или прочих участков ДНК, и на обходящиеся без этих сведений. К последним следует отнести целую группу методов, использующих амплификацию случайных фрагментов ДНК с помощью ПЦР, что относительно недавно нами рассмотрено весьма подробно [Кулуев и др. (Kuluev et al.), 2018] и посему здесь на этих вопросах

останавливаться не будем. Заметим лишь, что одним из наиболее простых, быстрых и при этом довольно информативных методов является так называемый RAPD-анализ (Random Amplified Polymorphic DNA) [Williams et al., 1990]. Классический вариант этого метода предполагает использование в ПЦР декамерных праймеров и разделение образующихся ампликонов в агарозных гелях, исключающих точное определение их размеров, что, впрочем, принципиально возможно с помощью секвенирующего гель-электрофореза, для RAPD-анализа с флуоресцентно-мечеными праймерами, уже показанное ранее [Corley-Smith et al., 1997], однако оцифровка первичных данных в той работе не производилась.

Выявление полиморфизма ДНК у собак представляет интерес в связи с установлением их чистопородности, выяснением родословных, и применение для этих целей среди прочих методов варианта RAPD-анализа, обеспечивающего определение размеров ампликонов с точностью до нуклеотида, имеет определенные перспективы. При этом «мокрым» экспериментам сейчас должен предшествовать анализ ставших известными геномов собак *in silico* на предмет исключения праймеров, дающих слишком много ампликонов, или наоборот не приводящих к появлению их должного количества.

RAPD-анализ ДНК собак

В литературе имеется не так много публикаций, в которых бы применялся RAPD-анализ для исследования полиморфизма ДНК собак разных пород, при этом часть из них заслуживает отдельного внимания. Все эти статьи были опубликованы еще до того, как стали известны полные нуклеотидные последовательности генома собаки, поскольку их знание для RAPD-анализа, как уже говорилось выше, не нужно, но это не совсем так, что будет видно из дальнейшего изложения.

Одной из первых таких работ [Rothuizen, Van Wolferen, 1994] стало исследование с помощью RAPD-анализа ДНК собак 16 пород, в котором с использованием шести 13-ти звенных праймеров были выявлены ампликоны, размеры которых уложились в диапазон 100-1500 пар нуклеотидов (п.н.). Для отдельных образцов генерировались ампликоны числом от 9 до 29, 14% которых для всех пород оказались полиморфными; но, когда рассматривались только гончие, частота полиморфизма составила 10%. Все реакции были полностью воспроизводимы для всех 16 образцов ДНК. При этом удалось проследить характер Менделевского наследования при анализе родословных. Особенностью этой работы было то, что в ряде экспериментов применялось одновременно по два праймера в 15 разных комбинациях, что можно считать неким движением в сторону мультиплексности ПЦР при RAPD-анализе. В том же году в криминалистическом журнале была опубликована статья [Lee, Chang, 1994], в которой с помощью единственного декамерного праймера производилось установление принадлежности ДНК тому или иному виду животных, среди которых была и собака, что сейчас делается уже иначе.

Спустя пару лет в другой работе [Ezer et al., 1996] для выявления полиморфизма ДНК собак применили очень близкий к RAPD-анализу метод, названный разработавшими его авторами [Welsh, McClelland, 1990] как AP-PCR (Arbitrary Primer). В этом случае исследовались как отдельные представители семи пород собак, несколько представителей одной породы, так и члены одной

семьи собак. Праймеры ПЦР с короткими произвольными последовательностями имели длину от 10 до 18 нуклеотидов, что приводило к образованию 15 – 30 ампликонов с длинами от 200-2000 п.н. В частности, было выявлено, что средняя гетерозиготность 10 линейных бельгийских овчарок была заметно ниже, чем у группы неродственных гончих. Некоторые праймеры дали ПЦР-продукты, которые сильно различались между бельгийскими овчарками, гончими и представителями пяти других пород.

С помощью RAPD-анализа с праймером OP-W17 (Operon Technologies, Inc.) удалось обнаружить два фрагмента длиной 650 и 990 п.н., специфичных для Y-хромосомы, и при исследовании 76 кобелей и сук 11 пород показано, что меньший фрагмент не выявлялся у двух кобелей пород пудель и шнауцер, а больший – лишь у одного пуделя, при этом ни у одной из 42 взятых в анализ сук оба эти фрагмента не детектировались [Olivier, Lust, 1998]. При исследовании собак породы лабрадор-ретривер были проанализированы 240 декамерных праймеров, треть из которых приводила к образованию, по крайней мере, одного полиморфного фрагмента ДНК [Olivier et al., 1999]. В одной из статей [Gu et al., 1999] сообщалось, что при исследовании ДНК собак отдельные полосы ДНК, полученные с помощью RAPD-амплификации, часто содержат фрагменты ДНК одинакового размера, но с разными последовательностями. Ранее этими же авторами [Gu et al., 1998] было показано, что с помощью RAPD-анализа им удалось идентифицировать маркер, до некоторой степени связанный с прогрессирующей дегенерацией сетчатки у собак, для чего было использовано 400 декамерных праймеров. В итоге был идентифицирован один праймер, который амплифицировал фрагмент ДНК размером 1,5 т.п.н. только у нормальных собак, что явилось первым сообщением об обнаружении RAPD-маркера, связанного с неким локусом, имеющим определенное отношение к заболеванию млекопитающих. Перебрав 200 декамерных праймеров, удалось найти один, показавший ассоциативную связь с дисплазией тазобедренного сустава у 9 собак из исследованных 12 с этим заболеванием [Wang et al., 1999]. В этой же работе был выявлен еще один RAPD-праймер, генерирующий фрагмент ДНК размером 800 п.н., специфичный для Y-хромосомы.

29 декамерных праймеров в RAPD-анализе были изначально тестированы на предмет их пригодности в качестве генетических маркеров, способных различать четыре вида псовых: песца, рыжую лису, китайскую енотовидную собаку и шесть пород домашней собаки [Stepnyak et al. 2002]. Для этого ДНК всех 34 образцов была пулирована и затем

лучшие десять праймеров были отобраны для дифференциации этих видов уже для использования по отдельности, обеспечив выявление ряда видоспецифичных полос. При этом ампликонов, которые могли быть специфичными для установления пород домашней собаки, обнаружить не удалось. Выявленные для всех видов и праймеров ампликоны варьировали по длине в пределах от 160 до 3000 п.н., точность определения которых конечно была довольно далека от их действительных размеров, но это не помешало авторам присвоить отсутствующим на электрофореграммах полосам компьютерные «0», а наличествующим полосам – «1», что привело к построению филогенетического древа исследованных видов псовых. Полученные результаты позволили сделать вывод, что RAPD-анализ может быть подходящим инструментом для разработки молекулярных маркеров, полезных для различения видов семейства Canidae и для изучения их филогенетических отношений.

Довольно масштабное исследование целого ряда пород собак выполнено отечественными учеными [Семухина et al., 2002]. Всего с помощью RAPD-анализа было исследовано 4 волка и 57 собак, относящихся к разным породам, но главное внимание было уделено отечественным породам – русским гончим и русским борзым, для которых проводился также анализ родословных. Предварительно тестировалось 20 праймеров с произвольными последовательностями, 12 из которых показали, что с ними можно выявлять как межпородный, так и внутривидовой полиморфизм ДНК, приводя к наработке от 9 до 25 ампликонов с размерами от 200 до 2500 п.н. Но в итоге авторы остановились на трех праймерах – двух декамерных и одном 12-ти звенном с одним вырожденным нуклеотидом в 4-ом положении от 3'-конца. По результатам исследований на основе 256 RAPD-ампликонов была построена дендрограмма сходства, показавшая близость отдельных пород. Внешней группой при сравнении служили волки из двух областей Российской Федерации.

В 2005 году было сообщено о завершении секвенирования генома собаки, размер которого составил около 2,41 млрд.п.н. [Lindblad-Toh et al., 2005]. С одной стороны это сместило исследования полиморфизма ДНК собак в сторону методов, ориентирующихся на знания нуклеотидных последовательностей, а с другой дало возможность проводить предварительный *in silico* анализ генома собак на предмет пригодности тех или иных праймеров с произвольными последовательностями для наработки подходящих ампликонов, чему посвящена следующая часть данной статьи.

In silico RAPD-анализ

Как можно видеть из изложенного выше, во многих работах при исследовании полиморфизма ДНК собак предварительно испытывалось большое или даже очень большое число праймеров, выбраковка которых уже для масштабных экспериментов при анализе увеличенного количества образцов позволяла использовать лишь небольшое конечное число праймеров. И такой подход весьма трудозатратен, довольно дорог и длителен. В настоящее время знание полных геномов ряда пород собак позволяет с помощью компьютерных программ проводить *in silico* RAPD-анализ, без «мокрых» экспериментов выбирая наиболее оптимальные праймеры с их до некоторой степени произвольными последовательностями. При этом размеры ампликонов должны быть относительно небольшими, позволяющими осуществлять точное (до нуклеотида) определение их длин. Кроме того, необходимо проводить мультиплексный RAPD-анализ, когда одновременно в реакцию амплификации вносятся несколько разных праймеров, теоретически позволяющие увеличить число итоговых ампликонов, которых обычно недостает, из-за чего снижается уровень выявляемого полиморфизма ДНК. Количество комбинаций праймеров в такой мультиплексной ПЦР подчиняется формуле $X = m^2$ где X – максимальное количество типов ампликонов, а m – число праймеров. Ранее, мы довольно подробно описали теорию такого подхода [Кирьянова и др. (Kiryanova et al.), 2020a] и здесь остановимся на ней очень кратко.

Для мультиплексного *in silico* RAPD-анализа нами создана специальная программа ABCDNA_GS (Amplified Bar-Coded DNA Genome/Specimen), совмещенная с собственной базой данных [Кирьянова и др. (Kiryanova et al.), 2020]. Как уже говорилось выше нарабатываемые в ходе RAPD-анализа ампликоны в виде двухцепочечных фрагментов ДНК обычно разделяются в агарозном геле и их размерный диапазон, как правило, составляет от 200 до 3000 п.н. При этом размеры разделяемых фрагментов ДНК определяются с довольно большой погрешностью, где некоторое число пар нуклеотидов может достигать немалых величин \pm , хотя даже ± 1 уже будет означать, что такие сведения считаются истинно цифровыми данными не могут. Причем в агарозном геле-электрофорезе в разных дорожках (тем более не в соседних) четко различить фрагмент ДНК длиной, например в 382 пары нуклеотидов от имеющего близкий размер ампликона в 378 пар нуклеотидов невозможно, и поэтому экспериментаторы вынуждены округлять эти значения до 380 п.н. (а то и 370 либо 390 п.н.), оперируя ими как одинаковыми фрагментами, отмечая их присутствие в виде

компьютерной «1». По этой причине следует модифицировать метод RAPD-анализа так, чтобы берущийся в анализ диапазон длин разделяемых фрагментов ДНК (ампликонов), позволял определять размеры их одноцепочечных вариантов с точностью до нуклеотида, что позволит уже однозначно определять, что некий образец характеризуется RAPD-фрагментом длиной 362 нуклеотида, а другому присущ ампликон размером 358 нуклеотидов. При этом это могут быть и разные участки генома или одинаковые, но несущие инделы (в этом случае из четырех нуклеотидов), что уже не важно, поскольку они обеспечивают выявляемый полиморфизм по длине. Причем, из какой части генома происходят эти фрагменты даже не имеет значения, поскольку гигантское число комбинаций этих признаков в виде фрагментов ДНК с точно определенными размерами должно нивелировать все такие нюансы.

Получаемые при секвенирующем гель-электрофорезе первичные данные в виде длин ампликонов легко перевести в двоичный формат. Так, если выбрать диапазон длин, например от 51 до 500 нуклеотидов, обеспечивающий с помощью капиллярного гель-электрофореза установление точных (до нуклеотида) размеров ампликонов, то его можно представить в виде 450 воображаемых ячеек, в которых может присутствовать ДНК (и это будет ДНК[+]–ячейка) или отсутствовать ДНК (ДНК[–]–ячейка), что соответствует «1» и «0» в двоичной системе счисления соответственно. Бинарная запись из нулей и единиц может быть преобразована в генетический штрих-код, позволяющий визуально наблюдать сходство или различия исследуемых образцов ДНК различных организмов. При этом нахождение в конкретной ДНК[+]–ячейке одного или большего числа разных ампликонов, имеющих одинаковый размер, не принципиально, поскольку ведется качественный, а не количественный анализ, и такая ДНК–ячейка все равно оцифровывается как «1». Здесь важно заметить, что если подобранные праймер(ы) придутся на повторяющиеся элементы генома, то тогда в «мокрое» эксперименте будет образовываться чрезмерно большое количество полос в геле, что будет отрицательно влиять на сбор первичных данных. Чтобы исключить такую возможность как раз и требуется предварительный *in silico* анализ полных геномов исследуемых видов. Так, например, при анализе *in silico* генома нынешнего каучуконоса №1 – гевеи бразильской мы увидели, что один из подобранных нами праймеров приводил к чрезмерно большому числу ампликонов (Кирьянова и др., неопубл.), что как раз показывает важность знания нуклеотидных последовательностей полных геномов организмов, RAPD-анализ которых намечается проводить. Причем такой подход универсален и не

зависит от принадлежности генома к той или иной группе организмов и ранее нами он уже был применен для анализа геномов нескольких видов сельскохозяйственных растений [Кирьянова и др. (Kiryanova et al.), 2020a], а также геномов лошадей [Гарафутдинов и др. (Garafutdinov et al.), 2020].

Теоретическое число комбинаций встречаемости в воображаемых ДНК–ячейках ампликонов разного размера рассчитывается как число сочетаний без повторов из m по n –

$$C_m^n = \frac{m!}{n!(m-n)!},$$

где C – общее число комбинаций встречаемости фрагментов ДНК выбранного размерного диапазона, m – число всех анализируемых в выбранном диапазоне воображаемых ДНК–ячеек, n – число ДНК[+]–ячеек, $(m-n)$ – число ДНК[–]–ячеек. Причем наличие признака (ДНК[+]–ячейка) либо его отсутствие (ДНК[–]–ячейка) при подсчете количества комбинаций по сути равнозначны за исключением крайних значений в виде полного отсутствия ампликонов или занятия ими всего диапазона воображаемых ДНК–ячеек. Максимальное число комбинаций возникает при занятии ампликонами половины ячеек из числа, берущихся в анализ, что в данном случае (225 из 450) превзойдет гугол (10^{100}) и составит $1,09e+134$, что является гигантской величиной.

***In silico* RAPD-анализ ДНК собак и волка**

Как уже отмечалось выше, в 2005 году было сообщено о завершении секвенирования черного генома собаки, размер которого тогда был определен около 2,41 млрд.п.н. [Lindblad-Toh et al., 2005]. Позже были секвенированы геномы ДНК еще нескольких пород собак и волка, полные геномы которых, в том числе по-хромосомно доступны из GenBank – https://www.ncbi.nlm.nih.gov/datasets/genomes/?taxon=9615&utm_source=data-hub.

В данном исследовании в качестве виртуальных мультиплексных праймеров использовались шесть подобранных нами декамерных олигонуклеотидов со следующими почти случайными последовательностями: TGCCACTCTC, AGCCTCACTC, TGCTCACCAC, CGACTCTCAC, AGCTCTCCAC, AGCTCCACTC. Их особенностью следует считать практически тринуклеотидный состав с присутствием в каждом лишь единственного гуанина в отличие от праймеров, используемых в цитированных выше работах. Таким образом, подобранные нами праймеры абсолютно неспособны сформировать как гомо-, так и гетеродимеры, что

очень важно для «мокрых» экспериментов и на этапе дизайна праймеров может быть легко достигнуто [Гарафутдинов и др. (Garafutdinov et al.), 2019].

Проведенный *in silico* анализ полных геномов волка и пяти пород собак – лабрадор-ретривер, немецкий дог, басенджи, немецкая овчарка, боксер привели к образованию в среднем около 50 ампликонов для каждого образца и поскольку часть из них совпали по размеру, то в общей сложности оказалось 77 разного размера ампликонов. Вычисленные размеры ампликонов позволили с помощью программы ABCDNA_GS построить генетические штрих-коды волка и собак, приведенные на рисунке. Можно отметить довольно высокую гомологию собачьих геномов и генома волка, что, впрочем, неудивительно, поскольку, по сути, это один и тот же биологический (зоологический) вид, хотя как уже говорилось в других наших статьях [Гиниятов и

др., Giniyatov et al.), 2021; Чемерис и др. (Chemeris et al.), 2021] еще далеко не все ясно с происхождением и одомашниванием собак. Красным цветом на рисунке выделены те ампликоны, которые встречаются у всех исследованных образцов собак и волка. Некие уникальные ампликоны можно считать, что имеют условно видоспецифичный характер. При межпородном сравнении ситуация становится немного иной и в таблице приведены разным цветом различающиеся ампликоны. Так, у волка обнаружилось шесть ампликонов, не совпадающих по размеру с ампликонами собак. Также шесть ампликонов, не встречающихся ни у волка, ни у остальных пород, выявилось у лабрадора. Четыре подобных ампликона характерны для немецкого дога, тогда как у остальных пород таковых меньше – по два и три.

Таблица

Характерные для волка и ряда пород собак ампликоны, генерируемые в RAPD-анализе *in silico* с использованием мультиплексного набора из шести декамерных праймеров
 Table – Generated in *in silico* RAPD analysis using a multiplex set of six decamer primers specific
 Generated in *in silico* RAPD analysis using a multiplex set of six decamer primers specific amplicons
 for the wolf and a few dog breeds amplicons for the wolf and a few dog breeds

Виды / Породы <i>Species / Breeds</i>	Ампликоны (п.н.) / Amplicons (bp)	Число ампликонов Number of amplicons	Уникальные ампликоны Unique amplicons
<i>Canis lupus lupus</i> волк серый	76, 95, 97, 211, 224, 286, 296, 382, 390, 419, 421, 430, 446, 467, 470, 471, 472, 492	18	6
<i>C.l.familiaris</i> Лабрадор ретривер	93, 159, 188, 217, 297, 308, 318, 390, 419, 424, 446, 463, 464, 467, 468, 471, 477, 492	18	6
<i>C.l.familiaris</i> немецкий дог	76, 93, 159, 188, 213, 296, 318, 382, 389, 423, 424, 433, 461, 467, 472, 491	16	4
<i>C.l.familiaris</i> басенджи	76, 93, 135, 154, 159, 188, 211, 296, 347, 390, 423, 424, 446, 459, 466, 477, 492	17	2
<i>C.l.familiaris</i> немецкая овчарка	76, 93, 154, 159, 188, 213, 296, 313, 318, 382, 390, 419, 424, 441, 446, 466, 467, 470, 472, 492	20	2
<i>C.l.familiaris</i> боксер	76, 93, 135, 154, 159, 188, 213, 222, 296, 318, 382, 390, 419, 424, 439, 446, 467, 470, 472, 475, 492	21	3

- ампликоны, специфичные (уникальные) для волка и каждой породы собак
- ампликоны, специфичные для всех пород собак
- ампликоны, специфичные для четырех из пяти пород собак
- ампликоны, специфичные для трех из пяти пород собак
- ампликоны, специфичные для двух из пяти пород собак

Вид, порода <i>Species, breed</i>	Ампликоны (п.н.) / Amplicons (bp)	Генетические штрих-коды / Genetical bar-codes
<i>Canis lupus</i> волк серый	54, 57, 60, 67, 76, 95, 97, 125, 149, 154, 157, 162, 187, 188, 211, 224, 262, 286, 287, 289, 292, 293, 296, 302, 312, 315, 326, 327, 329, 351, 357, 381, 382, 384, 387, 390, 393, 397, 401, 419, 421, 427, 430, 431, 446, 454, 467, 470, 471, 472, 492	
<i>C. familiaris</i> Лабрадор ретривер	54, 57, 60, 67, 93, 125, 149, 154, 157, 159, 162, 187, 188, 217, 262, 287, 289, 292, 293, 297, 302, 308, 312, 315, 318, 326, 327, 329, 351, 357, 381, 384, 387, 390, 393, 397, 401, 419, 424, 427, 431, 446, 454, 463, 464, 467, 468, 471, 477, 492	
<i>C. familiaris</i> немецкий дог	54, 57, 60, 67, 76, 93, 125, 149, 154, 157, 159, 162, 187, 188, 213, 262, 287, 289, 292, 293, 296, 302, 312, 315, 318, 326, 327, 329, 351, 357, 381, 382, 384, 387, 389, 393, 397, 401, 423, 424, 427, 431, 433, 454, 461, 467, 472, 491	
<i>C. familiaris</i> басенджи	54, 57, 60, 67, 76, 93, 125, 135, 149, 154, 157, 159, 162, 187, 188, 211, 262, 287, 289, 292, 293, 296, 302, 312, 315, 326, 327, 329, 347, 351, 357, 381, 384, 387, 390, 393, 397, 401, 423, 424, 427, 431, 446, 454, 459, 466, 477, 492	
<i>C. familiaris</i> немецкая овчарка	54, 57, 60, 67, 76, 93, 125, 149, 154, 157, 159, 162, 187, 188, 213, 262, 287, 289, 292, 293, 296, 302, 312, 313, 315, 318, 326, 327, 329, 351, 357, 381, 382, 384, 387, 390, 393, 397, 401, 419, 424, 427, 431, 441, 446, 454, 466, 467, 470, 472, 492	
<i>C. familiaris</i> боксер	54, 57, 60, 67, 76, 93, 125, 135, 149, 154, 157, 159, 162, 187, 188, 213, 222, 262, 287, 289, 292, 293, 296, 302, 312, 315, 318, 326, 327, 329, 351, 357, 381, 382, 384, 387, 390, 393, 397, 401, 419, 424, 427, 431, 439, 446, 454, 467, 470, 472, 475, 492	

Рис. Генетические штрих-коды ядерных геномов волка и собак, генерированные *in silico* при виртуальном использовании мультиплексного набора из шести декамерных праймеров. Красным цветом приведены ампликоны, характерные для всех изученных геномов волка и собак

Fig. Genetic barcodes of wolf and canine nuclear genomes generated *in silico* with virtual use of a multiplex set of six decamer primers.

The specific amplicons for all studied wolf and dog genomes are shown in red

Проведенный *in silico* RAPD-анализ геномов волка и пяти пород собак показал в целом их довольно высокое совпадение и позволил оценить пригодность подобранных праймеров для проведения «мокрых» экспериментов, из чего можно сделать вывод, что мультиплекс из шести декамерных праймеров все же недостаточен для паспортизации пород и тем более для ДНК-идентификации отдельных особей собак, не говоря уже об использовании одиночных праймеров, приводящих к наработке в ПЦР совсем небольшого числа ампликонов, что следует из результатов проведенного нами *in silico* RAPD-анализа по отдельным праймерам (данные не приведены). Фактически, если отбросить из анализа ампликоны, консервативные для всех исследованных образцов разных пород собак, то переменных, которые мы обозначили в таблице как уникальные ампликоны, будет всего 17. С помощью приведенной выше формулы подсчета числа комбинаций для этого количества фрагментов ДНК можно ожидать величин больше нониллиона (10^{11}), что на первый взгляд очень даже немало, но с учетом довольно высокой консервативности геномов собак, что можно видеть в том числе и из построенных генетических штрих-кодов (рис.), мультиплекс должен формироваться, по крайней мере из 9-10 праймеров, что впрочем не составляет большой проблемы для мокрых экспериментов, если на этапе дизайна праймеров полностью исключить образование из них возможных гомо- и гетеродимеров.

Если исключить после проведенного нами *in silico* RAPD-анализа из дальнейшего анализа те ампликоны, которые имеются у всех собак, а также у служащего в этом случае некоей «внешней группой» волка (31 ампликон), оставив только значимые, т.е. встречающиеся у одного или нескольких образцов (не у всех), то таковых останется 110 ампликонов, по которым может выстраиваться родство данных пород собак. Однако если таких ампликонов будет больше за счет увеличения мультиплексности виртуальной ПЦР (что, впрочем, не составляет особых проблем), то построенные филогенетические древа будут еще точнее. Важным преимуществом данного подхода к установлению родства перед обычно используемым в таких случаях сравнением нуклеотидных последовательностей отдельных генов служит то, что здесь фактически охватывается весь геном, поскольку подобная виртуальная ПЦР будет «амплифицировать» участки практически из всех хромосом одновременно.

Заключение

Как можно видеть из изложенного выше материала, RAPD-анализ геномов собак применялся на ранних стадиях изучения полиморфизма ДНК этих объектов. Однако знания полных геномов разных

пород собак и новые технологические возможности позволяют использовать этот метод более осознанно, чему способствует предварительный *in silico* анализ геномов исследуемых организмов, фактически являющий собой виртуальную ПЦР амплификацию. Более того, оставляя для построения генетических штрих-кодов только значимые фрагменты ДНК или, иначе говоря, удаляя из анализа общие для всех, можно увеличивать мультиплексность виртуальной ПЦР в значительной степени, находя большее количество значимых для установления близкородственных и эволюционных связей виртуальных ампликонов, на основе которых построенные филогенетические древа будут точнее отражать близость одних объектов и удаленность других.

Фактически *in silico* RAPD-анализ является мощным инструментом предварительного исследования геномов любых организмов в виде полиморфизмов ДНК, которые намечается выявить быстрым и относительно недорогим методом, а с другой стороны этот подход, используя созданную нами программу ABCDNA_GS, может служить удобным и быстрым способом определения филогенетического родства исследуемых групп организмов, чьи геномы полностью секвенированы, включая даже их черновые варианты с протяженными контигами. Особенно информативен такой подход может быть для геномов с высокой коллинеарностью, что как раз свойственно собакам, точнее разным их породам. Хотя следует признать, что квазигапloidный характер подавляющего большинства секвенированных геномов высших организмов (вопрос о чем мы поднимали ранее в связи с юбилейной датой – столетием термина «геном», предложенного Н.Winkler в 1920 г. [Кулуев и др. (Kuluev et al.), 2020]), приведет к тому, что виртуальная ПЦР некоего полного известного генома не будет соответствовать в полной мере реальной в «мокром» эксперименте, будь он проведен даже максимально точно. Тем не менее, подобное *in silico* сравнение квазигапloidных геномов может иметь место. Впрочем, вероятно следует уменьшить размер искомым ампликонов до 120 нуклеотидов, что в большей степени будет соответствовать реальной ситуации при использовании при сборке геномов высокоточного флуоресцентного секвенирования на платформе Illumina, хотя нельзя исключать, что соседние места отжиг праймеров будут приходиться на соседние ряды, которые могут быть из разных парных хромосом.

Определенным недостатком экспериментального RAPD-анализа служит то, что в нем необходимо использовать только чистые образцы ДНК без примеси чужеродной ДНК (либо с очень крохотным

ее количеством), поскольку декамерные праймеры с произвольными последовательностями теоретически могут найти себе комплементарные участки на геномах других организмов, приведя в ПЦР к наработке неспецифичных (не имеющих к геному собак отношения) ампликонов. В этой связи для рассмотренной нами ситуации [Гарафутдинов и др. (Garafutdinov et al.), 2021], когда, например, по собачьим фекалиям можно установить (для разных целей) конкретную собаку, пользуясь специфичными праймерами, RAPD-анализ, к сожалению, непригоден, поскольку в экскрементах обязательно будет присутствовать ДНК, как большого числа бактерий, так и сохранившаяся ДНК из пищи.

Литература

1. Гарафутдинов Р.Р., Баймиев Ан.Х., Малеев Г.В., Алексеев Я.И., Зубов В.В., Чемерис Д.А., Кирьянова О.Ю., Губайдуллин И.М., Матниязов Р.Т., Сахабутдинова А.Р., Никоноров Ю.М., Кулуев Б.Р., Баймиев Ал.Х., Чемерис А.В. Разнообразие праймеров для ПЦР и принципы их подбора. *Биомика*. 2019. Т.11(1). С. 23–70. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2019-04
2. Гарафутдинов Р.Р., Гайнуллина К.П., Кирьянова О.Ю., Юрина А.В., Долматова И.Ю., Логинов О.Н., Чемерис А.В. Полиморфизм ДНК лошади *Equus caballus* и методы его выявления // *Биомика*. 2020. Т.12(2). С. 272-299. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2020-16
3. Гарафутдинов Р.Р., Чемерис Д.А., Сахабутдинова А.Р., Алексеев Я.И., Геращенко Г.А., Гиниятов Ю.Р., Аминев Ф.Г., Чемерис А.В. Полиморфизм ДНК собак (*Canis familiaris* L.). III. VNTR- и STR-локусы. Их применение в собаководстве и криминалистике // *Biomics*. 2021. Т.13(3). С.321-346. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2021-23
4. Гиниятов Ю.Р., Чемерис Д.А., Яхин О.И., Гарафутдинов Р.Р., Чемерис А.В. Прасобаки, собаки и их будущее // *Biomics*. 2021. Т.13(3). С. 288-297. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2021-20
5. Кирьянова О.Ю., Кирьянов И.И., Кулуев Б.Р., Чемерис А.В., Гарафутдинов Р.Р., Губайдуллин И.М. Свидетельство о государственной регистрации программы для ЭВМ № 2020610703 ABCDNA_GS (Amplified Bar-Coded DNA Genome/Specimen) от 17.01.2020 г.
6. Кирьянова О.Ю., Кулуев Б.Р., Кулуев А.Р., Губайдуллин И.М., Чемерис А.В. Мультиплексный *in silico* RAPD-анализ ряда родственных растений с отличающимися размерами геномов и перспективы такого подхода для ДНК-паспортизации сортов сельскохозяйственных растений // *Биомика*. 2020. Т.12. №2. С. 194-210. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2020-10
7. Кулуев Б.Р., Баймиев Ан.Х., Геращенко Г.А., Чемерис Д.А., Зубов В.В., Кулуев А.Р., Баймиев Ал.Х., Чемерис А.В. Методы ПЦР для выявления мультилокусного полиморфизма ДНК у эукариот, основанные на случайном праймировании // *Генетика*. 2018. Т.54. С.495-511. DOI: 10.7868/S0016675818050016
8. Кулуев Б.Р., Баймиев Ан.Х., Геращенко Г.А., Юнусбаев У.Б., Гарафутдинов Р.Р., Алексеев Я.И., Баймиев Ал.Х., Чемерис А.В. Сто лет гаплоидным геномам. Сейчас наступает время диплоидных // *Биомика*. 2020. Т.12(4). С. 411-434. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2020-33
9. Чемерис Д.А., Гиниятов Ю.Р., Гарафутдинов Р.Р., Чемерис А.В. Полиморфизм ДНК собак (*Canis familiaris* L.). I. Происхождение, распространение собак в свете молекулярно-биологических данных об их митохондриальных и ядерных геномах // *Biomics*. 2021. Т.13(3). С.298-308. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2021-21
10. Corley-Smith G.E., Lim C.J., Kalmar G.B., Brandhorst B.P. Efficient detection of DNA polymorphisms by fluorescent RAPD analysis. *Biotechniques*. 1997. V. 22. P. 690-699. doi: 10.2144/97224st04
11. Ezer AD, Williams RW, Goldowitz D. Arbitrary primer PCR of dog DNA with estimates of average heterozygosity // *J. Hered.* 1996. V.87(6). P.450-455. doi: 10.1093/oxfordjournals.jhered.a023036
12. Gu W, Acland GM, Langston AA, Ostrander EA, Aguirre GD, Ray K. Identification of a RAPD marker linked to progressive rod-cone degeneration in dogs // *Mamm. Genome*. 1998. V.9(9). P.740-744. doi: 10.1007/s003359900855
13. Gu W, Post CM, Aguirre GD, Ray K. Individual DNA bands obtained by RAPD analysis of canine genomic DNA often contain multiple DNA sequences // *J. Hered.* 1999. V.90(1). P.96-98. doi: 10.1093/jhered/90.1.96
14. Lee JC, Chang JG. Random amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction (RAPD PCR) fingerprints in forensic species identification // *Forensic Sci. Int.* 1994. V.67(2). P.103-107. doi: 10.1016/0379-0738(94)90325-5
15. Lindblad-Toh K, Wade CM, Mikkelsen TS, Karlsson EK, Jaffe DB, Kamal M, Clamp M, Chang JL, Kulbokas EJ 3rd, Zody MC, Mauceli E, Xie X, Breen M, Wayne RK, Ostrander EA, Ponting CP, Galibert F, Smith DR, DeJong PJ, Kirkness E, Alvarez P, Biagi T, Brockman W, Butler J, Chin CW, Cook A, Cuff J, Daly MJ, DeCaprio D, Gnerre S, Grabherr M, Kellis M, Kleber M, Bardeleben C, Goodstadt L, Heger A, Hitte C, Kim L, Koepfli KP, Parker HG, Pollinger JP, Searle SM, Sutter NB, Thomas R, Webber C, Baldwin J, Abebe A,

- Abouelleil A, Aftuck L, Ait-Zahra M, Aldredge T, Allen N, An P, Anderson S, Antoine C, Arachchi H, Aslam A, Ayotte L, Bachantsang P, Barry A, Bayul T, Benamara M, Berlin A, Bessette D, Blishteyn B, Bloom T, Blye J, Boguslavskiy L, Bonnet C, Boukhgalter B, Brown A, Cahill P, Calixte N, Camarata J, Cheshatsang Y, Chu J, Citroen M, Collymore A, Cooke P, Dawoe T, Daza R, Decktor K, DeGray S, Dhargay N, Dooley K, Dooley K, Dorje P, Dorjee K, Dorris L, Duffey N, Dupes A, Egbiremolen O, Elong R, Falk J, Farina A, Faro S, Ferguson D, Ferreira P, Fisher S, FitzGerald M, Foley K, Foley C, Franke A, Friedrich D, Gage D, Garber M, Gearin G, Giannoukos G, Goode T, Goyette A, Graham J, Grandbois E, Gyaltzen K, Hafez N, Hagopian D, Hagos B, Hall J, Healy C, Hegarty R, Honan T, Horn A, Houde N, Hughes L, Hunnicutt L, Husby M, Jester B, Jones C, Kamat A, Kanga B, Kells C, Khazanovich D, Kieu AC, Kisner P, Kumar M, Lance K, Landers T, Lara M, Lee W, Leger JP, Lennon N, Leuper L, LeVine S, Liu J, Liu X, Lokyitsang Y, Lokyitsang T, Lui A, Macdonald J, Major J, Marabella R, Maru K, Matthews C, McDonough S, Mehta T, Meldrim J, Melnikov A, Meneus L, Mihalev A, Mihova T, Miller K, Mittelman R, Mlenga V, Mulrain L, Munson G, Navidi A, Naylor J, Nguyen T, Nguyen N, Nguyen C, Nguyen T, Nicol R, Norbu N, Norbu C, Novod N, Nyima T, Olandt P, O'Neill B, O'Neill K, Osman S, Oyono L, Patti C, Perrin D, Phunkhang P, Pierre F, Priest M, Rachupka A, Raghuraman S, Rameau R, Ray V, Raymond C, Rege F, Rise C, Rogers J, Rogov P, Sahalie J, Settipalli S, Sharpe T, Shea T, Sheehan M, Sherpa N, Shi J, Shih D, Sloan J, Smith C, Sparrow T, Stalker J, Stange-Thomann N, Stavropoulos S, Stone C, Stone S, Sykes S, Tchuinga P, Tenzing P, Tesfaye S, Thoulutsang D, Thoulutsang Y, Topham K, Topping I, Tsamla T, Vassiliev H, Venkataraman V, Vo A, Wangchuk T, Wangdi T, Weiland M, Wilkinson J, Wilson A, Yadav S, Yang S, Yang X, Young G, Yu Q, Zainoun J, Zembek L, Zimmer A, Lander ES. Genome sequence, comparative analysis and haplotype structure of the domestic dog // *Nature*. 2005. V.438(7069). P.803-819. doi: 10.1038/nature04338
16. Olivier M, Lust G. Two DNA sequences specific for the canine Y chromosome // *Anim. Genet.* 1998. V.29(2). P.146-149. doi: 10.1046/j.1365-2052.1998.00299.x
17. Olivier M, Meehl MA, Lust G. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) sequences as markers for canine genetic studies // *J. Hered.* 1999. V.90(1). P.78-82. doi: 10.1093/jhered/90.1.78
18. Rothuizen J, Van Wolferen M. Randomly amplified DNA polymorphisms in dogs are reproducible and display Mendelian transmission // *Anim. Genet.* 1994. V.25(1). P.13-18.
19. Semenova SK, Illarionova NA, Vasil'ev VA, Shubkina AV, Ryskov AP. Genetic analysis and estimation of genetic diversity in east-European breeds of swift hounds (*Canis familiaris* L.) based on the data of genomic studies using RAPD markers // *Russian J. Genetics*. 2002. V.38(6). P.842-852
20. Stepniak E, Zagalska MM, Switoński M. Use of RAPD technique in evolution studies of four species in the family Canidae // *J. Appl. Genet.* 2002. V.43(4). P.489-499.
21. Wang X., Miller A.B., Lepine A.J., Scott J.D., Murphy K.E. Analysis of randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) for identifying genetic markers associated with canine hip dysplasia // *J. Hered.* 1999. V.90(1). P.99-103. doi: 10.1093/jhered/90.1.99
22. Welsh J, McClelland M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers // *Nucleic Acids Res.* 1990. V.18(24). P.7213-7218. doi: 10.1093/nar/18.24.7213
23. Williams J.G., Kubelik A.R., Livak K.J., Rafalski J.A., Tingey S.V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers // *Nucleic Acids Res.* 1990. V. 18. P. 6531-6535. doi: 10.1093/nar/18.22.6531

References

1. Chemeris D.A., Giniyatov Yu.R., Garafutdinov R.R., Chemeris A.V. DNA polymorphism of dogs (*Canis familiaris* L.). I. Origin, distribution of dogs in the light of molecular biological data about their mitochondrial and nuclear genomes. *Biomics*. 2021. V.13(3). P. 298-308. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2021-21(In Russian)
2. Corley-Smith G.E., Lim C.J., Kalmar G.B., Brandhorst B.P. Efficient detection of DNA polymorphisms by fluorescent RAPD analysis. *Biotechniques*. 1997. V. 22. P. 690-699. doi: 10.2144/97224st04
3. Ezer AD, Williams RW, Goldowitz D. Arbitrary primer PCR of dog DNA with estimates of average heterozygosity. *J. Hered.* 1996. V.87(6). P.450-455. doi: 10.1093/oxfordjournals.jhered.a023036
4. Garafutdinov R.R., Baymiev An.Kh., Maleev G.V., Alexeyev Ya.I., Zubov V.V., Chemeris D.A., Kiryanova J.Yu., Gubaydullin I.M., Matniyazov R.T., Sakhabutdinova A.R., Nikonorov Yu.M., Kuluev B.R., Baymiev Al.Kh., Chemeris A.V. Diversity of PCR primers and principles of their design. *Biomics*. 2019. V.11(1). P. 23 -70. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2019-04
5. Garafutdinov R.R., Chemeris D.A., Sakhabutdinova A.R., Alexeev Ya.I., Gerashchenkov G.A., Giniyatov Y.R., Aminev F.G., Chemeris A.V. DNA polymorphism of dogs (*Canis familiaris* L.). III. VNTR- and STR-loci. Their use in dog breeding and in criminalistics. *Biomics*. 2021. V.13(3). P.321-346. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2021-23(In Russian)

6. Garafutdinov R.R., Gainullina K.P., Kiryanova O.Yu., Yurina A.V., Dolmatova I.Yu., Loginov O.N., Chemeris A.V. DNA polymorphism of horse *Equus caballus* and methods of its detection. *Biomics*. 2020. V. 12(2). P. 272-299. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2020-16 (In Russian)
7. Giniyatov Yu.R., Chemeris D.A., Yakhin O.I., Garafutdinov R.R., Chemeris A.V. Ancient dogs, dogs and their future. *Biomics*. 2021. V.13(3). P.288-297. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2021-20 (In Russian)
8. Gu W, Acland GM, Langston AA, Ostrander EA, Aguirre GD, Ray K. Identification of a RAPD marker linked to progressive rod-cone degeneration in dogs. *Mamm. Genome*. 1998. V.9(9). P.740-744. doi: 10.1007/s003359900855
9. Gu W, Post CM, Aguirre GD, Ray K. Individual DNA bands obtained by RAPD analysis of canine genomic DNA often contain multiple DNA sequences. *J. Hered.* 1999. V.90(1). P.96-98. doi: 10.1093/jhered/90.1.96
10. Kiryanova O. Yu., Kiryanov I. I., Kuluyev B. R., Chemeris A.V., Garafutdinov R. R., Gubaidullin I. M. Certificate of state registration of computer program no. 2020610703 ABCDNA_GS (Amplified Bar-Coded DNA Genome/Specimen) dated 17.01.2020
11. Kiryanova O.Yu., Kuluev B.R., Kuluev A.R., Mardanshin I.S., Gubaydullin I.M., Chemeris A.V. Multiplex *in silico* RAPD-analysis of several related plants with different genome sizes and prospects for this approach for DNA-cataloguing of agricultural plant varieties. *Biomics*. 2020a. V.12(2). P. 194-210. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2020-10 (In Russian)
12. Kuluev B.R., Baymiev An.K., Gerashchenkov G.A., Chemeris D.A., Zubov V.V., Kuluev A.R., Baymiev Al.Kh., Chemeris A.V. Random priming PCR strategies for identification of multilocus DNA polymorphism in eukaryotes. *Russian Journal of Genetics*. 2018. V. 54(5). P. 499-513. DOI: 10.1134/S102279541805006X
13. Kuluev B.R., Baymiev An.Kh., Gerashchenkov G.A., Yunusbaev U.B., Garafutdinov R.R., Alekseev Ya.I., Baymiev Al.Kh., Chemeris A.V. One hundred years of haploid genomes. Now time comes for diploid genomes. *Biomics*. 2020. V. 12(4). P. 411-434. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2020-33 (In Russian)
14. Lee JC, Chang JG. Random amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction (RAPD PCR) fingerprints in forensic species identification. *Forensic Sci. Int.* 1994. V.67(2). P.103-107. doi: 10.1016/0379-0738(94)90325-5
15. Lindblad-Toh K, Wade CM, Mikkelsen TS, Karlsson EK, Jaffe DB, Kamal M, Clamp M, Chang JL, Kulbokas EJ 3rd, Zody MC, Mauceli E, Xie X, Breen M, Wayne RK, Ostrander EA, Ponting CP, Galibert F, Smith DR, DeJong PJ, Kirkness E, Alvarez P, Biagi T, Brockman W, Butler J, Chin CW, Cook A, Cuff J, Daly MJ, DeCaprio D, Gnerre S, Grabherr M, Kellis M, Kleber M, Bardeleben C, Goodstadt L, Heger A, Hitte C, Kim L, Koepfli KP, Parker HG, Pollinger JP, Searle SM, Sutter NB, Thomas R, Webber C, Baldwin J, Abebe A, Abouelleil A, Aftuck L, Ait-Zahra M, Aldredge T, Allen N, An P, Anderson S, Antoine C, Arachchi H, Aslam A, Ayotte L, Bachantsang P, Barry A, Bayul T, Benamara M, Berlin A, Bessette D, Blitshteyn B, Bloom T, Blye J, Boguslavskiy L, Bonnet C, Boukhgalter B, Brown A, Cahill P, Calixte N, Camarata J, Cheshatsang Y, Chu J, Citroen M, Collymore A, Cooke P, Dawoe T, Daza R, Decktor K, DeGray S, Dhargay N, Dooley K, Dooley K, Dorje P, Dorjee K, Dorris L, Duffey N, Dupes A, Egbiremolen O, Elong R, Falk J, Farina A, Faro S, Ferguson D, Ferreira P, Fisher S, FitzGerald M, Foley K, Foley C, Franke A, Friedrich D, Gage D, Garber M, Gearin G, Giannoukos G, Goode T, Goyette A, Graham J, Grandbois E, Gyaltzen K, Hafez N, Hagopian D, Hagos B, Hall J, Healy C, Hegarty R, Honan T, Horn A, Houde N, Hughes L, Hunnicutt L, Husby M, Jester B, Jones C, Kamat A, Kanga B, Kells C, Khazanovich D, Kieu AC, Kisner P, Kumar M, Lance K, Landers T, Lara M, Lee W, Leger JP, Lennon N, Leuper L, LeVine S, Liu J, Liu X, Lokyitsang Y, Lokyitsang T, Lui A, Macdonald J, Major J, Marabella R, Maru K, Matthews C, McDonough S, Mehta T, Meldrim J, Melnikov A, Meneus L, Mihalev A, Mihova T, Miller K, Mittelman R, Mlenga V, Mulrain L, Munson G, Navidi A, Naylor J, Nguyen T, Nguyen N, Nguyen C, Nguyen T, Nicol R, Norbu N, Norbu C, Novod N, Nyima T, Olandt P, O'Neill B, O'Neill K, Osman S, Oyono L, Patti C, Perrin D, Phunkhang P, Pierre F, Priest M, Rachupka A, Raghuraman S, Rameau R, Ray V, Raymond C, Rege F, Rise C, Rogers J, Rogov P, Sahalie J, Settipalli S, Sharpe T, Shea T, Sheehan M, Sherpa N, Shi J, Shih D, Sloan J, Smith C, Sparrow T, Stalker J, Stange-Thomann N, Stavropoulos S, Stone C, Stone S, Sykes S, Tchinga P, Tenzing P, Tesfaye S, Thoulutsang D, Thoulutsang Y, Topham K, Topping I, Tsamla T, Vassiliev H, Venkataraman V, Vo A, Wangchuk T, Wangdi T, Weiland M, Wilkinson J, Wilson A, Yadav S, Yang S, Yang X, Young G, Yu Q, Zainoun J, Zembek L, Zimmer A, Lander ES. Genome sequence, comparative analysis and haplotype structure of the domestic dog. *Nature*. 2005. V.438(7069). P.803-819. doi: 10.1038/nature04338
16. Olivier M, Lust G. Two DNA sequences specific for the canine Y chromosome. *Anim. Genet.* 1998. V.29(2). P.146-149. doi: 10.1046/j.1365-2052.1998.00299.x
17. Olivier M, Meehl MA, Lust G. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) sequences as markers for canine genetic studies. *J. Hered.* 1999. V.90(1). P.78-82. doi: 10.1093/jhered/90.1.78
18. Rothuizen J, Van Wolferen M. Randomly amplified DNA polymorphisms in dogs are reproducible

- and display Mendelian transmission. *Anim. Genet.* 1994. V.25(1). P.13-18.
19. Semenova SK, Illarionova NA, Vasil'ev VA, Shubkina AV, Ryskov AP. Genetic analysis and estimation of genetic diversity in east-European breeds of swift hounds (*Canis familiaris* L.) based on the data of genomic studies using RAPD markers. *Russian J. Genetics.* 2002. V.38(6). P.842-852
20. Stepniak E, Zagalska MM, Switoński M. Use of RAPD technique in evolution studies of four species in the family Canidae. *J. Appl. Genet.* 2002. V.43(4). P.489-499.
21. Wang X., Miller A.B., Lepine A.J., Scott J.D., Murphy K.E. Analysis of randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) for identifying genetic markers associated with canine hip dysplasia. *J. Hered.* 1999. V.90(1). P.99-103. doi: 10.1093/jhered/90.1.99
22. Welsh J, McClelland M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Res.* 1990. V.18(24). P.7213-7218. doi: 10.1093/nar/18.24.7213
23. Williams J.G., Kubelik A.R., Livak K.J., Rafalski J.A., Tingey S.V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.* 1990. V. 18. P. 6531-6535. doi: 10.1093/nar/18.22.6531