

ČESKÁ ZEMĚDĚLSKÁ UNIVERZITA V PRAZE
Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů
Katedra genetiky a šlechtění



**Variabilita mikrosatelitních markerů gonozómu X u vybraných psích
plemen**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Vedoucí diplomové práce:

Autor:

doc. Dr. Ing. Pavel Vejl

Bc. Veronika Kadlecová

2010

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci na téma: „**Variabilita mikrosatelitních markerů gonozómu X u vybraných psích plemen**“ vypracovala samostatně a použila jen pramenů, které cituji a uvádím v přiložené bibliografii.

V Praze dne: 10.4.2010

Veronika Kadlecová

Poděkování

Velice ráda bych zde poděkovala všem, kteří přispěli k realizaci mé diplomové práce. Zejména pak vedoucímu diplomové práce doc. Dr. Ing. Pavlu Vejlovi a Ing. Daniele Čílové za odborné vedení při zpracování mé diplomové práce, za cenné rady a připomínky a za ochotu, s kterou toto vykonávali. Ing. Daniele Čílové bych také ráda poděkovala za odběr vzorků a poskytnutí fotografií československý vlčáků. Dále děkuji Dr. Ing. Naděždě Šebkové za pomoc při odběru vzorků německých ovčáků a Ing. Monice Soukupové za odběr vzorků Saarlosových vlčáků. Můj dík patří také Mgr. Martině Melounové, PhD. za pomoc s překladem mého Souhrnu a Ing. Jakobovi Vaškovi za pomoc při zpracování výsledků. Řešení diplomové práce bylo podpořeno Výzkumným záměrem FAPPZ ČZU v Praze MSM 6046070901 a grantovým projektem GA FAPPZ ČZU v Praze 1312/3133.

SOUHRN

Křížení stojí na počátku vzniku všech plemen. Stejně tak na počátku všech psích plemen stojí vlk. Plemena československý a Saarloosův vlčák jsou odvozená ze záměrného křížení právě vlka se psem - německým ovčákem. Z hlediska genetického výzkumu variability vlčích kříženců jsou tedy příhodným materiálem pro studium. Pro sledování míry genetické příbuznosti a variability uvnitř i mezi plemeny jsou vhodnými markery vybrané lokusy gonozómu X, protože při zrodu těchto plemen byli použiti samčí i samičí vlčí jedinci. Na základě tří vybraných mikrosatelitních markerů (FH2548, FH2584 a FH2985), použitých k podobným účelům v rámci projektu Dog Genome Project a v řadě dalších studií, byla provedena charakterizace plemen z hlediska polymorfismů alel těchto SSR lokusů, statistická analýza variability alel mezi plemeny, vyhodnocení úrovně příbuzenské plemenitby v rámci plemene československý vlčák a posouzení stupně heterozygotnosti populace.

Při řešení diplomové práce byla úspěšně optimalizována metoda odběru a izolace DNA, amplifikace SSR lokusů FH2548, FH2584 a FH2985 a výběr vhodné metody pro identifikaci polymorfismu těchto lokusů.

Statistickými analýzami byly stanoveny rozdíly ve variabilitě a distribuci alel všech tří hodnocených mikrosatelitních lokusů mezi vybranými plemeny. Pomocí shlukové analýzy, Rogersova koeficientu genetické vzdálenosti a na základě neparametrického χ^2 testu byla potvrzena vyšší míra příbuznosti mezi plemeny československý vlčák a německý ovčák a to u obou pohlaví. Byly zjištěny statisticky významné rozdíly mezi skupinami psů s extrémními hodnotami koeficientu inbreedingu na základě hodnocení závislosti distribuce alel na hodnotě koeficientu inbreedingu neparametrickým χ^2 testem. Mezi skupinami zvířat rozdělenými podle pohlaví a koeficientu inbreedingu, rozdíly v distribuci alel zjištěny nebyly.

Klíčová slova: vlk (*Canis lupus*), československý vlčák, německý ovčák, Saarloosův vlčák, SSR markery gonozómu X, polymorfismus, koeficient inbreedingu, Rogersův koeficient genetické vzdálenosti

SUMMARY

The hybridization represents the origin of all breeds in the beginning. A wolf genome played a key role in the origin of dog's breeds. The Czechoslovakian Wolfdog and The Saarloos Wolfdog breeds are derived from deliberate hybridization between the wolf and The German Shepherd. These breeds are useful for studies in terms of genetic research of wolf's hybrids variability. Because of the fact that male and female wolf individuals were involved in the genesis of these breeds, chosen loci of X gonosome were used as appropriate markers for monitoring the level of inbreeding and genetic variability between and within studied breeds. Studied breeds were analyzed by using three selected SSR markers (FH2548, FH2584 and FH2985) which were used for similar analyses during The Dog Genome Project and several other studies. The characterization of breeds (according to polymorphism of alleles of these SSR markers) was based on the selected SSR markers, as well as on the statistical analyses of variability of these alleles between breeds, the level of inbreeding inside group of the Czechoslovakian Wolfdog and level of heterozygosity of this population.

This thesis successfully optimized the sampling and DNA isolation, the amplification of SSR loci FH2548, FH2584 and FH2985, and the selection of appropriate methods for the identifying these loci polymorphism.

The differences in the variability and the distribution of alleles of three assessed microsatellite loci between the selected breeds were determined by using statistical analyses. A higher degree of relationship between breeds of the Czechoslovakian Wolfdog and the German Shepherd was confirmed in both sexes by using cluster analysis, Rogers' coefficient of genetic distance and nonparametric χ^2 test. Significant differences among dogs groups with extreme levels of inbreeding coefficient were detected according to results of nonparametric χ^2 test. Differences of alleles distribution were not found between groups of animals which were created according to sex and inbreeding coefficient.

Key words: wolf (*Canis lupus*), The Czechoslovakian Wolfdog, The German Shepherd, Saarloos Wolfdog, SSR markers X-chromosome loci, polymorphism, coefficient of inbreeding, Rogers coefficient of genetic distance

OBSAH

1.	ÚVOD	1
2.	CÍL PRÁCE	3
3.	LITERÁRNÍ REŠERŽE	5
3.1.	Vývoj psovitých	5
3.2.	Vlk obecný (<i>Canis lupus</i>).....	6
3.2.1.	Taxonomické zařazení v zoologickém systému.....	6
3.2.2.	Rozšíření vlků	6
3.2.3.	Charakteristika druhu	7
3.3.	Škal obecný (<i>Canis aureus</i>)	9
3.3.1.	Charakteristika druhu	9
3.4.	Pes domácí (<i>Canis lupus familiaris</i>)	10
3.4.1.	Taxonomické zařazení	10
3.4.2.	Původ Psa domácího	10
3.4.3.	Domestikace psa.....	10
3.4.4.	Původ plemen.....	12
3.4.5.	Křížení psa (<i>Canis familiaris</i>) a vlka (<i>Canis lupus</i>).....	12
3.4.6.	Variabilita populace vlka a psa z pohledu molekulární biologie	14
3.4.7.	Rozdíly mezi vlkem a psem	14
3.5.	Československý vlčák	15
3.5.1.	Historie plemene	15
3.5.2.	Standard plemene	17
3.6.	Německý ovčák	18
3.6.1.	Charakteristika plemene	18
3.6.2.	Historie chovu	18
3.7.	Saarloosův vlčák	19
3.7.1.	Charakteristika plemene	19
3.7.2.	Historie Chovu	20
3.8.	Metody plemenitby	20
3.8.1.	Metoda příbuzenské plemenitby	20
3.9.	DNA markery	21
3.9.1.	Repetitivní sekvence DNA.....	22
3.9.2.	Použití markerů DNA	24
3.10.	Genetická variabilita mikrosatelitních lokusů gonozómu X.....	25
3.11.	Metody analýzy DNA	27
3.11.1.	PCR (Polymerase chain reaction)	27
3.11.2.	Elektroforéza	29
4.	MATERIÁL A METODY	31
4.1.	Hodnocené genotypy.....	31
4.2.	Izolace DNA.....	31
4.3.	PCR amplifikace	31
4.4.	Agarózová elektroforéza	33
4.5.	Polyakrylamidová elektroforéza	35
4.6.	Stastické hodnocení výsledků	38
4.6.1.	Detekce alel mikrosatelitních markerů.....	38

4.6.2.	Stastické vyhodnocení v závislosti distribuce alel mikrosatelitních lokusů FH 2548, FH 2584 a FH 2985 na koeficientu imbreedingu hodnocených zvířat	38
5.	VÝSLEDKY	40
5.1	Detekce alel mikrosatelitních lokusů FH2548, FH2584 a FH2985	40
5.1.1	Detekce alel mikrosatelitních lokusů u fen	52
5.1.2	Detekce alel mikrosatelitních lokusů u psů.....	57
5.2.	Stastické vyhodnocení v závislosti distribuce alel mikrosatelitních lokusů FH2548, FH 2584 a FH 2985 na koeficientu imbreedingu hodnocených zvířat	60
5.2.1	Rozdělení zvířat do skupin podle hodnot koeficientu imbreedingu.....	60
5.2.2	Stanovení závislosti distribuce alel mikrosatelitních lokusů FH 2548, FH 2584 a FH 2985 na hodnotě Fx u všech zvířat bez ohledu na pohlaví	61
5.2.3	Stanovení závislosti distribuce alel mikrosatelitních lokusů FH 2548, FH 2584 a FH 2985 na hodnotě Fx u všech fen.....	63
5.2.4	Stanovení závislosti distribuce alel mikrosatelitních lokusů FH 2548, FH 2584 a FH 2985 na hodnotě Fx u všech psů	64
5.2.5	Stanovení závislosti distribuce alel mikrosatelitních lokusů FH 2548, FH 2584 a FH 2985 na hodnotě Fx u všech psů a fen	66
6.	DISKUZE.....	68
6.1.	Hodnocení populace, odběr vzorků a izolace DNA	68
6.2.	Detekce alel mikrosatelitních lokusů FH2548, FH2584 a FH2985	70
6.2.1.	Detekce alel mikrosatelitních lokusů u fen a psů.....	71
6.3.	Statistické vyhodnocení závislosti distribuce alel mikrosatelitních lokusů FH2548, FH2584 a FH2985 na koeficientu imbreedingu	74
6.3.1.	Statistická analýza vlivu koeficientu imbreedingu na distribuci alel u všech zvířat bez ohledu na jejich pohlaví.....	74
6.3.2.	Statistická analýza vlivu koeficientu imbreedingu na distribuci alel u zvířat rozdělených podle jejich pohlaví	75
6.3.3.	Statistická analýza vlivu koeficientu imbreedingu na distribuci alel u zvířat rozdělených podle pohlaví a hodnot Fx	76
6.3.4.	Posouzení meziplemné variability na základě mikrosatelitních lokusů FH2548, FH2584 a FH2985	76
7.	ZÁVĚR	78
8.	SEZNAM LITERATURY	80
9.	SAMOSTATNÉ PŘÍLOHY	

SEZNAM PŘÍLOH

- Příloha 1: Samec vlka obecného (*Canis lupus*)
- Příloha 2: Rozšíření vlka obecného ve světě v roce 2009
- Příloha 3: Vlčice se štěňaty
- Příloha 4: Vlk obecný (*Canis lupus*) – detail hlavy snadno zaměnitelný se psem
- Příloha 5: Rozšíření šakala obecného ve světě v roce 2009
- Příloha 6: Porovnání lebky vlka obecného a psa domácího
- Příloha 7: První křížení německého ovčáka s vlčicí
- Příloha 8: Původ plemene československý vlčák
- Příloha 9: Pes plemene československý vlčák
- Příloha 10: Fena plemene československý vlčák
- Příloha 11: Štěně plemene československý vlčák
- Příloha 12: Samec německého ovčáka
- Příloha 13: Šedé vlčí zbarvení německého ovčáka
- Příloha 14: Zástupce samčího pohlaví plemene Saarlosův vlčák

1. ÚVOD

Prvními z čeledi psovitých, doprovázející člověka, byli pravděpodobně vlci. Zpočátku se sami přibližovali k lidským obydlím, protože zde mohli nalézt lehce dostupnou potravu. Avšak postupem doby se vlk stal nedílnou součástí lidského společenství. Protože nebylo možné ochočit dospělé vlky, byla malá vlčata odebírána z vlčích nor. Tento fakt můžeme chápat jako počátek domestikace toho živočišného druhu. Postupem doby se předchůdci dnešních psích plemen stávali lidskými společníky, pomocníky při nahánění dobytka a ochránci lidských příbytků. Na základě těchto různých potřeb lidí začala vznikat první plemena, kde byl vlk prvním článkem.

Dnes vlci patří mezi ohrožená zvířata ale paradoxně psa domácího, jeho přímého potomka, je možné nalézt v téměř každé domácnosti.

Křížení stojí na počátku vývoje všech plemen. Vždyť například právě křížením karpatského vlka a německého ovčáka vznikl československý vlčák. I ve volné přírodě stále dochází ke křížení vlků a nedomestikovaných psů. Tento proces se stal předmětem mnoha studií a dovedl šlechtitele k myšlence záměrného křížení vlka se psy. Naproti tomu ve snaze udržení standardu je nezbytné pářit jedince v rámci jednoho plemene. Často dochází i k příbuzenské plemenitbě. A právě to má za následek inbreeding a zvyšování homozygotnosti plemene, která může vést k inbreední depresi a ke snižování celkové zdatnosti, odolnosti a fitness plemene.

Myšlenka na křížení vlka se psy měla původně pouze navrátit do vzniklé populace psů cenné geny a zvýšit heterozygotnost populace. S tím je spojeno zvyšování vitality, životaschopnosti a výkonnosti. Avšak mnoho odpůrců tvrdilo, že vlci a kříženci psa s vlkem nejsou domácí psi a využití vytoužených genů vlka pro „regeneraci“ psa domácího při zachování jeho vlastností osvědčených od pradávna není v současné době chovatelsky možné. Záznamů o takovém křížení bylo velmi málo a křížence popisovalo jako psy nespolehlivé až agresivní. Možná i z důvodu vyvrátit toto tvrzení byl v 50. letech dvacátého století v České republice zahájen pokus křížení vlčice a německých ovčáků chovatelské stanice Pohraniční stráže v Libějovicích.

Postupem času se během tohoto křížení začaly objevovat i snahy o vytvoření nového plemene odvozeného od vlka. V tehdejší Československé republice tak vzniklo plemeno český vlčák, dnes známé jako československý vlčák. Nezávisle na tomto křížení se podobný proces odehrával ve stejné době v Holandsku, za účelem vyšlechtit vodící psy pro nevidomé. Docházelo ke křížení sibiřských vlků s německým ovčákem. Jedinci vzniklí tímto křížením dali základ novému plemeni Saarloosův vlčák.

Obě tato plemena jsou tedy potomky vlků a jsou si exteriérově velmi podobná. Na základě toho není možné stanovit jejich míru příbuznosti pouze na základě fenotypových vlastností. V posledních letech se velmi rozšířilo pro tento druh výzkumu používání genetických markerů, které nepodléhají modifikačním vlivům vnějšího prostředí. Jedním z nich jsou mikrosatelitní markery.

Mikrosatelity jsou tandemově se opakující úseky DNA, kdy každý jedinec má dvě kopie mikrosatelitu (dvě alely). Jedna je zděděná po otci, jedna po matce. Velikost mikrosatelitu, čímž je myšlen počet opakování, je dědičná. Každý jedinec se odlišuje od ostatních v počtu opakování těchto repetitivních sekvencí a tato variabilita je jednoduše určitelná. Jednotlivé alely genomu, délka repetice, mohou být snadno zjišťovány pomocí amplifikace metodou PCR s použitím dvojice oligonukleotidových primerů ohraničujících mikrosatelitní lokus, a porovnávání délky ampliconů gelovou elektroforézou. Vyšetření založené na mikrosatelitech je relativně jednoduché a levné, a proto velmi populární.

Mikrosatelity se v posledních třiceti letech staly velmi často využívanými genetickými markery při studiu příbuzenských vztahů a populačně-genetické struktury volně žijících živočichů, při posouzení variability mezi plemeny mezi sebou, mezi plemeny a vlky či vlčími kříženci.

Pro detekci variability je možné použít materiálně (mitochondriální DNA), paternálně (Y chromozom) a bipaternálně zděděné markery (autonomy nebo mikrosatelity gonozómu X)

Cílem této práce bylo optimalizovat použití právě mikrosatelitních markerů lokalizovaných na gonozómu X, které se následně využily k hodnocení variability a stupně příbuznosti plemen odvozených od vlka, jako je československý vlčák a Saarloosův vlčák. Zároveň se posuzoval stupeň příbuznosti s německým ovčákem, který stál společně s vlkem u vzniku těchto plemen společně s vlkem.

2. CÍL PRÁCE

Cíle diplomové práce vycházejí z následujících vědeckých hypotéz:

1. Československý a Saarloosův vlčák představují plemena odvozená ze záměrného křížení mezi vlkem a psem. Z hlediska genetického výzkumu jsou vhodným modelem pro studium variability kříženců vlka a psa v domestikované formě. Obě plemena nepatří mezi široce rozšířená a proto lze hypoteticky předpokládat, že jejich genom může být ovlivněn inbreedingem.
2. Na vzniku obou plemen se kromě německého ovčáka podíleli samci i samice vlka obecného (*Canis lupus*). Gonozómy X u obou plemen tudíž mohou být psího i vlčího původu. Vyšlechtění československého a Saarloosova vlčáka na základě záměrného křížení vlka a německého ovčáka může teoreticky představovat rozšíření variability sekvencí DNA lokalizovaných na gonozómu X.
3. Mikrosatelitní markery charakterizují nekódující sekvence genomu a jejich polymorfismy jsou vhodné k posouzení variability uvnitř i mezi plemeny psů.
4. Stupeň příbuzenské plemenitby je mnohdy závislý na rozsahu populací – plemen v důsledku opakovaného příbuzenského křížení. Teoreticky dochází k homozygotizaci genofondu a ve spojitosti se selekcí řízenou člověkem může hypoteticky docházet ke snižování polymorfismu alel SSR lokusů.

Konkrétní cíle diplomové práce je možné shrnout do následujících bodů:

- Získat vzorky populace československých vlčáků (113 jedinců), Saarloosových vlčáků (25 jedinců) a německých ovčáků (57 jedinců)
- U výše uvedených zástupců plemen izolovat genomickou DNA ze stěrů bukálních sliznic a následně ověřit její kvalitu a kvantitu
- Optimalizovat PCR amplifikaci markerů mikrosatelitních lokusů FH2548, FH2584 a FH2985 s cílem maximalizovat specifičnost amplifikace
- Optimalizovat elektroforetickou separaci SSR markerů s využitím sekvenační polyakrylamidové elektroforézy
- Výše uvedená plemena (celkem 200 jedinců) charakterizovat z hlediska polymorfismů alel SSR lokusů FH2548, FH2584 a FH2985
- Statisticky analyzovat rozdíly ve variabilitě alel hodnocených mikrosatelitních lokusů mezi plemeny československý vlčák, německý ovčák a Saarloosův vlčák

- U plemene československý vlčák vyhodnotit úroveň příbuzenské plemenitby na základě koeficientu F_x
- Provést statistickou analýzu na principu neparametrického χ^2 testem s cílem ověřit vztah mezi distribucí alel všech tří mikrosatelitních lokusů a hodnotou koeficientu inbreedingu F_x

3. LITERÁRNÍ REŠERŽE

3.1. Vývoj psovitých

V pozdním Paleocenu a na začátku Eocenu se v severní Americe a Evropě objevil zástupce rodu *Miacid*. Už u něj se objevily ostré, na trhání přizpůsobené, zuby charakteristické pro řád *Carnivora*. *Miacid* se vyskytoval v různých velikostech. Nejmenší se podobaly malým lasičkám, ti větší liškám či malým psům. Žil v lesích a lovil poměrně malé kořisti. Z linie *Miacid* se vyvinulo mnoho, možná i všichni zástupci řádu *Carnivora* (Wang a Tedford, 2008) a je tudíž považován za prvního společného prapředka psovitých. *Miacis* je považován za společného předka pro vlka, kojota a šakala. Tito mají také shodný počet chromozómů (78). Mezidruhovým křížením tak vznikalo plodné potomstvo, které se mezi sebou snadno pářilo (Pokorná, 2007).

Před 30–40 mil. let se z rodu *Miacid* vyvinula psovitá šelma *Cynodictis*, která již trávila většinu času na zemi. Byla to první skutečná psovitá šelma, ze které se vyvinul předek vlků (měl již stejný počet zubů jako vlk), psů a lišek *Tomarctus*. Tento prapředek psa se nejvíce podobal některým dnešním ovčákům. *Tomarctus* – žil přibližně před 20 miliony lety, byl veliký asi jako liška. Na základě archeologických kosterních nálezů je považován za nejstaršího „prapsa“ (Pokorná, 2007). Dnes je však předními paleontology (Wang a Tedford, 2008) dokázáno, že *Tomarctus* se na přímém vývoji psa domácího nepodílel, jednalo se pouze o slepou vývojovou větev. Jako předka retenčních psovitých šelem Wang a Tedford (2008) bere *Leptocyona*. Paleozoolontologové se domnívají, že čeleď psovití byla reprezentována dvěma zaniklými rody (*Hesperocyoninae* a *Borophaginae*) a jedním přeživším *Canis*. Tyto rody se začaly vyvíjet před 40 miliony let v severní Americe. Před 7 – 8 miliony let se druhy rodu *Canis* dostaly do Eurasie. První známý zástupce rodu *Canis*, velikosti lišky, *Leptocyon* je z období brzkého Oligocenu (před 32 – 30 miliony let). Později ve středním Miocenu (před 20 – 10 miliony let) se objevil jedinec velikosti šakala *Eucyon*. Na konci Miocenu (před 5 – 6 miliony let) *Eucyon* kolonizoval Evropu. Během pozdního Pliocenu a Pleistocenu (před 1,5 – 2 miliony let) jedinci rodu *Canis* kolonizovali Evropu, Asii a Afriku a právě toto rozšíření dalo možnost vzniku vlkům, dhoulům (asijským divokým psům) a divokým psům. Euroasijský *Canis etruscus* a další potomek (*Canis mosbachensis*) jsou považovány za předky šedých vlků (*Canis lupus*), dhoulů a afrických divokých psů. V Eurasii a Africe se vlci objevili před 130 000 – 300 000 let. Vlci i kojoti byli velmi odolní proti vlivům prostředí a podle archeologických záznamů jejich morfologické vlastnosti, kromě změny velikosti těla a chování, zůstaly prakticky nezměněny až dodnes (Miklósi, 2007).

Rod *Canis* zahrnuje 34 známých druhů. Těmi nejznámějšími jsou šakal pruhovaný (*Canis adustus*), šakal obecný (*Canis aureus*), kojot (*Canis latrans*), šakal čabrakový (*Canis mesomelas*), vlk červený (*Canis rufus*), vlček etiopský (*Canis simensis*), vlk obecný (*Canis lupus*) a pes domácí (*Canis lupus*), které divergovaly během posledních 10 milionů let (Wayne *et al.*, 1997).

Fylogenetické vztahy jsou zjišťované srovnávací analýzou DNA vzorků existujících druhů. Fylogenetické stromy vygenerované na základě mitochondriální DNA (2001 párů bází dlouhá sekvence kódující protein) (Wayne *et al.*, 1997) a jaderné DNA (oba exony a introny představující variabilní úseky) (Lindblad-Toh *et al.*, 2005) poukazují na blízkou příbuznost mezi vlkem (psem) a kojotem a jejich africkém původu a naopak rozdíly mezi šakalem, etiopským šakalem a dhoulem (Miklósi, 2007).

Dalším bohatým zdrojem informací o minulosti psa jsou výsledky Dog Geonome Project, jehož cílem bylo osekvenovat celý genom psa (asi $2,4 \times 10^9$ párů bází DNA) a který byl publikován v roce 2005. Práce umožnila přesnější rekonstrukci demografické minulosti psa, na které se výrazně podepsalo významné zmenšení velikosti populace v začátcích domestikace (před 7 000 - 50 000 generacemi) (Lindblad-Toh *et al.* 2005).

3.2. Vlč obecný (*Canis lupus*)

3.2.1. Taxonomické zařazení v zoologickém systému

Vlk obecný (*Canis lupus*) (příloha 1) se řadí do třídy savců (*Mammalia*), podtřídy živorodí (*Theria*), nadřádu placentálové (*Placentalia*), řádu šelmy (*Carnivora*), čeledi psovítí, rodu *Canis*, druhu *Canis lupus* (Laštůvka *et al.*, 2001).

3.2.2. Rozšíření vlků

Původně byli vlci nejvíce rozšíření savci na světě (Sillero-Zubiri *et al.*, 2004). Původně byl rozšířen v celé holoarktické říši od tundry po polopouště (kromě africké části), nyní je na většině areálu vyhuben (Laštůvka *et al.*, 2001). Dnes je vlk celosvětově kriticky ohrožený druh. Jejich původní počet na celém světě byl snížen asi na 1/3 a to především v rozvinutých oblastech Evropy, Asie, Mexika a Spojených států (příloha 2). Zhruba od roku 1970 je vlk pod právní ochranou. V roce 2004 bylo podle Sillero-Zubiri *et al.* (2004) v Polsku pozorováno stabilně okolo 600 jedinců, na Slovensku 350 až 400 jedinců, v Maďarsku více než 50 jedinců a v Rumunsku se stav zvyšoval z 2500 jedinců. Ve všech jmenovaných státech je vlk chráněný státem. O populaci v Rusku a v Číně nejsou přesné informace, ale podle Sillero-Zubiri *et al.* (2004) je v Rusku asi 50 000 jedinců a v Číně je to okolo 6000. V Rusku

je spíše tendence stavy vlků snižovat, v Číně je sice chráněn státem, ale lov není trestný. V Itálii byla populace tamních vlků sledována Lucchini *et al.* (2002) v rámci výzkumu genetické diverzity.

Zhruba od roku 1995 žijí vlci již stále na pomezí se Slovenskem a centrální oblasti Moravskoslezských Beskyd. V letech 2000 – 2001 se zde, na Javorníkách a ve Vsetínských vrších vyskytovala jedna až tři menší smečky (Červený *et al.*, 2000, 2001, Bartošová 2001). Ojedinele mohou migrovat i do oblasti Jeseníků. Nová častější potvrzení výskytu vlka na Šumavě se pravděpodobně týkají také migrantů z Karpat (případně z dinárských pohoří) či jedinců ze zajetí, nebo se ještě vztahují ke krátké epizodě úniku vlčí smečky ze zoo v Národním parku Bavorský les v zimě 1975 – 1976. Tehdy uniklo osm vlků, kteří byli postupně uloveni v Bavorsku, ale i v jižních a západních Čechách. Zajímavé však stále zůstává, že celkový počet opětně chycených a ulovených jedinců byl vyšší než počet jedinců, kteří unikli. Nedá se tedy vyloučit tehdejší možnost rozmnožování vlků na Šumavě (Bufka *et al.*, 2004). Celková početnost populace v České republice se odhaduje na 5 až 17 kusů (Boitani, 2000, Červený *et al.* 2001).

3.2.3. Charakteristika druhu

Zoologická systematika rozlišuje 13 – 16 poddruhů vlka. Nejrůznější životní podmínky daly vzniknout různé konstituci, odlišnostem ve stavbě těla, tvaru hlavy, kvalitě i barvě srsti, takže se dnes setkáváme s vlky o váze od 25 do 80 kg, od 55 cm do 80 cm kohoutkové výšky, s protáhlou i krátkou hlavou, s hustou srstí od 2000 do 6000 chlupů na 1 cm², od bílé barvy až po černou (Findejs *et al.*, 1998). V porovnání s dospělým německým ovčákem mají celkový vzhled a proporce přibližně stejné. Výjimkou jsou delší vlčí nohy, větší chodidla, kratší uši, šikmé oči, svisle nesený kratší ocas a dlouhá zimní srst s chomáčem chlupů na bradě (Sillero-Zubiri *et al.*, 2004).

Nejznámější je vlk euroasijský (*Canis lupus lupus*), polární (*Canis lupus tundrorum*), sibiřský (*Canis lupus altaicus*).

Teritorialita – vytváření a respektování teritoria – je vlastní všem predátorům (šelmám, dravcům) a velmi účinně reguluje počet těchto zvířat v krajině (Hartl a Jedlička, 1996). Teritorium je velké 75 - 2 500 km² v závislosti na množství kořisti a bývá ohraničováno pachovými značkami, vytím i přímým zabíjením (Sillero-Zubiri *et al.*, 2004). Vlčí pár, který nemá teritorium, nemá ani mláďata. Počet teritorií v krajině je omezený; počet vlčích rodin, které mohou každoročně odchovat vlčata, je úměrný úživnosti krajiny (Hartl a Jedlička, 1996). Mimo období rozmnožování není život vlků vázán k určitému místu.

Vlk je zvíře žijící společensky. Nebylo by psí věrnosti ani lásky k lidem, kdyby předkové psa, vlci, žili samotářsky. Základním společenstvím vlků je smečka, zpravidla tvořená jednou rodinou (Findejs *et al.*, 1998). V jedné smečce může žít až 36 jedinců, ale obvykle je to 5 - 12 členů (Sillero-Zubiri *et al.*, 2004). Smečka vlkům zajišťuje bezpečnost, větší úspěšnost lovu velkých zvířat, výchovu mláďat a ochranu lovišť. Každý člen zde má místo a vůdce smečky je výrazně respektován. Na rozdíl od divokých psů se ve vlčí smečce vytvářejí vlastně dvě linie hierarchické struktury – jedna mezi samci, druhá mezi samicemi. Na vrcholu stojí rodičovský pár, dominantní vlk a vlčice, žijící monogamně. Vlk udržuje pořádek mezi ostatními samci, vlčice (příloha 2) si hlídá podřízené samice (Hartl a Jedlička, 1996).

Chování vlků je určováno jednak vrozenými vlastnostmi a jednak zkušenostmi a odpozorováváním od ostatních členů smečky. K navyknutí na nové podněty, které jej přímo neohrožují, potřebuje vlk až dvacet dní. Jsou-li tyto podněty spojeny se získáním potravy, stačí mu k přivyknutí čtyři až pět dní. Na podněty, které jej ohrožují, mu stačí jedna až dvě zkušenosti. Tím se vysvětluje, že v prostředí, kde člověk vlka pronásleduje, se vlk člověku vyhýbá. Naopak tam, kde je člověk pro vlka pouze novým podnětem, je vlčí chování určováno získanou zkušeností. Ta může být negativní, pokud člověk na vlka zaútočí, nebo pozitivní, pokud vlkovi pouze překáží v navyklém způsobu života.

Zajímavé jsou poznatky z výchovy vlka v zajetí. Pokud byla vlčata získána v době do 21. dne jejich stáří a byla chována odděleně, jejich chování se přibližovalo chování stejně starých štěňat. Pokud byla vlčata chována společně, byla závislá jedno na druhém a jejich vztah k člověku se vytvářel velmi pomalu a nikdy nebyl pevný. Z toho bylo odvozeno, že vlčatům je nedůvěra vrozená a tím i opatrnost k novým podnětům. Tato nedůvěra se velmi rychle upevňuje, jakmile se vlčice seznámí s chováním starších členů smečky.

Z historického hlediska byl vlk významným lidským nepřítelem, kterého se ho báli, pronásledovali ho a chtěli ho vyhubit. Byl to jejich potravní konkurent. Většina kultur používala jeho kožich jako oblečení. Ochranná opatření začala být přijímána až od roku 1970, ale v některých asijských zemích dodnes chybí (Sillero-Zubiri *et al.*, 2004).

Vlk je předkem domácího psa (příloha 4). K jeho domestikaci došlo před více jak deseti tisíci let. Dodnes se používá k „vylepšení“ genetických vlastností některých plemen psů. Křížením německého ovčáka a vlka vzniklo plemeno československý vlčák, vyšlechtěné v druhé polovině dvacátého století. Zástupci tohoto plemene mají 25 – 30% vlčí krve.

3.3. Šakal obecný (*Canis aureus*)

3.3.1. Charakteristika druhu

Šakalové, kteří jsou pravděpodobně potomci se zaniklého *Canis arnensis*, představuje většinu jižních druhů (Miklósi A., 2007) a patří mezi blízké příbuzné psa.

Šakal je považován za nejtypičtějšího zástupce rodu *Canis*. Patří mezi středně velké psovitě šelmy, mezi pohlavím může být až 12% hmotnostní rozdíl (Sillero-Zubiri *et al.*, 2004). Šakal má tělo dlouhé až 80 cm, výšku v kohoutku 45 – 50 cm a ocas v délce maximálně 30 cm. Základní zbarvení je zlatožluté, na hřbetě přechází v tmavý pruh, hlava a krk mohou být rezavě červené a hrdlo s břichem až bílé. Dospělý jedinec má hmotnost 10 – 15 kg. V porovnání s liškou se šakal jeví jako kratší, na vyšších bězích a s krátkým ocasem. Popsané znaky by měly stačit k rozlišení lišky a šakala v přírodě i průměrně zkušenému pozorovateli. Spolehlivé rozlišovací znaky najdeme na lebce dospělých jedinců. Na rozdíl od liščí lebky je lebka šakala masivnější a širší s kratší nosní částí.

Zaměnit lebku šakala s lebku vlka není vzhledem k velikosti obou druhů možné, a to ani v případě, že bychom porovnávali lebku dospělého šakala a mladého vlka. Vždy budou patrné rozdíly ve velikosti lebky nebo stupně zkostnatění (osifikace) lebečních švů, popř. v přítomnosti mléčného chrupu.

Velmi snadná však může být záměna lebky šakala s lebku psa, a to především díky významné velikostní a tvarové rozmanitosti psích lebek, především kříženců různých plemen. Spolehlivým znakem pro rozlišení šakalí a psí lebky je výrazný nepřerušovaný prstenec zuboviny na poslední stoličce, který je u psa vždy přerušovaný a méně výrazný než u šakala.

Naprosto jedinečným a pro určení šakala typickým znakem jsou srostlá bříška dvou prostředních prstů na předních bězích, která je dobře patrná i ve stopách. Jiné psovitě šelmy tento znak nemají (Koubek *et al.*, 2008).

Šakal obecný patří k nemnoha evropským druhům savců, u nichž jsme v posledních desetiletích zaznamenali významnou pozitivní změnu ve velikosti areálu rozšíření (Koubek *et al.*, 2008). Nyní je možné jej nalézt na území Severní Afriky až po Tanzanii a Nigérii, jihovýchodní Evropy, jižní Asie až po Thajsko (příloha 5). Jenom v Indii je minimálně 80 000 jedinců, což není velké překvapení vzhledem k tomu, že zhruba 19% území Indie jsou lesy, které jsou pro šakaly vhodným obydlím (Sillero-Zubiri *et al.*, 2004). Nálezem samce šakala u Podolí (19.3.2006) byl konečně doložen výskyt tohoto druhu psovitě šelmy také na území České Republiky (Koubek *et al.*, 2008).

3.4. Pes domácí (*Canis lupus familiaris*)

3.4.1. Taxonomické zařazení

Pes domácí (*Canis familiaris*) se řadí do třídy savců (Mammalia), podtřídy živorodí (*Theria*), nadřádu placentálové (*Placentalia*), řádu šelmy (*Carnivora*), čeledi psovítí, rodu *Canis*, druhu *Canis lupus familiaris* (Laštůvka *et al.*, 2001)

3.4.2. Původ Psa domácího

Pravděpodobně již lidé starší doby kamenné, tedy před 12 - 15 tisíci lety, získávali tak či onak vlčí štěňata - pravděpodobně celý vrh - a ochočili si je (Bielfeld, 1996). O tom vypovídají také archeologické nálezy, podle nichž lze s určitostí potvrdit přítomnost vlka v blízkosti lidských příbytků (Pokorná, 2007).

Pes domácí je nejvíce fenotypově různorodý savčí druh s rozsahem velikosti těla od malé čivavy až po velkou dánskou dogu. Tyto rozdíly ve velikosti a stavbě těla mezi plemeny jsou větší, než mezi jednotlivými druhy rodu *Canidae*. Velké rozdíly jsou také v chování a fyziologii. Proto se nabízí otázka, zda je tato rozmanitost podmíněná odlišným původem. Poznatky z evoluční historie psa domácího a jeho vztahů k divokým psovitým šelmám nám umožňují tuto otázku osvětlit. Psi mají unikátní a velmi různorodý genetický rodokmen. Z těchto genetických dat vyplývá, že pes byl domestikován z vlků zhruba před 100 000 lety (Ruvinsky a Sampson, 2001).

V chování a morfologii mezi stovkami plemen domácího psa existují velké rozdíly. Řada těchto plemen vznikla v průběhu několika posledních set let. I přes značnou meziplennou genetickou stejnorodost jsou mezi plemeny výrazné fenotypové rozdíly. Proto je studium psí genetické informace a dědičnosti významné pro srovnávání evoluční biologie genetické informace a studium lidských dědičných chorob. Zmapování genomu odhalilo mikrosatelity vhodné pro mapování celé genetické informace. Pracovníci výzkumu jsou tedy dnes schopni využívat psí genetickou informaci pro různé druhy genetických studií (Greer *et al.*, 2003).

3.4.3. Domestikace psa

Není žádná náhoda, že jako první byl domestikován vlk – šelma s rozvinutým sociálním cítěním a dobrou přizpůsobivostí k ostatním bytostem (Miklósi A., 2007). Pes domácí byl domestikován z vlka vícekrát v různých oblastech jeho rozsáhlého areálu. Plodně se pářil nejen s vlkem, ale i se šakalem a jinými druhy rodu *Canis* (chyběla reprodukční bariéra). Aktivně sledoval člověka, připojoval se k němu (odpadky), akceptoval ho jako

nadřazeného člena smečky (autodomestikace), jeho štěňata byla uměle odchována. Pomáhal člověku při lovu, ochraně i obraně, později sloužil k hlídání stád, místy byl a dosud je chován pro maso. Ze zdivočelých psů v Austrálii vznikla výrazná forma, dnes považovaná za samostatný druh dingo (*Canis dingo*) (Laštůvka *et al.*, 2001).

Z tohoto období se našlo při archeologických vykopávkách velké množství zachovalých koster různých druhů psů (Pokorná, 2007). Jeden z prvních záznamů o psovi domácím je z Izraele, z období asi před 12 000 lety (Miklósi A., 2007). Z toho lze odvozovat původ dnešních plemen. Evropští psi jižní jsou jiného původu než psi severní a obě skupiny zřejmě nepocházejí z Evropy (Pokorná, 2007). Ve vykopávkách pravěkých sídlišť nacházíme různé druhy psů, z nichž pak odvozujeme původ dnešních plemen:

- *Canis familiaris palustris rutimer* – pes bažinný (rašelinný)
 - vykopávky potvrdili, že je to potomek vlka, kterého si lidé velmi dávno ochočili (Bielfeld, 1996)
 - je považován na prapředka teriérů, pinčů, kníračů, grifonků, špiců, čivav, severských psů, mexických naháčů. Za největšího z potomků psa bažinného jsou považována i plemena, která vznikala v 19. století, a to dobrman, erdelteriér a velký knírač
- *Canis familiaris intermedius* – pes popelištní
 - je považován za prapředka dnešních ras: bladhoundů, honičů, jezevčíků, španělů, retrievrů, ohařů, setrů, beaglů, foxhoundů, pudlů, pekinézů a maltézských psíků
- *Canis familiaris inostranzewi*
 - potomky tohoto psa jsou severští tažní psi husky, severská lovecká plemena psů – grónský pes, norský losí pes, keeshound, všechny lajky, eskymáčtí psi a samojedi, buldoci, buldočci, boxeři, novofundlandi, leonbergři, bernardýni a salašníčtí psi
- *Canis familiaris decumanus*
 - považuje se za předka dnešních dog
- *Canis familiaris leineri*
 - potomky tohoto psa jsou chrt staroegyptský, afgánský chrt, barzoj, saluka, sluga, irský vlkodav, deerhound, greyhound a vipet
- *Canis familiaris matris optima* – pes bronzový
 - je považován za praotce ovčáckých psů, mezi něž patří německý ovčák, belgický ovčák, skotský ovčák (kolie), čuvač, komodor, bobtail, puli, briard, velškorgi, šeltie (Pokorná, 2007).

3.4.4. Původ plemen

Vlk byl původně rozšířen po většině Eurasie a Severní Ameriky. Na té obrovské ploše vytvořil spoustu zeměpisných ras (přesněji poddruhů), které se od sebe nápadně liší velikostí i zbarvením. Dokonce i mezi členy jedné smečky, ba i v jednom vrhu najdeme zvířata vlkošedá i hnědá, písková, bílá, tmavošedá a dokonce i černá. Tento fakt je základem nesmírné proměnlivosti a schopnosti vytvářet mutace, která je psům vlastní. Po zdomácnění psa si začal člověk vybírat podle vlastního přání. V několika málo případech se až do dnešní doby dochovala plemena, která byla velmi specializovaná a dodnes si uchovávají svůj původní ráz (Bielfeld, 1996).

Na evropském kontinentě a ve většině zemích světa má dominantní postavení Mezinárodní kynologická federace (FCI), k níž patří i české kynologické organizace. Uznává 300 plemen, které dělí do 10 skupin nejen podle pracovního zaměření, ale i podle původu a genetických znaků.

Rozdělení jednotlivých plemen do 10. skupin dle FCI od 1.1.1990 :

1. psi ovčáctí, pastevečtí, kromě švýcarských salašnických psů
2. pinčové, kníračí, dogovití psi a švýcarští salašničtí psi
3. teriéři
4. jezevčíci
5. špici a primitivní plemena
6. honiči a barváři
7. ohaři
8. retrívři, slídiči a vodní psi
9. společenštití a doprovodní psi
10. chrti a příbuzná plemena

(Pokorná, 2007).

3.4.5. Křížení psa (*Canis familiaris*) a vlka (*Canis lupus*)

Navzdory dlouhé evoluci *Canis* a odloučení psů a vlků je páření mezi nimi stále možné (Miklósi A., 2007). Všechny druhy rodu *Canis* jsou úzce příbuzné (Wayne *et al.*, 1997), mohou se křížit a produkovat plodné potomstvo (Vilà a Wayne, 1999). Během posledních 100 000 let se domestikovaní psi několikrát křížili s vlky, ze kterých pocházejí (Vilà *et al.*, 1997). Toto křížení může představovat pro ohrožené jedince problém, jedině pokud dojde k narušení genetické integrity. Křížení vlků se psy ve volné přírodě je pozorováno poměrně často, ale záznamů ve vědecké literatuře není mnoho. Nicméně dokumentace této hybridizace je důležitá (Anderson *et al.*, 2002) pro zachování vlčí

populace a některých vzácných či ohrožených druhů. Například vlček etiopský (*Canis simensis*), který patří mezi nejvíce ohrožené druhy na zemi (Vilà a Wayne, 1999).

Ke křížení dochází nejčastěji v oblastech, kde se vlci vyskytují v blízkosti lidských sídel, v oblastech s málo početnou populací vlků, ale naopak s velkým výskytem domácích a divokých psů (Vilà a Wayne, 1999) a u tažných psů na Aljašce, kde nejsou pod stálou kontrolou člověka. Tady vznikne naprosto volné, lidmi neovlivněné partnerství a nutno říci, že při tomto páření je ve většině případů samčím partnerem vlk, neboť pes nemá žádnou šanci porazit vlčí smečku a oplodnit vlčici (Räber, 1993).

Křížení evropské populace šedých vlků s domácím psem vyvolalo řadu znepokojení (Vilà a Wayne, 1999). Už i Charles Darwin, zakladatel evoluční teorie, k tomu říká: „Křížení vymazává vynikající vlastnosti obou rodičovských ras. To co stvoří, je bastard, jehož charakterem je bezcharakternost“ (Räber, 1993). Vilà a Wayne (1999) zhodnotili zděděné mitochondriální a biparentální markery u psů a volně žijících vlků. Hybridní pes - vlk byli pozorováni v přírodě a k žádné introgresi markerů psa do populace divokého vlka zatím nedošlo. Hybridizace zdá se neohrožuje zachování ohrožené populace vlků. Fyziologické rozdíly mezi domácími psy a vlky jsou stále dostatečně velké, takže je nepravděpodobné, že by došlo k páření a přežívání hybridního potomka ve volné přírodě.

Vlci jsou skuteční prapisci, vitální, plní životní energie, nesmírně odolní, výkonní a životaschopní. Co je více nasnadě než postavit čistokrevného psa, trýzněného dědičnými defekty a degenerovaného, na nohy s pomocí křížení s vlkem díky jeho prapůvodní přirozené vitalitě? Leendert Saarloos, holandský kynolog, si to myslel. Chtěl vyšlechtit skrz naskrz zdravého, výkonného užitkového psa. Proto před druhou světovou válkou spáčil svého německého ovčáka s vlčicí Fleur a šlechtil několik generací kříženců za sebou. Plemeno bylo pojmenováno saarloos wolfhonden. Stala se z nich skutečně nádherná zvířata, pro laika sotva odlišitelná od vlků. Ovšem když přijde takový krasavec a člověk jen luskně prsty, většinou uskočí jako plachý srneček. Tato plachost, jeho averze vůči nucení způsobila ztroskotání Saarloosovy myšlenky superužitkového psa. Jen skutečný domácí pes, obzvláště ovčák, má právě díky tisícileté selekci chuť těsně spolupracovat s člověkem, schopnost podřídit se tlaku (Wachtel, 1998).

V tehdejší Československu se údaje o křížencích vlka a psa, v dostupné literatuře, týkaly pouze kříženců první generace. Všechny údaje popisovaly křížence jako špatné psy, v chování agresivnější než vlky (Hartl a Jedlička, 1996). Podobné myšlenky jako Saarloose přiměly Ing. Karla Hartla v bývalém Československu, aby v roce 1955 provedl takové křížení v chovatelské stanici pohraniční strážce (Wachtel, 1998). Cílem křížení bylo zjistit co nejvíce o

chování vlka v zajetí, jaká je plodnost jeho kříženců se psem, jaká je biometrie vlka a jeho kříženců, jaký je rozdíl v aktivitě vlka, kříženců a psa, jak se liší vrozené vlastnosti u kříženců a jak získávají zkušenosti (Hartl a Jedlička, 1996). Cílem bylo zjistit co nejvíce jak po stránce genetické, tak po stránce fyziologické a anatomické (Findejs *et al.*, 1998).

V Americe někteří chovatelé své psy křížily pro zlepšení fyzické kondice. Ve Spojených státech je více než 10 000 kříženců vlk - pes. Toto křížení má počátky v dávné historii: archeologické pozůstatky z Wyomingu ukazují, že k této hybridizaci docházelo v Severní Americe již před 10 000 roky (Vilà a Wayne, 1999).

3.4.6. Variabilita populace vlka a psa z pohledu molekulární biologie

Domněnka, že celá evropská populace vlka je ve skutečnosti populací kříženců vlků se psy vyvolala u ochránců zvířat velké obavy o genetickou integritu populace divokého vlka žijícího volně v přírodě. I když jsou tyto závěry založeny pouze na povrchních důkazech, byla provedena řada genetických testů ke stanovení míry hybridizace (Lucchini *et al.*, 2002).

Nedávná studie poskytuje důkazy, že přirozená hybridizace mezi populací vlka a domestikovaného psa daleko více vzácnější, než se předpokládalo a tudíž obavy z tohoto plynoucí neopodstatněné. Nejrozsáhlejší genetické studie využili maternální dědičnosti markerů mitochondriální DNA (mtDNA), které mohou identifikovat jedince, kteří vznikly křížením samice psa a samce vlka. Studie jaderných markerů jsou méně průkazné, ale detekují vnesení a zabudování cizích genů do sledovaného organismu bez ohledu na pohlaví. Pro posouzení hybridizace autoři hodnotili nedávné studie dědičnosti maternálních a bipaternálních markerů u psů a šedých vlků. Došli k závěru, že genetické údaje nejsou ovlivněné rozšiřující se hybridizací. Bylo by lepší porozumět proč psi a vlci ve volné přírodě nehybridizují úspěšně a naopak diskutovat o hybridizaci Etiopského vlka, druhu, jehož genetická integrita je hybridizací se psy ohrožena (Vilà a Wayne, 1999).

3.4.7. Rozdíly mezi vlkem a psem

Ačkoliv jsou vlci na první pohled podobní psům, při soužití se psem nikdo nepomyslí na vlka. Jsou mezi nimi obrovské rozdíly. Vlci jsou divočí, žijí v divočině, vyhýbají se lidem a lidské jídlo loví a zabíjejí, často ve spolupráci s ostatními vlky. Psi, na rozdíl od toho, žijí s lidmi, kteří jim poskytují jídlo. Tak proběhla základní genetická změna. Tento rozdíl v zajišťování potravy vedl právě k ochočení psa (Coppinger a Coppinger, 2001).

V historii se vědci pokoušeli vymezit morfologické a etologické (v dnešní době spíše genetické) rysy, které by pomohly identifikovat vlky a psy. Taková kategorizace se ukázala,

jako velmi obtížná. Ačkoliv z pohledu genetické variability je možné vlky a psy spolehlivě rozlišit (Vilà *et al.*, 2003a), fenotypové rozdíly je obtížné stanovit.

V průběhu let vědci sestavili seznam s rysy, které se mohou používat pro rozlišování vlků a psů (Miklósi, 2007).

Morfologické odlišnosti:

- Lebka a tělo: lebky psů jsou kratší a menší v porovnání s vlkem o stejné tělesné hmotnosti (Miklósi, 2007)
- Lebka a zuby: zuby psa jsou ve vztahu k lebce menší (Miklósi, 2007)
- Čelist a zuby: zuby psa jsou častěji pevněji uloženy v čelisti, hlavně v oblasti třenových zubů (Miklósi, 2007)
- Lebka a čelo: úhel sklonu čela je větší u psů (Miklósi, 2007) (příloha 6)
- Ocas: vlci nikdy nemají ocas přikolepný na záď jak to můžeme často vidět u některých plemen psů
- Paspárky: vlci nikdy nemají paspárky (pátý prst na pánevní končetině), stejně jako většina všech plemen až na výjimky jako boseron, briard apod.
- Pochové žlázy: psi nemají nebo mají redukovanou ocasní pachovou žlázu

Etologické odlišnosti:

V průběhu let etologové sestavili dlouhý seznam týkající se chování (etogram) charakteristického pro vlka. Pozorování různých plemen psů, psů smíšené rasy nebo neochočených psů vykazuje jistou etologickou podobnost s vlčím vzorem. Naproti tomu velké rozdíly jsou pozorovány při štěkání. Vlk i pes štěká, ale styl štěkotu u psů je jiný. Vlci štěkají v určitých sociálních souvislostech (varování, rozčilení), zatímco psi i bez nějakého určitého významu. Mohou být vyučováni štěkat nebo naopak neštěkat na nějaké externí podněty (učení, trénink) (Miklósi, 2007).

3.5. Československý vlčák

3.5.1. Historie plemene

Pokus s křížením německých ovčáků s vlky byl připravován od roku 1955. První vrh kříženců se narodil 26. května 1958 v chovné stanici Pohraniční stráž v Libějovicích (Findejs *et al.*, 1998). Ing. Karel Hartl poprvé křížil karpatskou vlčici Britu a psa německého ovčáka Cézar z Břizového háje (příloha 7) (Räber, 1993). Údaje o křížencích vlka a psa se týkaly pouze kříženců první generace. Všechny údaje popisovaly křížence jako problematické psy. Cílem pokusu bylo zjistit co nejvíce o chování vlka v zajetí, jaká je plodnost jeho kříženců se psem, jaká je biometrie vlka a jeho kříženců, v čem se projevuje dominance nebo recesivita

vloh vlka u kříženců, jaký je rozdíl v aktivitě vlka, kříženců a psa, jak se liší vrozené vlastnosti u kříženců a jak získávají zkušenosti (Hartl a Jedlička, 1996). V žádném případě tenkrát neexistoval úmysl vytvořit nové plemeno, ale v popředí stály více vědecké zájmy (Räber, 1993). Vybraní kříženci byli znovu spojováni s nepříbuznými německými ovčáky (Findejs *et al.*, 1998).

Kříženci první generace jsou typem i chováním vlčí. Při spojení vlka s fenou německého ovčáka je většina kříženců podobná vlkům, ale ve vrhu je již větší variabilita (Hartl a Jedlička, 1996). Vlčí chování (plachost, prchání, agresivita při překročení „kritické vzdálenosti“) bylo u zvířat generace F1 velmi výrazné. Rovněž vlčí barva srsti se ujala u kříženců generace F1. Biometrické znaky, například mozková kapacita, odpovídaly zdatně vlku. Kříženci převýšili německé ovčáky zdatně pokud jde o čichové vlastnosti, rovněž jejich orientační smysl byl zdatně výraznější nežli u ovčáků (Räber, 1993). Kříženci první, ale i dalších generací, jsou plodní a dají potomstvo jak se psem, tak s vlkem (Hartl a Jedlička, 1996). V druhé generaci, při spojení kříženců se psy, je potomstvo exteriérově ze 70 – 75% podobné vlku a zbytek jsou mezitypy (Findejs *et al.*, 1998). Ovladatelnost a tím i cvičitelnost kříženců této generace je zdatně rozdílná od psů. Jsou mezi nimi jedinci, kteří se téměř nedají cvičit (Hartl a Jedlička, 1996). Třetí generace kříženců při spojení se psy si zachovává ještě v 60 – 75% exteriérové znaky vlka. Ve třetí generaci je možné jak z typů vlka, tak mezitypů vybrat jedince, kteří jsou vhodné i k náročnému výcviku (Findejs *et al.*, 1998).

V letech 1964 – 1965 byly publikovány výsledky křížení a směry dalšího výzkumu. Současně již existovala myšlenka na vznik nového plemene, navzdory téměř hysterické reakci některých chovatelů německého ovčáka (Hartl a Jedlička, 1996).

V té době již existovaly čtyři filiální generace kříženců z první skupiny, založené vlčicí Britou a německým ovčákem Césarem z Březového háje, a dvě filiální generace z druhé skupiny po stejné vlčici a německého ovčáka Kurtu z Václavky (příloha 8).

V sedmdesátých letech byla většina kříženců převezena do nového kynologického zařízení blízko Malacek, náležející k bratislavskému útvaru Pohraniční stráž. Zde obohatil populaci třetí vlk, Šarik. V roce 1974 byl spojen s kříženkou třetí filiální generace Xelou z Pohraniční stráž a s fenou československého vlčáka Urtou z Pohraniční stráž.

Po usilovném jednání s ústřední kynologickou komisí, kde toto plemeno podpořil Ing. Jan Findejs, v závěru roku 1981 povolil Český svaz chovatelů ustanovení Klubu československého vlčáka a zápis do plemenné knihy.

Klub chovatelů československého vlčáka byl založen v Brně v březnu 1982. Ustanovující schůze schválila mimo jiné název plemene československý vlčák. Klub byl také

začleněn do Českého svazu chovatelů (Findejs *et al.*, 1998) a československý vlčák byl uznán jako národní plemeno.

Uznání u FCI následovalo 13. června 1989 (standard č. 332) (Räber, 1993).

3.5.2. Standard plemene

Standard je nejdůležitější dokumentem, který spojuje chovatele téhož plemene psů na celém světě. Standardy navrhuje země původu jednotlivých plemen psů, v našem případě to bylo Československo v roce 1988. Po projednání v komisi pro standardy schvaluje platné znění Generální shromáždění FCI (Hartl a Jedlička, 1996). Pro zachování takového plemenného standardu je nutná příbuzenská plemenitba.

Původ: bývalé Československo

Patronát: Slovenská republika

Využití: pracovní pes

Datum vydání platného originálu standardu: 28. 4. 1994

Klasifikace FCI: skupina 1 – ovčáctí a pastevečtí psi, sekce – lovečtí psi se zkouškou z výkonu

Celkový vzhled: pevného konstitučního typu, více než středně velký, obdélníkového rámce. Stavbou těla, pohybem, osrstěním, barvou srsti a maskou připomíná vlka

Povaha a charakter: temperamentní, velmi aktivní, učenlivý, rychle reagující. Neohrožený a odvážný. Nedůvěřivý, ale bezdůvodně nenapadá. Svému pánu projevuje neobyčejnou věrnost. Odolný proti povětrnostním vlivům. Všestranně upotřebitelný.

Pohyb: Harmonický, lehký, prostorný klus, kdy končetiny kmitají co nejnižší nad zemí. Hlava a krk se schylují do vodorovné polohy. V kroku mimochod.

Srst:

- vlastnosti srsti: rovná a uzavřená. Zimní a letní srst je značně rozdílná. V zimě převládá mohutná podsada, která s vrchní krycí srstí vytváří husté osrstění celého těla. Je nutné, aby srst pokrývala břicho, vnitřní část stehen, vnitřní část ucha a meziprstí.
- barva srsti: žlutohnědá až stříbrošedá s charakteristickou bílou maskou. Světlá srst je rovněž na spodní části krku a přední hrudi. Přípustné je tmavošedé zbarvení s maskou.

Výška a váha:

- výška v kohoutku: psi nejméně 65 cm, feny nejméně 60 cm
- hmotnost: psi nejméně 26 kg, feny nejméně 20 kg

Standard dále uvádí podrobný popis hlavy, trupu, hrudních a pánevních končetin, vad (Findejs *et al.*, 1998).

V přílohách 9, 10 a 11 jsou zobrazeni samčí a samičí zástupci plemene a stěně.

3.6. Německý ovčák

3.6.1. Charakteristika plemene

Německý ovčák (příloha 12 a 13) je inteligentní, dobře cvičitelný, lehce ovladatelný a mimořádně oddaný. Je dobrým ochráncem dětí i majetku a opatrný vůči cizím lidem. Tento pes zosobňuje kombinaci životní energie, fyzické odolnosti, inteligence, elegance a krásy. Německý ovčák je pes pozorný, ostražitý, mrštný, temperamentní, sebevědomý, statečný a má pevné nervy. Svě rodině je velice věrný, má přátelský vztah k dětem a dobře se snáší i s ostatními zvířaty (Sammsová, 2000).

Z počátku nacházel využití hlavně jako pes policejní a pastevecký. Dokáže se skvěle přizpůsobit různým situacím, pracuje rád a s chutí. Využívá se jako vojenský (policejní) či služební pes, jako průvodce osob s postižením zraku nebo sluchu. Již delší dobu je využíván i k detekci výbušnin, zbraní, drog a dalších látek, ale také jako pes záchranářský. V neposlední řadě je vidět i jako pes canisterapeutický a to jak k malým dětem, k osobám s různým postižením, tak i k seniorům. Mimo jiné je také vhodný k hlídání a ke sledování pachových stop. Využití nachází poměrně často i ve sportovní kynologii a to na vrcholné úrovni (Krämerová a Lenz, 1997).

3.6.2. Historie chovu

Německý ovčák náleží do vývojově samostatné skupiny psů užívaných při pasení ovcí (případně i jiného dobytka), pocházejícího z Evropy. Tato skupina ovčáckých psů vykazuje dosti výrazné znaky či rysy připustnosti se psy špicovitými, jejichž původní patrně velmi široký areál rozšíření zahrnoval též Evropu. Jde o skupinu vývojově velmi mladou, jež se s ohledem na své praktické uplatnění konstitovala teprve v průběhu 17. století. Je zřejmé, že roli ovčáckých psů (ve smyslu pracovním) převzali, až když se taková potřeba u lidí projevila. Do té doby zřejmě sloužili člověku jiným způsobem (Stuchlý, 1990).

Historie německého ovčáka je úzce spjata s Maxem von Stephanitz, jehož životní myšlenkou bylo vyšlechtit ideálního užitkového psa, který by se dal využít k více účelům. Využíval své bohaté zkušenosti s vojenskými psy jiných plemen (Krämerová a Lenz, 1997).

Dne 3. 4. 1899 na přehlídce pasteveckých psů koupil psa, jehož původní jméno znělo Hektor von Linkshrein z chovatelské stanice Sparwasser, nakonec byl přejmenován a

zaregistrován do nové plemenné knihy (Zuchtbuch = chovný registr) pod číslem SZ 1 jako Horand von Grafrath. Byl to vůbec první německý ovčák v Stephanitzově nové organizaci Vereins für Deutsche Schäferhunde (= SV) založené 22. 8. 1899 (Antesberger, 1999). Nejprve byl čistokrevný chov německých ovčáků postaven pouze na Horandovi a jeho přímých potomcích v několika chovných liniích, později však docházelo ke křížení s pasteveckými psy. V tehdejší době byl chov omezen na střední Evropu. Roku 1900 byla založena plemenná kniha (Sammsová, 2000).

Mezi dvěma světovými válkami nastal obrat v chovu k horšímu, chovatelé nedbali přísných ustanovení a odchovávali jedince, kteří vykazovali dědičné vady. Poptávka po tomto plemeni byla tak silná, že nesvědomytý a nekontrolovaný chov vedl k mnoha zdravotním problémům, z nichž nejvýznamnější je dysplazie kyčelního kloubu, která trápí chovatele dodnes. Chovatelský rozmach vedl také ke kousavosti ze strachu a dalším neurotickým potížím (Sammsová, 2000). Následkem bylo významné snížení pracovní hodnoty německého ovčáka. Během druhé světové války byli odvedeni vynikající i průměrní psi na frontu a chovatelům tak zůstali většinou podprůměrní jedinci. Takže byl nedostatek vhodného plemenného materiálu a aby mohl být chov vůbec obnoven, museli být do chovu zařazeni i psi víceméně nevhodní. Roku 1977 byly v Německu a Rakousku znova přepracovány některé body plemenného standardu a tím byl vytvořen základ nového chovného řádu (Antesberger, 1999)

3.7. Saarloosův vlčák

3.7.1. Charakteristika plemene

Toto plemeno nese jméno po svém zakladateli Leenertu Saarloosovi (Räber, 1993). Saarloosův vlčák je původem z Nizozemí. Saarloosův vlčák je nadmíru společenským tvorem a kontakt s ostatními psy a domácími zvířaty není problémem. Je to pes vhodný do rodiny. Jeho chování k cizím lidem a v cizích situacích je poněkud zdrženlivé (Verhoef - Verhallen, 1996). Saarloosův vlčák není žádným obranářským psem (Krämer, 1996).

Ve své vnější stavbě těla má mnoho z vlka (příloha 14), kterému ve většině případů odpovídá výškou (Räber, 1993). Psi měří v kohoutku 65 až 75 cm, feny 60 až 70 cm. Srst je krátká, nejobvyklejšími barvami jsou vlkošedá a barva uschlého listí, dále se vyskytuje krémová nebo bílá. Na psa takových rozměrů se dožívá dost vysokého věku - třináct nebo čtrnáct let není výjimkou (Verhoef - Verhallen, 1996).

3.7.2. Historie Chovu

V roce 1921 Leendert Saarloos zkřížil (Cunliffeová, 2002) psa německého ovčáka Gerharda van de Fransenum s vlčicí Fleur. Toto spojení bylo několikrát opakováno a z těchto rodičů odchoval Saarloos dvacet kříženců psa a vlka. Ale kříženci ho neuspokojovali a znovu je křížil. V roce 1963 pářil ještě jednou svého vlčáka s vlčicí Fleur II. Když v roce 1969 zemřel, neměl sice žádného vynikajícího pracovního psa, ale vyšlechtil nové plemeno, které ztělesnilo hodně ze svých předků jak ve svém chování, tak i stavbou těla (Räber, 1993). Plemeno sice bylo v roce 1975 oficiálně uznáno, ale za hranicemi Nizozemska je téměř neznámé (Cunliffeová, 2002). Ročně je zde zapisováno asi 50 štěňat do plemenné knihy (Räber, 1993). Československý vlčák je zvláštním plemenem, které vzniklo podobně jako Saarloosův vlčák. Obě plemena jsou povahově podobná, i když se říká, že československý vlčák je poněkud tvrdší a samostatnější (Verhoef - Verhallen, 1996). Chovatelským cílem Leenderta Saarlose byl "pes" s bystrými smysly, obezřetností a blekurychlými schopnostmi vlka a sounáležitostí s člověkem, jakož i učenlivostí německých ovčáků (Krämer, 1996). Nehodí se k tvrdé práci, ani pro hlídání předmětů, ale je učenlivý a přizpůsobený pro soutěže agility (Räber, 1993).

3.8. Metody plemenitby

Obecně rozeznáváme dvě metody plemenitby, čistokrevnou plemenitbu a křížení. Při čistokrevné plemenitbě dochází k páření jedinců stejného plemene. Potomci z této plemenitby vzešlí jsou zapsáni v plemenné knize a mají uznaný průkaz původu. Čistokrevná plemenitba se dále dělí na příbuzenskou a nepříbuzenskou plemenitbu. Příbuzenská plemenitba je vedena do různého stupně příbuznosti. Při nepříbuzenské, avšak čistokrevné plemenitbě se páří jedinci velmi vzdáleně příbuzní, kdy se společný předek nevyskytuje na straně otcovské ani mateřské do čtvrté, případně páté generace předků včetně (Dostál, 2007). Křížením se rozumí páření jedinců různého plemene mezi sebou. Tato metoda se používá při tvorbě nových plemen, při regeneraci původních plemen a nebo jako způsob přilítí krve v některých ojedinělých případech.

3.8.1. Metoda příbuzenské plemenitby

Je jednou metodou čistokrevné plemenitby. Za příbuzenskou plemenitbu je považováno takové páření jedinců, kdy jsou rodiče vzájemně příbuznější mezi sebou, než je průměr populace nebo plemene (Dostál, 2007). V chovu psů se nejčastěji setkáváme s liniovou plemenitbou, která je považována za nejvhodnější metodu plemenitby při šlechtění.

Tímto způsobem dochází k vyrovnanosti v požadovaných znacích a vlastnostech psů. Protože se stupeň příbuzenské plemenitby různí, je potřeba ho měřit.

Pro výpočet stupně příbuznosti a vyjádření míry ztráty genetické variability daného jedince je používán Wrightův koeficient příbuzenské plemenitby, označovaný symbolem **F_x**, kde:

$$F_x = \sum [0,5^{n+m+1}(1+F_a)]$$

kde **F_x** označuje koeficient příbuzenské plemenitby udávaný v absolutních číslech 0 - 1 nebo procentech 0 – 100%. Písmeno **n** značí počet pokolení předků v rodokmenu ze strany otce mezi daným jedincem a společným předkem. Písmeno **m** označuje počet pokolení předků v rodokmenu ze strany matky mezi daným jedincem a společným předkem. **F_a** značí hodnotu koeficientu příbuzenské plemenitby společného předka a Σ vyjadřuje součet hodnot pro všechny společné předky, je-li daný jedinec výsledkem příbuzenské plemenitby s více než jedním společným předkem. Není-li žádný ze společných předků výsledkem příbuzenské plemenitby, pak se jeho vlastní $F_x = 0$, a je možné použít zjednodušený vzorec:

$$F_x = \sum (0,5^{n+m+1})$$

Čím vyšší je procento, tím je vyšší ztráta genetické variability a tím více společných znaků se projeví na potomcích. Ideální výsledek je tedy 0%, v praxi by ale neměl přesáhnout alespoň 1% na generaci.

3.9. DNA markery

Pomocí DNA markerů je možné detekovat rozdíly v genetické informaci mezi analyzovanými druhy/populacemi/klony/jedinci/buňkami. DNA markery jsou založeny na polymorfismu sekvencí DNA. Jsou využívány např. pro DNA fingerprinting, při testování genetické čistoty osiva, ale i pro testování paternity, genetické mapování, populační genetiku a při studiu evoluce na molekulární úrovni. DNA markery je možné aplikovat u všech organismů, kde je zvládnutá technika izolace DNA. Molekulární markery mají díky fyzikálním vlastnostem DNA řadu výhod. První z nich je, že DNA je možné získat ze živých, ale i z mrtvých tkání (př. rostliny z herbáře). Molekula DNA je natolik stabilní, že může být zachována i po dobu několika miliónů let (Cano *et al.*, 1993). Další výhodou je, že k analýzám je zapotřebí většinou pouze malé množství DNA (DNA z 1 cm² nám postačí na asi 100 PCR reakcí). DNA markery nejsou závislé na podmínkách prostředí a lze je použít i u velmi raných ontogenetických stádií (Bergmann, 1975).

Studie o hybridizacích druhů a populací využívají genetických markerů, které jsou jedinečné pro každý taxon (Saetre *et al.*, 2001).

3.9.1. Repetitivní sekvence DNA

V genomu jakéhokoliv organismu existují různé sekvence nukleových kyselin. Pravděpodobně pouze 5% z nich má kódující funkce a nazývají se strukturními geny. Další, více početná skupina sekvencí, nemá žádnou kódující funkci a dělíme ji na jedinečné sekvence a repetitivní DNA (Alberts *et al.* 1998), která podle Snustad a Simmons (2009) tvoří 15 – 85% z celkové DNA. Pokud jsou kopie sekvenčního motivu v řadě za sebou, nazývají se tandemové repetice. Naproti tomu rozptýlené repetice jsou rozptýlené po celém genomu v jednotlivých kopiích (Šeda *et al.*, 2010). Repetitivní DNA je tvořena vysoce repetitivními krátkými sekvencemi, které vytvářejí série oblastí repeticí DNA známé jako **satelitní DNA** (Alberts *et al.* 1998). Tandemově opakující se DNA je běžný jev u eukaryotického genomu, ale prakticky neznámý u prokaryot (Brown, 1999). Podle Šedy a kol. (2010) se satelitní DNA vyskytuje především v oblasti centromer a heterochromatinu.

Přesné uspořádání satelitních DNA (tj. kolik různých typů a počet opakování je v daném úseku) se velmi liší i v rámci druhu. Tudíž může sloužit i k jednoznačné identifikaci jedince (Alberts *et al.*, 1998).

Minisatelitní DNA

Minisatelity jsou tandemové repetice, v rozsahu kilobází. Obvykle jsou vysoce polymorfní z hlediska opakování jednotky repetice (mnoho alel v populaci) a mohou být použity jako genetické markery, označované VNTR („variable number of tandem repeats“ – variabilní množství tandemových repetic). Kvůli své velikosti nejsou vhodné pro amplifikaci pomocí PCR a musí být stanovovány pomocí Southernova blotu (Šeda *et al.*, 2010).

Mikrosatelitní DNA

Mikrosatelity jsou tandemově se opakující úseky DNA nejčastěji o délce 2-6 párů bází (Edwards *et al.*, 1991). Mikrosatelity se nazývají také **STR** (short tandem repeats), či **VNTR** (variable number of tandem repeats) nebo **STS** (sequence tagged sites). Podle Bowling *et al.* (1997) to jsou úseky DNA, které se nacházejí především v nekódujících genových sekvencích.

Tautz (1993) uvádí, že patří do třídy tandemově se opakujících lokusů, u kterých mohou být alely rozlišeny podle své délky (tzn. podle počtu opakování dané sekvence). Mikrosatelitní DNA označována také jako SSRs („single sequence repeats“) tvoří asi 3% lidského genomu, kdy se jedna SSR vyskytuje na sekvenci o velikosti 200 bází. Nejčastější je opakování dvou nukleotidů (asi 0,5% genomu) (Primrose a Twyman, 2006), podle Šedy a kol.

(2010) převažuje typ $(CA)_n$. Opakování tří nukleotidů se vyskytuje vzácněji (Primrose a Twyman, 2006). Díky své mutační rychlosti jsou mikrosatelity velmi polymorfni (Litt a Luty, 1989, Weber a May, 1989, Tautz 1989). To znamená, že se nacházejí v různých variantách v rámci jedné populace. Příklad dvou různých alel:

Alela A: GTGTGT (3 opakování GT sekvence)
Alela B: GTGTGTGT (4 opakování GT sekvence)

Tato rozmanitost alel je v laboratoři snadno zjistitelná a dovoluje nám sledovat genetickou variabilitu mezi jednotlivými druhy, v rámci jednoho druhu, či v rámci jedinců uvnitř jedné populace (Tautz, 1989). Nazýváme ji repetitivním polymorfismem.

Každý jedinec má dvě kopie mikrosatelitu (dvě alely). Jedna je zděděná po otci, jedna po matce. Velikost mikrosatelitu (počet opakování) je dědičná jako kodominantní znak (Bowling *et al.*, 1997). Protože se jedinci mohou od sebe lišit v počtu opakování v určitém nukleotidovém motivu a počet opakování je jednoduše mendelisticky dědičný a navíc je jednoduše určitelný a v populaci existuje mnoho variant, mikrosatelity jsou vysoce polymorfni a použitelné pro mnohé analýzy. Polymorfismem rozumíme existenci více než dvou alternativních alelických variant určitého genu v populaci. Jednoznačně vyplývá, že mikrosatelity nejsou ovlivňovány vnějším prostředím (Hamanová, 2000).

Využití mikrosatelitů v molekulární biologii

Díky své vysoké proměnlivosti v počtu opakování jsou mikrosatelity vysoce polymorfni a náchylné k mutacím. Jednotlivé alely genu, délka repetice, mohou být snadno zjišťovány pomocí amplifikace metodou PCR s použitím dvojice oligonukleotidových primerů ohraničujících mikrosatelitní lokus, a porovnány délky ampikonů použitím gelové elektroforézy. Vyšetření založené na mikrosatelitech je relativně jednoduché a levné, a proto se široce využívá pro DNA diagnostiku, při studiu příbuzenských vztahů, určování paternity, nebo při studiu parametrů populačně genetické struktury, jako je tok genů a jeho bariéry, efektivní velikost populace, odchylky od Hardy-Weinbergovy rovnováhy, všeobecně při studiu rozmnožovacích systémů (př. stanovení stupně inbreedingu v populaci) i pro forenzní účely (Weissenbach *et al.*, 1992, Tautz, 1993, Šeda *et al.*, 2010).

3.9.2. Použití markerů DNA

Princip molekulárních markerů je založený na:

- specifickém restrikčním štěpení analyzované DNA a následné hybridizaci se značenou sondou
- amplifikaci specifických fragmentů v *in vitro* podmínkách
- na různých kombinacích restrikčního štěpení, hybridizace a amplifikace.

Techniky molekulárních markerů založené na restrikčním štěpení a hybridizaci:

RFLP („Restriction Fragment Length Polymorphism“ – polymorfismus délky restrikčních fragmentů): patří mezi nejstarší DNA markery. Restrikční fragmenty jsou vytvořeny působením restrikčních endonukleáz, což jsou enzymy štěpící DNA v konkrétních sekvencích (Brown, 1999). Následně je pomocí elektroforetické separace a přenosu fragmentů z gelu na pevný nosič detekován délkový polymorfismus restrikčních fragmentů pomocí hybridizace s homologním fragmentem DNA, což je specifická sonda. Příčinou vzniku polymorfismů jsou mutace v restrikčních místech. Tak dochází ke ztrátě nebo vzniku nového restrikčního místa (Bachman, 1992). Vizualizace délkového polymorfismu se provádí barvením ethidium bromidem na agarózovém gelu (Brown, 1999). RFLP se využívá k určování otcovství, pro tvorbu genetických map (Bachman, 1992).

Techniky molekulárních markerů založené na metodě PCR:

Jedná se o různé modifikace klasické polymerázové řetězové reakce (PCR).

Real Time – PCR: amplifikace probíhá stejným způsobem jako standardní PCR. Reakční směs obsahuje, kromě dvojice primerů, specifickou vnitřní sondu. Ta je fluorescenčně označená na 3' konci tzv. zhášečem a na 5' konci tzv. reportérem, které nevyzařují fluorescenční signál v případě neprobíhající amplifikace. Tato metoda se využívá především pro zjištění množství transgenu v daném biologickém materiálu.

RAPD („Random amplified polymorphic DNA – náhodně amplifikovaná polymorfnní DNA): metoda, která využívá jednoho oligonukleotidového primeru, zpravidla 10 párů bází dlouhého. Krátká délka primeru a nižší teplota druhého kroku reakce PCR zvyšuje pravděpodobnost nasednutí primeru na více místech molekuly DNA (primery jsou tzv. nespecifické). Naamplifikovaná místa jsou separována agarózovou elektroforézou a zviditelněna ethidium bromidem (Bardakci, 2000).

Techniky molekulárních markerů založené na různých kombinacích štěpení, hybridizace a amplifikace:

CAPS (PCR-RFLP) („Cleaved Amplified Polymorphic Sequence – délkový polymorfismus restriktivně štěpené amplifikované DNA): tato metoda je spojením dvou výše zmiňovaných metod PCR a RFLP. Touto metodou lze díky bodovým mutacím odlišit dominantní a recesivní alely.

AFLP („Amplified Fragment Length Polymorphisms“ – délkový polymorfismus amplifikovaných fragmentů): metoda je založena na detekci DNA restriktivních fragmentů PCR amplifikací. Vos *et al.* (1995) rozděluje tuto techniku do třech kroků: rozstříhání DNA restriktázami a navázání oligonukleotidových primerů, amplifikace požadovaných restriktivních fragmentů a gelová analýza amplifikovaných fragmentů. Touto metodou je detekován polymorfismus v délce fragmentu, v restriktivním místě nebo v místě selektivních bází.

SSLP („Simple Sequence Length Polymorphism“ – délkový polymorfismus jednoduchých sekvencí): jsou to opakující se sekvence různé délky. Mohou být, na rozdíl od RFLPs, multialelické. V takovém případě rozdílné alely zahrnují různý počet a různou délku opakujících se jednotek (Brown, 1999). Zahrnuje mikrosatelity (STR – „short tandem repeats“) a minisatelity (VNTR – „variable number tandem repeat“).

Mikrosatelity jsou krátké tandemové repetice, které se skládají z mono-, di-, tri- nebo tetranukleotidových (někdy i hexanukleotidových) motivů. Jejich významnou vlastností je vysoký stupeň polymorfismu, který je způsoben variabilním počtem opakování (10-30). U savců je nejčastěji pozorován motiv (AC)_n. Polymorfismus mikrosatelitů může být rychle a jednoduše testován metodou polymerázové řetězové reakce a polyakrylamidové polyakrylamidové elektroforézy.

Minisatelity jsou delší a složitější tandemové repetice, které se opakují často i mnohatisíckrát.

Výhody SSR markerů: mohou být mezinárodně snadno vyměňovány, sdíleny, mohou být prezentovány jako kvantitativní data.

3.10. Genetická variabilita mikrosatelitních lokusů gonozómu X

Vlci a psi mají identický karyotyp, mohou se křížit a produkovat plodné potomstvo (Anderson *et al.*, 2002). Snaha o stanovení míry příbuznosti jednotlivých plemen mezi sebou a mezi vlky měla za následek potřebu osekvenování psího genomu. Toto úsilí podnítilo dramatický rozvoj psí genetiky (Tsai, 2005).

Ve většině případů není příbuznost vlků a psů rozpoznatelná pouze na základě fenotypových vlastností. Pro stanovení míry příbuznosti kříženců se tedy používá genetických markerů (Vilà *et al.*, 2003a). Mikrosatelity patří mezi nejčastěji se opakující sekvence DNA v savčím genomu, proto se jejich markery dnes běžně používají ke stanovení genetické variability mezi domestikovanými zvířaty, ale i mezi volně žijícími (Asch *et al.*, 2010). Za účelem určení původu, sledování změn v genetické variabilitě a dopad přesunu volně žijících i domestikovaných psů na přirozené populace je možné použít maternálně (mitochondriální DNA), paternálně (gonozóm Y) a bipaternálně zděděné markery (autozomy nebo mikrosatelity gonozómu X) (Vilà *et al.*, 2003b). Po dlouhou dobu byla analýza mitochondriální DNA nejvyužívanější pro fylogenetické a populační genetické studie. Tato metoda se zabývá pouze samičím rodokmenem a podává tak zkrácený obraz o populační historii. Pro doplnění populačních genetických studií analýzou markerů na chromozómu Y může objasnit roli obou pohlaví v přírodních procesech (Sundquist *et al.*, 2001). Za účelem stanovení míry příbuzenské plemenitby je možné použít i markerů gonozómu X (Grossman a Eisen, 1989).

Vzhledem ke kodominantní dědičnosti mohou mikrosatelity gonozómu X doplňovat informace autosomálních, Y gonosomálních a mitochondriálních DNA markerů. Mikrosatelitů gonozómu X bylo popsáno extrémně malé množství (Asch *et al.*, 2010). Tyto SSR markery se ukázaly jako užitečné v případech testování vzorků, kdy nebylo možné získat samčí genetický materiál. Na základě toho bylo možné rekonstruovat paternální profil. Barbaro a Cormaci (2006) popisuje možné použití tohoto markeru pro ověření příbuznosti matky či sestry a pohřešované osoby ženského pohlaví. Genetická analýza mikrosatelitů gonozómu X je výhodná při složitém příbuzenském testování, kdy potomkem je samice a údaje o samci chybí. V roce 2009 Poetsch *et al.* (2009) použili 11 SSR markerů gonozómu X k porovnání populace lidí v Ghaně. Protože je X chromozóm společný pro obě pohlaví (Schlotterer, 2000) byly 4 X chromozomální markery použity pro testování příbuznosti v Koreji. Bylo hodnoceno 300 mužů a 150 žen a nebyly zjištěny žádné významné odchylky od Hardy – Weinbergova rovnováhy. Poto je možné touto analýzou přispět výsledky do složitého příbuzenského testování v Koreji (Sim *et al.*, 2010).

Pro stanovení genetické variability vybraných jedinců plemen československý vlčák, německý ovčák a Saarloosův vlčák, byly vybrány markery mikrosatelitních lokusů FH2548, FH2584 a FH2985.

3.11. Metody analýzy DNA

3.11.1.PCR (Polymerase chain reaction)

Polymerázová řetězová reakce je proces, během kterého dochází k rychlé amplifikaci genů a dalších sekvencí DNA (Snustad a Simmons, 2009). Probíhá v podmínkách *in vitro*, tedy bez použití živých organismů (Alberts *et al.*, 1998).

Základní komponenty PCR:

Templátová DNA: templátová DNA se do master mixu přidává jednovláknová či dvouvláknová. Velikost templátové DNA pro amplifikaci není rozhodující. Podle Sambrook *et al.*, (1989) se běžně se pro PCR používá až 1,0 µg savčí genomové DNA.

Termostabilní DNA polymeráza: zpočátku plnila funkci replikázy při PCR DNA-polymeráza z *E. coli*. Tento enzym se během denaturačního kroku inaktivoval teplotou a musel být ve třetím kroku reakce doplňován. Vylepšení přišlo s objevem termostabilní DNA-polymerázy v termofilní bakterii *Thermus aquaticus* (Snustad a Simmons, 2009) Tato polymeráza je dnes běžně používána pod názvem *Taq*-polymeráza. Množství enzymu je závislé na počtu molekul v amplifikovaném vzorku (Sambrook *et al.*, 1989).

Dvojice syntetických oligonukleotidových primerů: patří mezi nejdražší komponenty celé reakce. Výběr a konstrukce správných primerů významně ovlivňuje úspěšnost amplifikace (Griffin a Griffin, 1994). Sambrook *et al.*, (1989) uvádí, že se obvykle používá 0,1 – 0,5 µM koncentrace primerů na nejméně 30 cyklů k amplifikaci 1kb segmentu DNA. Vyšší koncentrace primerů může vést k nespecifickým amplifikacím. Automaticky syntetizované oligonukleotidové primery bývají použity ke standardní PCR bez dalšího přečištění. V některých případech je možné použít více než jednu dvojici primerů, tzv. multiplex PCR.

Deoxynukleotid-trifosfáty (dNTPs): za účasti DNA polymerázy jsou zabudovány do nového DNA řetězce (Hartmanová *et al.*, 2008). Standardní směs pro PCR obsahuje ekvimolární množství dATP, dTTP, DTP a dGTP. Vysoká koncentrace dNTPs působí spíše jako inhibitor. Směs deoxynukleotid-trifosfátů je vyráběna komerčně řadou firem. Skladuje se při -20°C v a měla by být zlikvidována po druhém rozmrznutí (Sambrook *et al.*, 1989).

Pufr: poskytuje stálé chemické prostředí pro DNA polymerázu (Hartmanová *et al.*, 2008).

Jednomocný kationt: standardní PCR pufr obsahuje 50 mM KCl a je vhodný pro amplifikaci fragmentů DNA delších než 500bp.

Dvojmocný kationt: všechny termostabilní DNA-polymerázy potřebují ke své aktivitě dvojmocný kationt – nejčastěji Mg^{2+} . Optimální koncentrace Mg^{2+} musí být stanovena vždy pro daný poměr primerů a templátu (Sambrook *et al.*, 1989).

Metoda PCR zahrnuje tři kroky, které se mnohokrát opakují. Uváděná teplota a časové rozmezí jednotlivých kroků se liší u různých autorů. Prvním krokem je **denaturace**, kdy je genomová DNA obsahující amplifikované sekvence, zahřáta na 92 – 95°C po dobu asi 30s. Při této teplotě dochází k rozrušení vodíkových můstků v molekule DNA a k rozvolnění dvouvláknové dsDNA na jednovláknovou ssDNA. Druhým krokem reakce je **nasednutí DNA primerů** (hybridizace primerů, „anelace“), kdy je vzniklá jednovláknová ssDNA hybridizována s nadbytkem syntetických oligonukleotidových primerů při teplotě 50 – 60°C. **Prodlužování primerů** (polymerace, extenze) je posledním krokem reakce. Na dvouvláknové úseky DNA-primer se váže DNA polymeráza a dojde k samotné syntéze DNA. Ve směru od 5' konce ke 3' konci prodlužuje vlákno DNA komplementární k původní molekule DNA. K polymeraci obvykle dochází při 70-72°C po dobu 1,5 minuty, avšak teplota použitá v této fázi závisí na použité DNA polymeráze. Nejběžnější je *Taq*-polymeráza. Celý proces se mnohokrát opakuje, dokud není dosaženo požadovaného stupně amplifikace (Snustad a Simmons, 2009, Sambrook *et al.*, 1989). Po posledním cyklu se obvykle zařazuje cyklus zchlazení na 4-5 °C, které zajistí uchování amplifikované DNA v termocykleru do jejího vyjmutí.

Pro amplifikaci se obvykle používá 20 – 30 cyklů (Alberts *et al.*, 1998), ale konečné pořadí cyklů ovlivňuje řada faktorů jako je množství templátové DNA (Innis *et al.*, 1990).

Technologie založené na PCR zjednodušují mnoho aplikací, které vyžadují velké množství specifických sekvencí DNA. Tyto technologie umožňují získat konečná data o struktuře genů a sekvencích DNA, i když vycházíme z velmi malého množství DNA (Snustad a Simmons, 2009). PCR je velice citlivá metoda, která umožňuje detekci jediné kopie DNA ve vzorku tím, že tuto sekvenci namnoží do té míry, že ji můžeme po separaci gelovou elektroforézou a obarvení snadno detekovat (Alberts *et al.*, 1998). Významné využití nachází tato metoda při klonování DNA, diagnóze dědičných onemocnění u lidí a řešení forenzních případů vyžadujících identifikaci jedince.

3.11.2. Elektroforéza

Je jedna z metod analýzy DNA. Gelová elektroforéza je výkonným nástrojem pro rozdělování makromolekul s různou velikostí a nábojem a pro zjišťování jejich variability (Snustad a Simmons, 2009). Je to fyzikálně – chemická metoda dělení látek v elektrickém poli. Směs fragmentů se nanese do žlábků na jednom konci plochého gelu, ve kterém je mikroskopická síť pórů. Celý gel je umístěn do elektrického pole. DNA se díky svému negativnímu náboji pohybuje směrem ke kladné elektrodě (Alberts *et al.*, 1998). Pohyblivost fragmentů je závislá na velikosti, přičemž dlouhé úseky DNA se pohybují pomaleji, ale zcela nezávislá na podílu jednotlivých dusíkatých bází v dané sekvenci (Rickwood a Hames, 1990, Alberts *et al.*, 1998). Po několika hodinách se fragmenty v gelu rozdělí podle velikosti za vzniku „žebříku“ složeného z jednotlivých proužků, které jsou tvořeny úseky DNA o stejné velikosti (Alberts *et al.*, 1998). Tyto proužky není možné vidět pouhým okem, proto je nutné je zviditelnit pomocí fluorescenčních barviv např. ethidium bromidem a vizualizovat na transluminátoru v UV světle s následnou fotodokumentací (Hartmanová *et al.*, 2008). Během elektroforézy nedochází ke změně vlastností DNA, protože elektrické pole působí jen na povrchovou vrstvu molekul. Elektroforéza DNA může být prováděna na **agarózovém**, **polyakrylamidovém** nebo složeném agarózo-akrylamidovém gelu a provedení elektroforéz je buď horizontální nebo vertikální.

Agarózová gelová elektroforéza je horizontální, asi 3 mm tenká a používá se k detekci produktů amplifikačních nebo restričních reakcí (fragmenty DNA) o určité velikosti po PCR, k jejich dělení a eventuální preparaci jednotlivých fragmentů pro následnou analýzu (např. sekvenování) (Hartmanová *et al.*, 2008). Agarózový gel je vhodnějším sítem pro velké molekuly DNA (Snustad a Simmons, 2009). Koncentrace agarózy se volí podle velikosti fragmentů, které mají být separovány (Hartmanová *et al.*, 2008). Agarózový gel se používá k analýze DNA fragmentů o velikosti od 70 párů bází (3% agarózový gel) až do 800 000 párů bází (0,1% agarózový gel). Avšak s 0,5% agarózovým gelem je již obtížná manipulace, proto se analýza fragmentů nad 50 000 párů bází příliš nepoužívá (Rickwood a Hames, 1990).

Polyakrylamidová gelová elektroforéza (PAGE) je vertikální, asi 1 mm tenká a bývá používána pro separaci a charakterizaci především proteinů, ale i DNA (Hartmanová *et al.*, 2008). Je vhodnější pro rozdělování malých molekul DNA (Snustad a Simmons, 2009). Polyakrylamidový gel se používá pro fragmenty o velikosti od 6 párů bází (20% akrylamid) až 1000 párů bází (3% akrylamid). V závislosti na chemickém prostředí separace lze rozlišit gely na nativní, ve kterém dochází k separaci molekul na základě jejich velikosti a denaturační. Kromě jednokontračních gelů je možné použít i gradientové gely, kde vzrůstá

množství denurantu. Detekování fragmentů na gelu se provádí různými barvicími metodami, např. stříbrem (Rickwood a Hames, 1990, Hartmanová *et al.*, 2008). Pro sekvenční analýzu nebo detekci mikrosatelitní DNA je možné využít polyakrylamidové gely, ale i automatická zařízení na principu průtokové kapilárové elektroforézy.

4. MATERIÁL A METODY

Variabilita SSR markerů gonozómu X byla detekována na základě PCR amplifikace a následné elektroforetické separace vybrané skupiny genotypů. Byla provedena optimalizace chemického složení reakčních směsí, teplotního a časového průběhu amplifikace a elektroforetické separace. Zde jsou uvedeny výsledné optimalizované postupy.

4.1. Hodnocené genotypy

Na řešení této práce byla shromážděna skupina jedinců plemene československý vlčák, německý ovčák a Saarloosův vlčák. Bylo hodnoceno celkem 113 jedinců československého vlčáka, 57 jedinců německého ovčáka a 25 jedinců Saarloosova vlčáka. Tato kolekce byla shromážděna díky osobním kontaktům Ing. Daniely Čílové.

4.2. Izolace DNA

Optimalizovanými metodami byla získána vysokomolekulární DNA izolací z bukálních buněk. Pro odběr epiteliálních buněk ze sliznice tlamy zvířete byly použity speciální sterilní cytologické kartáčky „Cytobrush“. Pro správný odběr materiálu bylo zapotřebí nekrmit zvíře alespoň 2 hodiny před odběrem. Po odběru a oschnutí byl kartáček vložen do sterilní polypropylénové zkumavky a vše se uchovávalo v mrazicím boxu při -20°C.

Pro izolaci nukleových kyselin z různých biologických materiálů je vyráběna řada kitů. Tyto izolační sady zaručují zachování naprosto identických podmínek během izolace, jsou vysoce spolehlivé a výrazně urychlují izolaci DNA. Pro tuto práci byl využit kit NucleoSpin® Tissue XS (Macherey-Nagel, SRN) podle doporučeného postupu výrobce.

4.3. PCR amplifikace

FH2548

Optimalizovaná reakční směs pro amplifikaci o objemu 12,5 µl obsahovala 50 ng templátové DNA, 0,7 U *Taq* polymerázy (Fermentas) a 5 µg BSA. Koncentrace ostatních komponent PCR reakce byla následující: 10 mM Tris-HCl (pH 8,8), 20 mM (NH₄)₂SO₄, 5 mM MgCl₂, 200 µM dNTP, 0,48 µM primer FH2548-F, 0,48 µM primer FH2548-R a 2 mM tetramethylamonium oxalát (Top Bio).

Pro amplifikaci PCR byly použity primery pro lokus FH2548.

Sekvence primeru FH2548 R je následující: 5' GACATTCAGAGATTTCCGCC 3' a

FH2548 F 5' AAGGGAGGAAACAATGCTGA 3'.

Amplifikace probíhala v termocykleru C1000 (BioRad) při následujících podmínkách: 1x (94°C, 3 minuty), 35x (94°C 30 sekund, 64,1°C 30 sekund, 72°C 45 sekund), 1x (72°C 7 minut).

FH 2584

Pro amplifikaci polymorfního PCR amplikonu byly použity primery pro lokus FH2584. Optimalizovaná reakční směs o objemu 12,5 µl obsahovala 50 ng templátové DNA, 0,7 U *Taq* polymerázy (Roche) a 5 µg BSA. Koncentrace ostatních komponent PCR reakce byla následující: 10 mM Tris-HCl (pH 8,8), 20 mM (NH₄)₂SO₄, 50 mM KCl, 2,5 mM MgCl₂, 200 M dNTP, 0,48 µM primer FH2584-F, 0,48 µM primer FH2584-R a 2 mM tetramethylamonium oxalát (Top Bio).

Pro amplifikaci PCR byly použity primery pro lokus FH2584.

Sekvence primeru FH2548 R je následující: 5' ACTCAAAGACCTGGAGGGGT 3' a FH2548 F 5' GTTAGGTTACAGTGGGCGT 3'.

Amplifikace probíhala v termocykleru C1000 (BioRad) při následujících podmínkách: 1x (94°C, 3 minuty), 35x (94°C 30 sekund, 67,9°C 30 sekund, 72°C 45 sekund), 1x (72°C 7 minut).

FH 2985

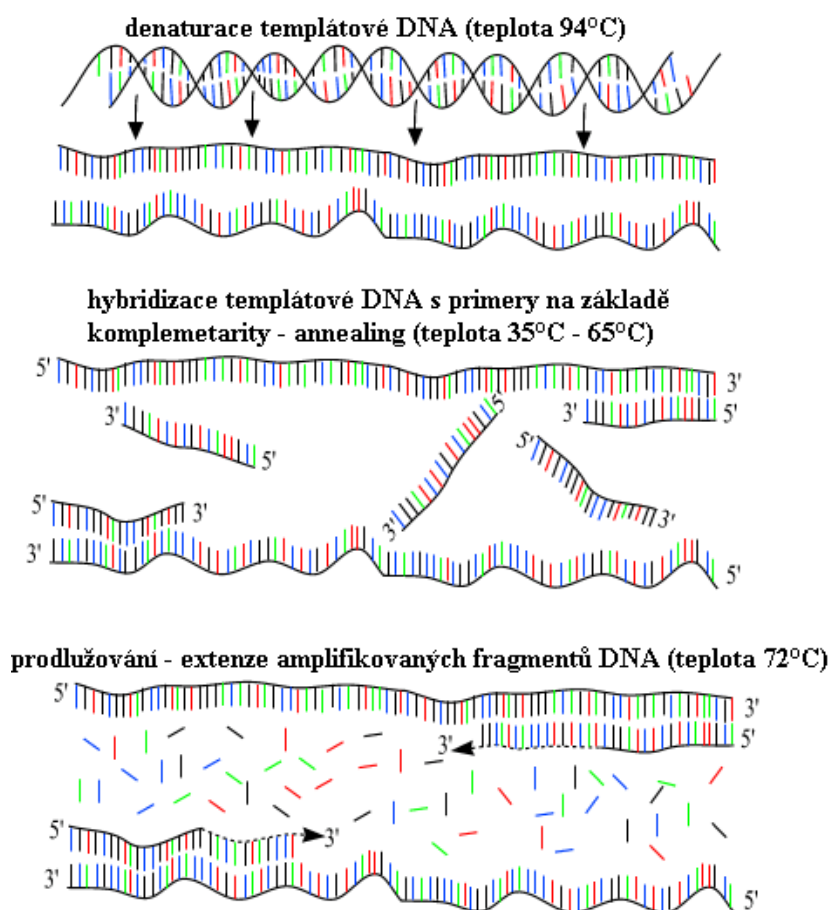
Optimalizovaná reakční směs pro amplifikaci o objemu 12,5 µl obsahovala 50 ng templátové DNA, 0,7 U *Taq* polymerázy (Fermentas) a 5 µg BSA. Koncentrace ostatních komponent PCR reakce byla následující: 10 mM Tris-HCl (pH 8,8), 20 mM (NH₄)₂SO₄, 5 mM MgCl₂, 200 µM dNTP, 0,48 µM primer FH2985-F, 0,48 µM primer FH2985-R a 2 mM tetramethylamonium oxalát (Top Bio).

Pro amplifikaci PCR byly použity primery pro lokus FH2985.

Sekvence primeru FH2985 R je následující: 5' ATGTGTGGAAGCTGAGCTTGG 3' a FH2985 F 5' AGGGGCAACTCAAAGGTAAC 3'.

Amplifikace probíhala v termocykleru C1000 (BioRad) při následujících podmínkách: 1x (94°C, 3 minuty), 35x (94°C 30 sekund, 65,6°C 30 sekund, 72°C 45 sekund), 1x (72°C 7 minut).

Obrázek 1: Schéma metody PCR



Zdroj: Vierstraete (2001)

4.4. Agarózová elektroforéza

Pro všechny analyzované SSR markery byl využit stejný postup elektroforetické separace. Poměr roztoku TBE a agarózy se liší podle požadované koncentrace gelu. Pro přípravu 2% agarózového gelu se smíchá 200 ml TBE 1x a 4 g agarózy v Erlenmayerově baňce. Roztok se ohřívá v mikrovlnné troubě cca 3,5 min, aby došlo k rozpuštění agarózy. Po vyjmutí z mikrovlnné trouby se roztok v kádince odloží na magnetické míchadlo na dobu asi 15 min. Směs by měla zchladnout přibližně na 60°C. Poté se, v ochranných nitrilových rukavicích, přidá 12,5 µl ethidium bromidu a nechá se opět promíchat. Následně se gel nalije do odlévací formy, kde tuhne půl až jednu hodinu při laboratorní teplotě. Poté se vyjmou z polymerizovaného gelu hřebeny a gel se i s nosičem vloží do elektroforetické vany s elektrodovým pufrem.

Vzorky, které se nanášejí na gel obsahují 5 μ l amplifikovaného produktu smíchaného s 2 μ l nanášecí barvy na elektroforézu. Samotný proces elektroforetické separace probíhá při 120 voltech asi 30 minut v elektroforetické cele Sub Cell (Bio Rad, USA) připojené ke zdroji (obrázek 1).

Vizualizace elektroforeogramů byla zajištěna ethidium bromidem. Vizualizace při ultrafialovém záření a jejich archivace probíhá pomocí systému GelDoc (BioRad) s programem QuantityOne (BioRad). Cílem této separace bylo ověření průběhu amplifikace, nikoliv detekce polymorfismů.

Obrázek 2: Cella na agarózovou gelovou elektroforézu



Roztoky a jejich složení:

Vzorkový pufr (Sambrook *et al.*, 1989)

- 0,25% bromfenolové modři - sodná sůl (Serva, SRN)
- 0,25% xylylcyanové modři FF (Sigma, USA)
- 15,0% ficolu (Sigma, USA)
- Vše se nechá rozpustit ve sterilní 2x deionizované H₂O
- Roztok je uchováván při 4°C

10xTBE pufr (Sambrook *et al.*, 1989)

- 450 mM Tris-kyselina boritá (Sigma, USA), pH 8,0
- 10 mM EDTA (Sigma, USA)
- roztok je uchováván při teplotě 4°C

1xTBE pufr (Sambrook *et al.*, 1989)

- 10xTBE pufr je naředěn 1x deionizovanou H₂O
- roztok je uchováván při teplotě 4°C

Zásobní roztok ethidium bromidu (Sambrook *et al.*, 1989)

- 10 mg ethidium bromidu (Sigma, USA)
- 1 ml sterilní 2x deionizované H₂O
- roztok je uchováván ve tmě, při teplotě 4°C
- při přípravě a manipulaci je pracováno v ochranných, sterilních rukavicích

Elektrodový pufr

Pro výrobu tohoto pufru bylo použito:

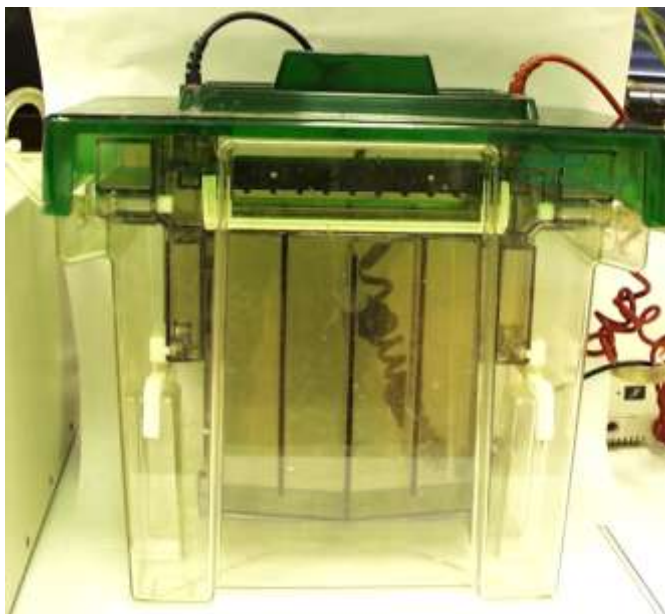
- 1500 ml 1xTBE
- 75 µl zásobního roztoku ethidium bromidu

Pufr je určen pro okamžité použití. Při přípravě a manipulaci bylo pracováno v ochranných, sterilních rukavicích.

4.5. Polyakrylamidová elektroforéza

K samotné detekci polymorfismů slouží elektroforetická separace na 6% polyakrylamidovém denaturačním gelu s poměrem akrylamidu : bis-akrylamidu 19:1 s následujícím postupem použitým u všech hodnocených SSR markerů. Použita byla sekvenační cela Sequi-Gen II cell (Bio-Rad, USA) (obrázek 2).

Obrázek 3: Sestavená elektroforetická cela Protean Xii pro vertikální polyakrilamidovou elektroforézu (Bio Rad, USA)



1) Příprava vzorků pro separaci

Vzorky použité při elektroforetické separaci obsahují:

- 5 μ l amplifikovaného produktu
- 5 μ l denaturačního nanášecího pufru podle Benbouza *et al.* (2006)
- vzorky prodělaly pětiminutovou denaturaci při 94°C, následně byly zchlazeny a zamraženy až do nanášení na gel.

40 ml denaturačního nanášecího pufru podle Benbouza *et al.* (2006) obsahuje:

- 38,19 ml formamidu (99,5%)
- 400 μ l 1M NaOH
- 1,41 ml sterilní 2x deionizovaná H₂O
- 20 mg bromfenolové modři - sodná sůl (Serva, SRN)
- 20 mg xylencyanolové modři FF (Sigma, USA)

2) Příprava sekvenační cely

Je nutné, aby gel zůstal přichycen na volném sklu. Proto se obě skla sekvenační cely musí speciálně ošetřit. Sklo cely s pufrovou komorou se vyleští nasucho a potře 1 ml Antisilanu (Sigma-Cote (Sigma, SRN)). Samostatné sklo se nejprve očistí 96 % etanolem a poté silanizačním roztokem a sekvenační cely se sestaví.

Silanizační roztok:

- 1 ml 96 % etanolu
- 5 µl ledové kyseliny octové
- 3 µl Silanu (3-(metakryloxypropyl)-trimethoxysilan)

3) Příprava a užití gelu

Roztok na přípravu 6 % polyakrylamidového denaturačního gelu („Benbouza“)

100 ml roztoku „Benbouza“ obsahuje:

- 15 ml 40% roztoku akrylamidu a bis-akrylamidu v poměru 19:1
- 10 ml 10x TBE
- 42 g močoviny (výsledná koncentrace močoviny je 8 M)

K polymeraci roztoku a vzniku gelu je nutné přidat:

- 833 µl 10% APS (amonium persulfát)
- 50 µl Temeđu (tetramethylethylendiamin)
- vše rozmícháme na magnetickém míchadle

Po přidání látek do roztoku „Benbouza“ ihned dochází k polymerizaci, proto je nutné mít sestavenou sekvenační celu. Po rozmíchání všech látek se sekvenační cela naplní gelem a zasune hřeben. Gel polymerizuje přibližně 1 hodinu. Po ztuhnutí gelu se cela naplní ohřátým, přibližně 50°C teplým, TBE roztokem, vyjme se hřeben a nanáší se vzorky o objemu přibližně 5 µl. Elektroforetická separace trvá 3,5 hodiny při konstantním výkonu 80 W a přibližně 50°C.

4) Příprava roztoků k barvení gelu

Fixační roztok podle Benbouza et al. (2006)

- 100 ml 96% etanolu
- 5 ml ledové kyseliny octové
- 896 ml 1x deionizované H₂O
- roztok se před použitím ukládá v lednici

Barvicí roztok

- 1,5 g dusičnanu stříbrného
- 1 l 1x deionizovaná H₂O
- roztok se uloží do temna

- těsně před použitím se do něj přidá 3 ml formaldehydu

Vyvíjecí roztok

- 15 g hydroxidu sodného

- 1 l 1x deionizované H₂O

- roztok je uložen při pokojové teplotě

- těsně před použitím se do roztoku přidají 3 ml formaldehydu

5) Barvení gelu

Gel přichycený na volné sklo v důsledku předchozí aplikace silanizačního roztoku se vloží do fixačního roztoku na cca 5 minut. Poté je sklo přibližně 6 až 10 minut ponořeno v barvicím roztoku. Po opláchnutí skla v destilované vodě se ponoří do vyvíjecího roztoku na 5 minut. Inkubační doba ve vyvíjecím roztoku se stanovuje na základě aktuální viditelnosti fragmentů DNA. Zastavení vyvíjecí reakce se provádí ponořením gelu do fixačního roztoku po dobu 5 minut.

4.6. Stastické hodnocení výsledků

4.6.1. Detekce alel mikrosatelitních markerů

Pro tyto analýzy byla použita kolekce zástupců plemen československý vlčák, německý ovčák a Saarloosův vlčák, která je uvedena v tabulce 1. Tato zvířata byla hodnocena mikrosatelitními markery FH2548, FH2584 a FH2985. Při statistickém hodnocení bylo nutno přihlídnout ke specifickým těchto markerů. Markery gonozómu X FH2548, FH2584 a FH2985 jsou u fen zastoupeny 2 alely a u psů pouze 1 alelou.

Získaná data byla následně zpracována programem TFGA (Tools For Population Genetic Analyse) ver.1.3. ve kterém byly konstruovány kladogramy na principu koeficientu genetické vzdálenosti dle Rogers (1972) metodou UPGMA. Výsledky hodnocení jsou prezentovány na grafech 1 a 2.

4.6.2. Stastické vyhodnocení v závislosti distribuce alel mikrosatelitních lokusů FH 2548, FH 2584 a FH 2985 na koeficientu inbreedingu hodnocených zvířat

Pro hodnocení stupně inbreedingu byl použit Wrightův koeficient, který je automaticky počítán v rámci databáze chovných zvířat uvedených na stránkách Svět československého vlčáka (www.wolfdog.org). Koeficienty byly stanoveny na základě

pětigeneračního rodokmenu (Fx 5), osmigeneračního rodokmenu (Fx 8) a na základě maximálního počtu generací, který je v databázi zpracován (Fx max).

Celková databáze plemen československý vlčák, německý ovčák a Saarloosův vlčák čítala tudíž 200 záznamů s přiřazenými hodnotami Fx. Každá fena, která je v rámci gonozómů X diploidní, přispívala do této databáze dvěma haplotypy. Hemizygotní psi přispívali pouze jedním haplotypem. Získané hodnoty Fx byly následně setříděny na základě těchto pravidel:

I. skupina $Fx < 0$; průměr – směrodatná odchylka)

II. skupina $Fx < \text{průměr} - \text{směrodatná odchylka}; \text{průměr} + \text{směrodatná odchylka}$ >

III. skupina $Fx (\text{průměr} + \text{směrodatná odchylka}; 100)$

Konkrétní číselné údaje charakterizující rozdělení do těchto tří skupin jsou součástí kapitoly výsledky.

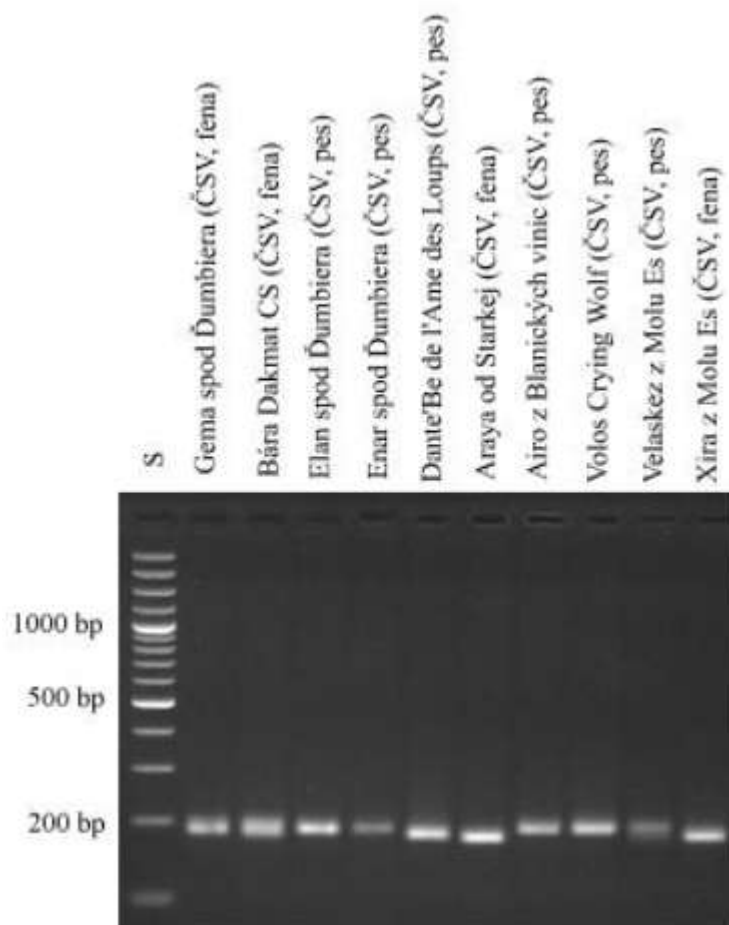
Pro stanovení závislosti zastoupení alel v mikrosatelitních lokusech FH2548, FH2584 a FH2985 na koeficientu inbreedingu byl použit neparametrický χ^2 test, pro výpočet byl použit program Stistica CZ ver. 8 StatSoft.

5. VÝSLEDKY

5.1 Detekce alel mikrosatelitních lokusů FH2548, FH2584 a FH2985

Na následujících obrázcích jsou uvedeny vzorové elektroforeogramy hodnocených mikrosatelitních lokusů. Z obrázku 4 je patrné, že agarózovou elektroforézou lze použít pouze pro ověření amplifikace, nikoliv však pro spolehlivou detekci polymorfismu mikrosatelitních lokusů.

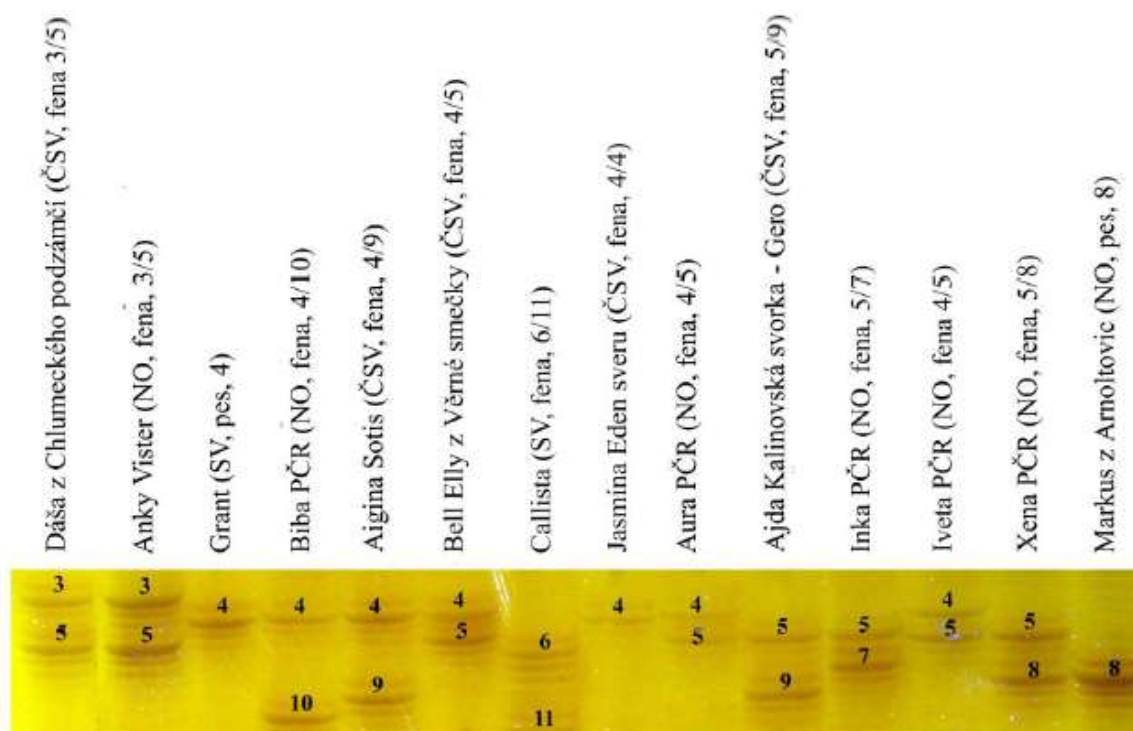
Obrázek 4: Vzorový elektroforeogram separace alel mikrosatelitního lokusu FH2548 vybraných zástupců plemene československý vlčák v agarózovém gelu



Obrázek 5: Vzorový elektroforeogram separace alel mikrosatelitního lokusu FH2548 vybraných zástupců plemen československý vlčák, německý ovčák a Saarloosův vlčák



Obrázek 6: Vzorový elektroforeogram separace alel mikrosatelitního lokusu FH2584 vybraných zástupců plemen československý vlčák, německý ovčák a Saarloosův vlčák



Tabulka 1: Celkový přehled hodnocených jedinců včetně detekovaných alel SSR lokusů – 1. část

Plemeno	Pohlaví	Jméno	FH 2548	FH 2584	FH 2985
Československý vlčák	Fena	Aida Vlčí démon	2/3	5/5	7/7
Československý vlčák	Fena	Aigina Sotis	3/6	4/9	7/7
Československý vlčák	Fena	Ajbix Mrazivé ticho	2/5	2/5	7/7
Československý vlčák	Fena	Ajda Kalinovská svorka - Gero	3/6	5/9	7/7
Československý vlčák	Fena	Akela od Starkej	2/3	5/5	7/7
Československý vlčák	Fena	Aki Polární vlk	2/3	3/5	7/7
Československý vlčák	Fena	Ala Olovnický vlčák	2/6	3/9	7/7
Československý vlčák	Fena	Alexa z Porčova mlýna	2/4	5/9	4/7

2. část

Plemeno	Pohlaví	Jméno	FH 2548	FH 2584	FH 2985
Československý vlčák	Fena	Alpestre Galicyjski Wilk	2/3	4/9	7/7
Československý vlčák	Fena	Amy Zlatá Palz	2/3	5/9	7/7
Československý vlčák	Fena	Aimy Osada Draklem	2/4	3/9	5/7
Československý vlčák	Fena	Anne Lee Srdcerváč	3/3	5/9	7/7
Československý vlčák	Fena	Anteia Sotis	3/6	5/5	7/7
Československý vlčák	Fena	Araya od Starkej	2/3	4/9	7/7
Československý vlčák	Fena	Areia Sotis	2/3	5/5	7/7
Československý vlčák	Fena	Arielle la Seven Loup Cie	2/3	5/5	7/7
Československý vlčák	Fena	Asy Arančino poselství	2/3	0/0	7/7
Československý vlčák	Fena	Aura Polární vlk	2/3	5/5	7/7
Československý vlčák	Fena	Ave Tajga Arimminum	3/5	5/9	7/7
Československý vlčák	Fena	Axa od Rajske chvojky	2/3	5/9	7/7
Československý vlčák	Fena	Ayashee z Revíru vlků	5/6	0/0	7/7
Československý vlčák	Fena	Bára Dakmat CS	2/4	5/9	4/7
Československý vlčák	Fena	Bellisa z Věrné smečky	4/5	0/0	4/7
Československý vlčák	Fena	Bell Elly z Věrné smečky	2/5	4/5	4/7
Československý vlčák	Fena	Besta z Uher	3/4	5/5	7/7
Československý vlčák	Fena	Birsha Osada Draklem	2/3	9/9	7/7
Československý vlčák	Fena	Borka II. z Rosíkova	3/4	5/9	4/7
Československý vlčák	Fena	Callisto z Peronówki	3/4	5/9	7/7
Československý vlčák	Fena	Catananche Stín vlka	3/4	5/5	7/7
Československý vlčák	Fena	Daria z Údolí ticha	3/4	5/9	4/7

3. část

Plemeno	Pohlaví	Jméno	FH 2548	FH 2584	FH 2985
Československý vlčák	Fena	Dáša Chlumecké podzámčí	2/3	3/5	7/7
Československý vlčák	Fena	Desire Sotis	2/3	4/5	7/7
Československý vlčák	Fena	Dia Dakmat	2/4	5/9	4/7
Československý vlčák	Fena	Dolly Dakmat	2/4	5/5	4/7
Československý vlčák	Fena	Dona z Oravy	2/5	5/5	4/7
Československý vlčák	Fena	D'Elestielle de l'Ame des Loups	3/4	5/9	7/7
Československý vlčák	Fena	Felon Eden severu	2/6	5/9	7/7
Československý vlčák	Fena	Fína Dakmat	4/5	5/9	4/7
Československý vlčák	Fena	Gaia Dakmat CS	2/3	5/5	7/7
Československý vlčák	Fena	Gema spod Ďumbiera	2/3	5/5	4/7
Československý vlčák	Fena	Genny Dakmat CS	2/4	4/5	4/7
Československý vlčák	Fena	Gira Dakmat CS	2/3	5/5	7/7
Československý vlčák	Fena	Go-Go z Molu Es	5/6	4/5	7/7
Československý vlčák	Fena	Grace Malý Bysterec	2/3	4/5	4/7
Československý vlčák	Fena	Grey spod Ďumbiera	3/4	5/5	7/7
Československý vlčák	Fena	Heňa Radov dvor	4/4	5/5	7/7
Československý vlčák	Fena	Ina Radov dvor	3/5	5/5	7/7
Československý vlčák	Fena	Inka Radov dvor	3/5	5/5	7/7
Československý vlčák	Fena	Ishtar z Perónowki	3/4	5/5	7/7
Československý vlčák	Fena	Jasmína Eden severu	2/5	4/4	7/7
Československý vlčák	Fena	Jaw z Molu Es	3/5	4/9	7/7
Československý vlčák	Fena	Jolka Radov dvor	3/4	4/5	4/7

4. část

Plemeno	Pohlaví	Jméno	FH 2548	FH 2584	FH 2985
Československý vlčák	Fena	Kala Radov dvor	2/3	0/0	7/7
Československý vlčák	Fena	Khylah van Goverwelle	2/3	4/5	7/7
Československý vlčák	Fena	Laudaj Girios dvasia	2/3	2/5	7/7
Československý vlčák	Fena	Ma Chérie Arimminium	3/5	5/9	7/7
Československý vlčák	Fena	Ossa Eden severu	3/3	5/9	7/7
Československý vlčák	Fena	Sněhurka z Molu	3/5	5/5	7/7
Československý vlčák	Fena	Uny Tossa z Molu Es	2/5	0/0	7/7
Československý vlčák	Fena	Upstream Arimminium	2/5	4/5	7/7
Československý vlčák	Fena	Valkýra z Molu Es	2/5	5/5	7/7
Československý vlčák	Fena	Wolfish Witch z Molu Es	2/3	0/0	7/7
Československý vlčák	Fena	Xira z Molu Es	2/5	5/9	7/7
Československý vlčák	Pes	Agar Reolup	6	5	7
Československý vlčák	Pes	Agar u Hromové Hory	5	5	7
Československý vlčák	Pes	Airo z Blanických vinic	5	5	7
Československý vlčák	Pes	Akar ze Studeného	3	5	7
Československý vlčák	Pes	Akim z Revíru vlků	2	0	7
Československý vlčák	Pes	Amor Sokolí oko	3	0	7
Československý vlčák	Pes	Amore Mio Srdcerváč	3	9	7
Československý vlčák	Pes	Ar' Wann de la Mollyniere de Lo'Scale	3	4	7
Československý vlčák	Pes	Art z Vikroriinej zahrádky	3	5	7
Československý vlčák	Pes	Balder des Plaines de l'Est	4	5	7
Československý vlčák	Pes	Barry z Hvozdecké kotliny	2	9	7

5. část

Plemeno	Pohlaví	Jméno	FH 2548	FH 2584	FH 2985
Československý vlčák	Pes	Ben z Chrlických plání	2	9	7
Československý vlčák	Pes	Brest z Deštné hory	4	5	4
Československý vlčák	Pes	Bhal' Djey Asham de la Mollynire de Lo'Scale	3	4	7
Československý vlčák	Pes	Blade z Malého ráje	3	9	7
Československý vlčák	Pes	Bref od Tištínského potoka	2	5	7
Československý vlčák	Pes	Brest Sotis	2	5	7
Československý vlčák	Pes	Brian Sotis	6	9	7
Československý vlčák	Pes	Bursus Zelený paprsek	3	9	7
Československý vlčák	Pes	Cézar Lupus Bohemia Genao	3	5	7
Československý vlčák	Pes	Cid Osada Draklem	4	5	7
Československý vlčák	Pes	Cir Cleo Sotis	6	9	7
Československý vlčák	Pes	Clif Sotis	2	5	7
Československý vlčák	Pes	Corro Sotis	6	5	7
Československý vlčák	Pes	Danny z Údolí ticha	4	9	4
Československý vlčák	Pes	Dante'Be de l'Ame des Loups	4	9	7
Československý vlčák	Pes	Darek z Údolí ticha	2	9	7
Československý vlčák	Pes	Dark Sotis	3	5	7
Československý vlčák	Pes	Dragoun z Vlčí chaloupky	3	5	7
Československý vlčák	Pes	Drake Twin z Věrné smečky	3	9	7
Československý vlčák	Pes	Elan spod Ďumbiera	3	5	7
Československý vlčák	Pes	Elroy Dakmat	3	5	7
Československý vlčák	Pes	Enar spod Ďumbiera	3	5	4

6. část

Plemeno	Pohlaví	Jméno	FH 2548	FH 2584	FH 2985
Československý vlčák	Pes	Enzo Crying Wolf	3	9	7
Československý vlčák	Pes	Furcas z Peronowki	3	1	7
Československý vlčák	Pes	Gádar Fončorda	4	5	7
Československý vlčák	Pes	Geryon z Peronówki	4	9	7
Československý vlčák	Pes	Good Boy z Molu Es	5	4	7
Československý vlčák	Pes	Gryz spod Ďumbiera	2	5	4
Československý vlčák	Pes	Hron Radov dvor	3	5	7
Československý vlčák	Pes	Chadow de la Louve Blanche	3	5	7
Československý vlčák	Pes	Idun Imbus z Peronówki	6	5	7
Československý vlčák	Pes	Jerry Lee z Molu Es	5	4	7
Československý vlčák	Pes	Kelt z Molu Es	2	2	7
Československý vlčák	Pes	L'Rocco z Molu Es	6	4	7
Československý vlčák	Pes	Leonardo Eden severu	2	9	7
Československý vlčák	Pes	Merlin Crying Wolf	3	5	6
Československý vlčák	Pes	Nuk Šedá eminence	4	2	7
Československý vlčák	Pes	Pinto od Úhoště	5	9	7
Československý vlčák	Pes	Qeron z Molu Es	6	5	7
Československý vlčák	Pes	Quin z Litavské kotliny	2	9	7
Československý vlčák	Pes	Velaskez z Molu Es	2	4	7
Československý vlčák	Pes	Veron z Molu Es	2	4	7
Československý vlčák	Pes	Volos Crying Wolf	2	5	7
Československý vlčák	Pes	Yarl Yanatos Crying Wolf	3	9	7

7. část

Plemeno	Pohlaví	Jméno	FH 2548	FH 2584	FH 2985
Německý ovčák	Fena	Ajša z Otova dvoru	2/4	4/4	3/7
Německý ovčák	Fena	Anky Vister	1/4	3/5	7/7
Německý ovčák	Fena	Arisa PČR	2/2	4/4	7/7
Německý ovčák	Fena	Arven PČR	3/3	4/5	7/7
Německý ovčák	Fena	Aura PČR	3/3	4/5	7/7
Německý ovčák	Fena	Barra Ravel Bohemia	2/4	4/7	6/7
Německý ovčák	Fena	Bety PČR	2/2	4/10	3/7
Německý ovčák	Fena	Biba PČR	2/4	4/10	7/7
Německý ovčák	Fena	Bona PČR	2/4	4/10	7/7
Německý ovčák	Fena	Brila PS	2/4	5/5	3/7
Německý ovčák	Fena	Cita PČR	4/5	5/7	7/7
Německý ovčák	Fena	Gena PČR	2/2	4/4	7/7
Německý ovčák	Fena	Hana PČR	2/3	4/7	7/7
Německý ovčák	Fena	Heny PČR	2/2	4/5	7/7
Německý ovčák	Fena	Chany PČR	2/2	5/10	7/7
Německý ovčák	Fena	Chiara PS	2/3	4/5	7/7
Německý ovčák	Fena	Chuna PČR	2/3	5/10	7/7
Německý ovčák	Fena	Igy z Polabí Boner	1/4	4/7	7/7
Německý ovčák	Fena	Inka PČR	2/5	5/7	3/7
Německý ovčák	Fena	Irma PČR	2/4	4/5	3/7
Německý ovčák	Fena	Iša PČR	2/5	5/7	7/7

8. část

Plemeno	Pohlaví	Jméno	FH 2548	FH 2584	FH 2985
Německý ovčák	Fena	Iveta PČR	2/2	4/5	7/7
Německý ovčák	Fena	Jaga PČR	2/5	4/7	7/7
Německý ovčák	Fena	Jumba PČR	4/5	4/7	7/7
Německý ovčák	Fena	Klea PS	2/2	4/5	7/7
Německý ovčák	Fena	Magie PČR	1/4	0/0	7/7
Německý ovčák	Fena	Panga od Policie	2/2	4/5	7/7
Německý ovčák	Fena	Stella PS	2/4	4/4	7/7
Německý ovčák	Fena	Tara PČR	2/2	5/5	7/7
Německý ovčák	Fena	Tina PČR	2/3	5/5	7/7
Německý ovčák	Fena	Uganda PČR	1/2	4/5	7/7
Německý ovčák	Fena	Una PČR	1/2	4/5	7/7
Německý ovčák	Fena	Urama PČR	1/2	5/5	7/7
Německý ovčák	Fena	Urma PČR	1/2	4/5	7/7
Německý ovčák	Fena	Ursa PČR	1/2	5/5	7/7
Německý ovčák	Fena	Wespa PČR	1/4	4/5	6/7
Německý ovčák	Fena	Xane PČR	2/2	4/5	7/7
Německý ovčák	Fena	Xena PČR	3/4	5/8	7/7
Německý ovčák	Fena	Xila PČR	3/4	4/8	7/7
Německý ovčák	Fena	Xixa PČR	2/3	4/8	7/7
Německý ovčák	Fena	Yane PS	2/4	4/5	3/7
Německý ovčák	Fena	Yza PČR	2/3	4/4	7/7

9. část

Plemeno	Pohlaví	Jméno	FH 2548	FH 2584	FH 2985
Německý ovčák	Fena	Zira PČR	2/2	4/5	7/7
Německý ovčák	Pes	Asko PČR	2	4	7
Německý ovčák	Pes	Alan PČR	2	4	7
Německý ovčák	Pes	Amor PČR	2	4	7
Německý ovčák	Pes	Arek PČR	2	4	7
Německý ovčák	Pes	Baryk PČR	2	4	7
Německý ovčák	Pes	Brix PČR	4	4	7
Německý ovčák	Pes	Hagar PČR	2	5	7
Německý ovčák	Pes	Hetrik PČR	2	5	7
Německý ovčák	Pes	Chadir PČR	2	5	7
Německý ovčák	Pes	Charis PČR	3	5	7
Německý ovčák	Pes	Chavir PČR	3	5	7
Německý ovčák	Pes	Chino PČR	3	5	7
Německý ovčák	Pes	Iro Grey Archibald	2	5	7
Německý ovčák	Pes	Markus z Arnoltovic	1	8	7
Saarloosův vlčák	Fena	Belanka de Daim Pré	5/5	11/11	4/4
Saarloosův vlčák	Fena	Bengalen Rubis De loubata tar	5/5	11/11	4/4
Saarloosův vlčák	Fena	Bruce	4/4	11/11	7/7
Saarloosův vlčák	Fena	Byzance De daim pré	4/4	11/11	4/7
Saarloosův vlčák	Fena	Candy Canelle De loubata tar	4/4	11/11	7/7
Saarloosův vlčák	Fena	Chanelle Callista d'Emozioni Breizh	5/5	6/11	4/6

10. část

Plemeno	Pohlaví	Jméno	FH 2548	FH 2584	FH 2985
Saarloosův vlčák	Fena	Clair de Lure	4/5	11/11	4/4
Saarloosův vlčák	Fena	Diams	5/5	11/11	4/6
Saarloosův vlčák	Fena	Dieppe d'Emozioni Breizh	5/5	6/11	6/6
Saarloosův vlčák	Fena	Diolone	5/5	11/11	4/6
Saarloosův vlčák	Fena	Honey Kiss Wolfsirius	4/4	11/11	6/6
Saarloosův vlčák	Fena	Jura jacinth De louba tar	5/5	11/11	4/6
Saarloosův vlčák	Fena	Kitos	3/5	11/11	4/7
Saarloosův vlčák	Fena	Ura-lou De daim pré	4/5	11/11	4/6
Saarloosův vlčák	Fena	Varich	4/5	11/11	4/7
Saarloosův vlčák	Fena	Wolf Sirius Covername Iris	4/4	11/11	4/5
Saarloosův vlčák	Pes	Abel z Molu	4	11	5
Saarloosův vlčák	Pes	Ararat z Molu	4	11	4
Saarloosův vlčák	Pes	Angel Warrior Miraja	4	11	6
Saarloosův vlčák	Pes	Call Wild of Wolfsirius	4	11	4
Saarloosův vlčák	Pes	Cool Rainbow de Daim Pré	4	11	7
Saarloosův vlčák	Pes	Ehwaz Faelan Ike	4	4	7
Saarloosův vlčák	Pes	Grant	4	4	7
Saarloosův vlčák	Pes	Insieme De louba tar	4	11	7
Saarloosův vlčák	Pes	Tango Timber Eskalupa	5	11	6

Použité mikrosatelitní markery amplifikovaly segment gonozómu X, který je u fen zastoupen dvěma alelami a u psů pouze jednou. Z tohoto důvodu bylo provedeno také hodnocení frekvence výskytu alel zvlášť u psů a zvlášť u fen.

5.1.1 Detekce alel mikrosatelitních lokusů u fen

Pro vyhodnocení polymorfismu alel byl použit program TFPGA, jehož výsledky jsou pro jednotlivá plemena zpracovány v následujících tabulkách. Výskyt alel představuje skutečný počet alel zjištěných u fen daného plemene. Vzhledem k diploidní povaze tohoto markeru, počet alel odpovídá dvojnásobku počtu fen. Frekvence alel představuje relativní výskyt alely uvedený v setinách. Počet heterozygotů představuje skutečný počet fen, u kterých byla konkrétní alela zastoupena v heterozygotní sestavě. Frekvence heterozygotů vyjadřuje relativní četnost heterozygotů s konkrétní alelou, která je rovněž uvedena v setinách. Parametr H_O představuje pozorovanou heterozygotnost daného mikrosatelitního lokusu. Parametr H_E vyjadřuje očekávanou heterozygotnost daného lokusu v případě, že populace by byla v rovnováze podle Hardy - Weinbergova zákona. Tyto dva parametry v případě námi zvoleného způsobu hodnocení však nemůžeme považovat za standardně používaný koeficient v populační genetice, protože soubor hodnocených jedinců jsou pouze feny a populace představuje vždy soubor jedinců obojího pohlaví. Standardní vyhodnocení všech jedinců z pohledu mikrosatelitních lokusů vázaných na gonozóm X nebylo možné provést, protože u psů je detekovatelná pouze jedna alela daných lokusů. Na koeficienty heterozygotnosti lze pohlížet pouze jako na parametry posuzující pouze feny a ne celou populaci.

Tabulka 2: Frekvence alel mikrosatelitního lokusu FH 2548 u fen

FH 2548	československý vlčák			
	Výskyt alely	Frekvence alely	Počet heterozygotů	Frekvence heterozygotů
1	0	0,0000	0,0000	0,0000
2	38	0,3016	38,0000	0,6032
3	44	0,3492	40,0000	0,6349
4	19	0,1508	17,0000	0,2698
5	18	0,1429	18,0000	0,2857
6	7	0,0556	7,0000	0,1111

$$H_E = 0,7468$$

$$H_O = 0,9524$$

Tabulka 3: Frekvence alel mikrostelitního lokusu FH 2548 u fen

FH 2548	německý ovčák			
Alela	Výskyt alely	Frekvence alely	Počet heterozygotů	Frekvence heterozygotů
1	9	0,1047	9,0000	0,2093
2	44	0,5116	22,0000	0,5116
3	12	0,1395	8,0000	0,1860
4	16	0,1860	16,0000	0,3721
5	5	0,0581	5,0000	0,1163
6	0	0,0000	0,0000	0,0000

$$H_E = 0,6777$$

$$H_O = 0,6977$$

Tabulka 4: Frekvence alel mikrostelitního lokusu FH 2548 u fen

FH 2548	Saarloosův vlčák			
Alela	Výskyt alely	Frekvence alely	Počet heterozygotů	Frekvence heterozygotů
1	0	0,0000	0,0000	0,0000
2	0	0,0000	0,0000	0,0000
3	1	0,0313	1,0000	0,0625
4	13	0,4063	3,0000	0,1875
5	18	0,5625	4,0000	0,2500
6	0	0,0000	0,0000	0,0000

$$H_E = 0,5343$$

$$H_O = 0,2500$$

Tabulka 5: Frekvence alel mikrostelitního lokusu FH 2584 u fen

FH 2584	československý vlčák			
Alela	Výskyt alely	Frekvence alely	Počet heterozygotů	Frekvence heterozygotů
0	12	0,0952	0	0,0000
2	2	0,0159	2	0,0317
3	4	0,0317	4	0,0635
4	14	0,1111	12	0,1905
5	69	0,5476	29	0,4603
6	0	0,0000	0	0,0000
7	0	0,0000	0	0,0000
8	0	0,0000	0	0,0000
9	25	0,1984	23	0,3651
10	0	0,0000	0	0,0000
11	0	0,0000	0	0,0000

$H_E = 0,6432$

$H_O = 0,5556$

Tabulka 6: Frekvence alel mikrostelitního lokusu FH 2584 u fen

FH 2584	německý ovčák			
Alela	Výskyt alely	Frekvence alely	Počet heterozygotů	Frekvence heterozygotů
0	2	0,0233	0	0,0000
2	0	0,0000	0	0,0000
3	1	0,0116	1	0,0233
4	35	0,4070	25	0,5814
5	32	0,3721	22	0,5116
6	0	0,0000	0	0,0000
7	8	0,0930	8	0,1860
8	3	0,0349	3	0,0698
9	0	0,0000	0	0,0000
10	5	0,0581	5	0,1163
11	0	0,0000	0	0,0000

$H_E = 0,6900$

$H_O = 0,7442$

Tabulka 7: Frekvence alel mikrostelitního lokusu FH 2584 u fen

FH 2584	Saarloosův vlčák			
Alela	Výskyt alely	Frekvence alely	Počet heterozygotů	Frekvence heterozygotů
0	0	0,0000	0	0,0000
2	0	0,0000	0	0,0000
3	0	0,0000	0	0,0000
4	0	0,0000	0	0,0000
5	0	0,0000	0	0,0000
6	2	0,0625	2	0,1250
7	0	0,0000	0	0,0000
8	0	0,0000	0	0,0000
9	0	0,0000	0	0,0000
10	0	0,0000	0	0,0000
11	30	0,9375	2	0,1250

$$H_E = 0,1210$$

$$H_O = 0,1250$$

Tabulka 8: Frekvence alel mikrostelitního lokusu FH 2985 u fen

FH 2985	československý vlčák			
Alela	Výskyt alely	Frekvence alely	Počet heterozygotů	Frekvence heterozygotů
3	0	0,0000	0	0,0000
4	14	0,1111	14	0,2222
5	1	0,0079	1	0,0159
6	0	0,0000	0	0,0000
7	111	0,8810	15	0,2381

$$H_E = 0,2132$$

$$H_O = 0,2381$$

Tabulka 9: Frekvence alel mikrostelitního lokusu FH 2985 u fen

FH 2985	německý ovčák			
Alela	Výskyt alely	Frekvence alely	Počet heterozygotů	Frekvence heterozygotů
3	6	0,0698	6	0,1395
4	0	0,0000	0	0,0000
5	0	0,0000	0	0,0000
6	2	0,0233	2	0,0465
7	78	0,9070	8	0,1860

$$H_E = 0,1740$$

$$H_O = 0,1860$$

Tabulka 10: Frekvence alel mikrostelitního lokusu FH 2985 u fen

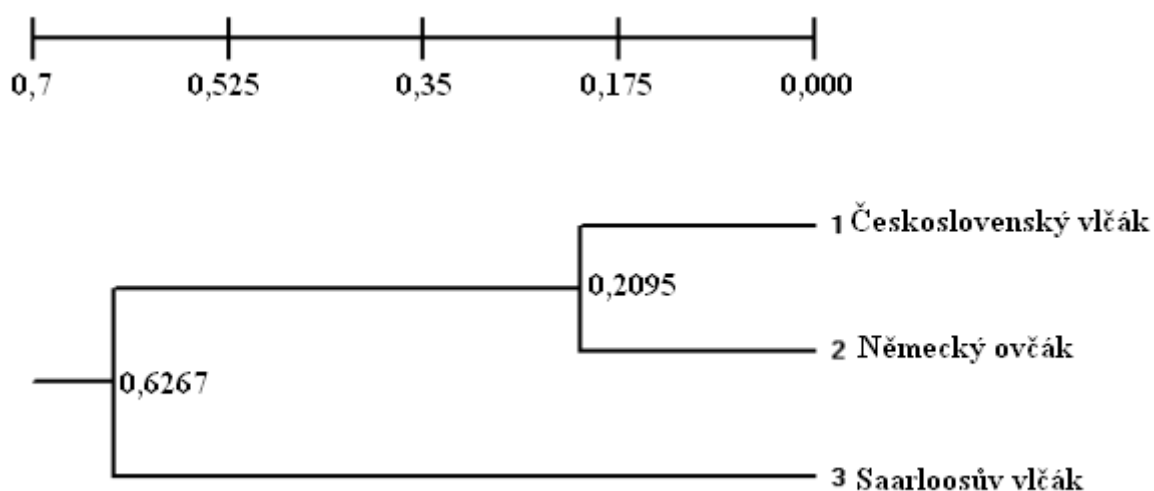
FH 2985	Saarloosův vlčák			
	Výskyt alely	Frekvence alely	Počet heterozygotů	Frekvence heterozygotů
3	0	0,0000	0	0,0000
4	15	0,4688	9	0,5625
5	1	0,0313	1	0,0625
6	9	0,2813	5	0,3125
7	7	0,2188	3	0,1875

$$H_E = 0,6734$$

$$H_O = 0,5625$$

Získaná data byla následně zpracována programem TFPGA (Tools For Population Genetic Analyse) ver.1.3. ve kterém byly konstruovány kladogramy na principu koeficientu genetické vzdálenosti dle Rogers (1972) metodou UPGMA. Tento program využívá v molekulární taxonomii a evoluční biologii řada autorů. Hodnota koeficientu vyjadřuje v desetinném čísle genetickou vzdálenost mezi alelami všech tří hodnocených mikrosatelitních lokusů. Nulová hodnota znamená stoprocentní identitu v distribuci alel mezi porovnávanými skupinami. Výsledky hodnocení jsou prezentovány na grafu 1.

Graf 1: Kladogram vyjadřující genetickou vzdálenost mezi fenami plemen československého vlčáka, německého ovčáka a Saarloosova vlčáka



Feny plemene Saarloosův vlčák se od dalších dvou skupin fen odlišují hodnotou Rogersova koeficientu 0,6267.

5.1.2 Detekce alel mikrosatelitních lokusů u psů

U každého psa je zastoupena alela mikrosatelitního lokusu lokalizovaného na gonozómu X pouze jedenkrát, psi jsou z hlediska tohoto markeru vždy hemizygotní. Výskyt alely v podstatě odpovídá počtu psů, kteří tuto alelu mají. Frekvence alely, uvedená v setinách, představuje relativní výskyt této alely u souboru hodnocených psů. Vzhledem k hemizygotní povaze markeru není možné stanovit úroveň heterozygotnosti.

Tabulka 11: Frekvence alel mikrosatelitního lokusu FH 2548

FH 2548	československý vlčák	
Alela	Výskyt alely	Frekvence alely
1	0	0,0000
2	14	0,2545
3	21	0,3818
4	8	0,1455
5	5	0,0909
6	7	0,1273

Tabulka 12: Frekvence alel mikrosatelitního lokusu FH 2548

FH 2548	německý ovčák	
Alela	Výskyt alely	Frekvence alely
1	1	0,0714
2	9	0,6429
3	3	0,2143
4	1	0,0714
5	0	0,0000
6	0	0,0000

Tabulka 13: Frekvence alel mikrosatelitního lokusu FH 2548

FH 2548	Saarloosův vlčák	
Alela	Výskyt alely	Frekvence alely
1	0	0,0000
2	0	0,0000
3	0	0,0000
4	8	0,8889
5	1	0,1111
6	0	0,0000

Tabulka 14: Frekvence alel mikrostelitního lokusu FH 2584

FH 2584	československý vlčák	
Alela	Výskyt alely	Frekvence alely
0	2	0,0364
1	1	0,0182
2	2	0,0364
4	7	0,1273
5	26	0,4727
8	0	0,0000
9	17	0,3091
11	0	0,0000

Tabulka 15: Frekvence alel mikrostelitního lokusu FH 2584

FH 2584	německý ovčák	
Alela	Výskyt alely	Frekvence alely
0	0	0,0000
1	0	0,0000
2	0	0,0000
4	6	0,4286
5	7	0,5000
8	1	0,0714
9	0	0,0000
11	0	0,0000

Tabulka 16: Frekvence alel mikrostelitního lokusu FH 2584

FH 2584	Saarloosův vlčák	
Alela	Výskyt alely	Frekvence alely
0	0	0,0000
1	0	0,0000
2	0	0,0000
4	2	0,2222
5	0	0,0000
8	0	0,0000
9	0	0,0000
11	7	0,7778

Tabulka 17: Frekvence alel mikrostelitního lokusu FH 2985

FH 2985	československý vlčák	
Alela	Výskyt alely	Frekvence alely
4	4	0,0727
5	0	0,0000
6	1	0,0182
7	50	0,9091

Tabulka 18: Frekvence alel mikrostelitního lokusu FH 2985

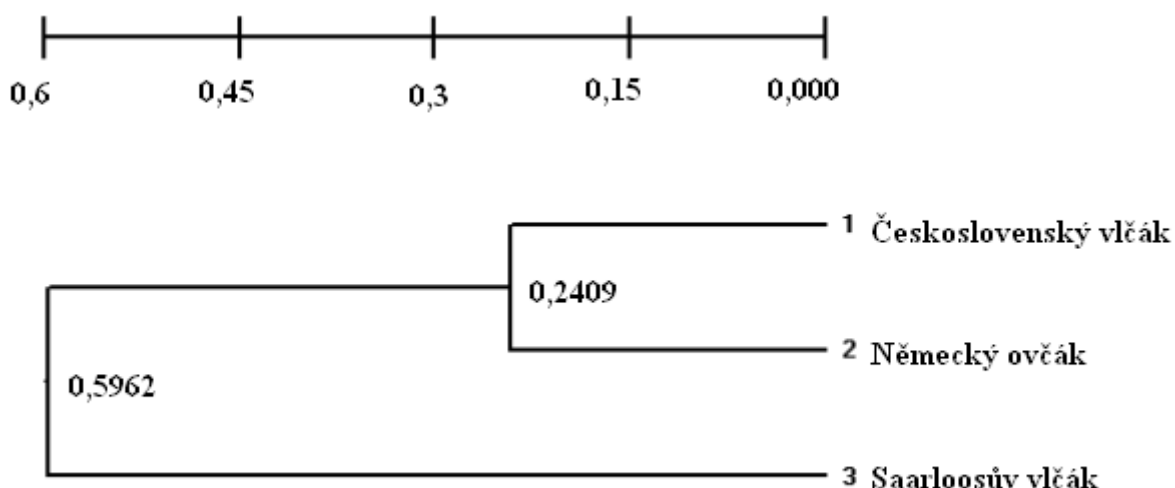
FH 2985	německý ovčák	
Alela	Výskyt alely	Frekvence alely
4	0	0,0000
5	0	0,0000
6	0	0,0000
7	14	1,0000

Tabulka 19: Frekvence alel mikrostelitního lokusu FH 2985

FH 2985	Saarloosův vlčák	
Alela	Výskyt alely	Frekvence alely
4	2	0,2222
5	1	0,1111
6	2	0,2222
7	4	0,4444

Získaná data byla následně zpracována programem TFPGA ve kterém byly konstruovány kladogramy na principu koeficientu genetické vzdálenosti dle Rogers (1972) metodou UPGMA. Hodnota koeficientu vyjadřuje v desetinném čísle genetickou vzdálenost mezi alelami všech tří hodnocených mikrosatelitních lokusů. Výsledky hodnocení jsou prezentovány na grafu 2.

Graf 2: Kladogram vyjadřující genetickou vzdálenost mezi psi plemen československého vlčáka, německého ovčáka a Saarloosova vlčáka



Psi plemene Saarloosův vlčák se od dalších dvou skupin psů odlišují hodnotou Rogersova koeficientu 0,5962.

5.2. Stastické vyhodnocení v závislosti distribuce alel mikrosatelitních lokusů FH2548, FH 2584 a FH 2985 na koeficientu imbreedingu hodnocených zvířat

5.2.1 Rozdělení zvířat do skupin podle hodnot koeficientu imbreedingu

Pro hodnocení stupně imbreedingu byl použit Wrightův koeficient, který je automaticky počítán v rámci databáze chovných zvířat uvedených na stránkách Svět československého vlčáka (www.wolfdog.org). Bylo hodnoceno 200 vybraných jedinců uvedených v tabulce 1. Pro charakteristiku koeficientu imbreedingu byly použity následující statistické parametry – aritmetický průměr (\bar{x}), směrodatná odchylka (s) a variační koeficient (V_k). Dále byla data rozdělena do tří skupin A, B, C podle uvedených kritérií uvedených v tabulce 20.

Tabulka 20: Základní statistické parametry u vybraného souboru

Parametr	\bar{x}	s	V_k [%]	N	A (<0; \bar{x} -s)	B (< \bar{x} -s; \bar{x} +s>)	C (\bar{x} +s; 100>)
Fx 5	9,460	5,145	54,383	200	(0-4,3153)	(4,3153 - 14,6047)	(14,6047 - ∞)
Fx 8	18,431	4,376	23,744	200	(0 – 14,05491)	(14,0549– 2,80709)	(22,80709- ∞)
Fx max	20,744	4,033	19,441	200	(0 – 16,711174)	(16,711174– 4,777)	(24,777- ∞)

5.2.2 Stanovení závislosti distribuce alel mikrosatelitních lokusů FH 2548, FH 2584 a FH 2985 na hodnotě Fx u všech zvířat bez ohledu na pohlaví

Tabulka 21: Statistické porovnání zastoupení jednotlivých alel mikrosatelitního lokusu FH 2548 mezi třemi skupinami genotypů stanovenými na základě hodnot Fx

FH 2548	Fx 5	Fx 8	Fx max
A x B	$\chi^2 = 3,690699$ p = 0,44948	$\chi^2 = 4,347888$ p = 0,36097	$\chi^2 = 10,21603$ p = 0,03695
A x C	$\chi^2 = 10,05952 *$ p = 0,01807	$\chi^2 = 15,09222 *$ p = 0,00452	$\chi^2 = 17,06835 *$ p = 0,00188
B x C	$\chi^2 = 12,72810 *$ p = 0,01269	$\chi^2 = 11,65647 *$ p = 0,02010	$\chi^2 = 8,109071$ p = 0,08767

* Na hladině významnosti $\alpha = 0,05$ byly zjištěny statistické významné rozdíly v podílech jednotlivých alel mezi porovnávanými skupinami zvířat bez ohledu na pohlaví

Tabulka 22: Statistické porovnání zastoupení jednotlivých alel mikrosatelitního lokusu FH 2584 mezi třemi skupinami genotypů stanovenými na základě hodnot Fx

FH 2584	Fx 5	Fx 8	Fx max
A x B	$\chi^2 = 2,409930$ p = 0,87841	$\chi^2 = 17,13090$ * p = 0,00882	$\chi^2 = 10,21603$ * p = 0,03695
A x C	$\chi^2 = 13,08576$ * p = 0,02259	$\chi^2 = 13,06390$ * p = 0,02279	$\chi^2 = 17,06835$ * p = 0,00188
B x C	$\chi^2 = 10,01875$ p = 0,12388	$\chi^2 = 3,764663$ p = 0,70849	$\chi^2 = 8,109071$ p = 0,08767

* Na hladině významnosti $\alpha = 0,05$ byly zjištěny statistické významné rozdíly v podílech jednotlivých alel mezi porovnávanými skupinami zvířat bez ohledu na pohlaví

Tabulka 23: Statistické porovnání zastoupení jednotlivých alel mikrosatelitního lokusu FH 2985 mezi třemi skupinami genotypů stanovenými na základě hodnot Fx

FH 2985	Fx 5	Fx 8	Fx max
A x B	$\chi^2 = 1,888301$ p = 0,16940	$\chi^2 = 1,522199$ p = 0,21729	$\chi^2 = 0,1686265$ p = 0,91914
A x C	$\chi^2 = 7,317073$ p = 0,06246	$\chi^2 = 4,519231$ p = 0,21059	$\chi^2 = 1,464493$ p = 0,48083
B x C	$\chi^2 = 14,13573$ * p = 0,00273	$\chi^2 = 10,83092$ * p = 0,01268	$\chi^2 = 7,611865$ p = 0,05476

* Na hladině významnosti $\alpha = 0,05$ byly zjištěny statistické významné rozdíly v podílech jednotlivých alel mezi porovnávanými skupinami zvířat bez ohledu na pohlaví

5.2.3 Stanovení závislosti distribuce alel mikrosatelitních lokusů FH 2548, FH 2584 a FH 2985 na hodnotě Fx u všech fen

Tabulka 24: Statistické porovnání zastoupení jednotlivých alel mikrosatelitního lokusu FH 2548 mezi třemi skupinami fen stanovenými na základě hodnot Fx

FH 2548	Fx 5	Fx 8	Fx max
Feny A x Feny B	$\chi^2 = 3,496112$ p = 0,47847	$\chi^2 = 3,628186$ p = 0,45866	$\chi^2 = 4,717619$ p = 0,31952
Feny A x Feny C	$\chi^2 = 9,377105$ * p = 0,02468	$\chi^2 = 10,33580$ * p = 0,03514	$\chi^2 = 7,311111$ p = 0,12034
Feny B x Feny C	$\chi^2 = 10,80512$ * p = 0,02885	$\chi^2 = 7,825502$ p = 0,09819	$\chi^2 = 2,995986$ p = 0,55850

* Na hladině významnosti $\alpha = 0,05$ byly zjištěny statistické významné rozdíly v podílech jednotlivých alel mezi porovnávanými skupinami fen

Tabulka 25: Statistické porovnání zastoupení jednotlivých alel mikrosatelitního lokusu FH 2584 mezi třemi skupinami fen stanovenými na základě hodnot Fx

FH 2584	Fx 5	Fx 8	Fx max
Feny A x Feny B	$\chi^2 = 5,622958$ p = 0,34466	$\chi^2 = 24,58005$ * p = 0,00017	$\chi^2 = 13,95767$ * p = 0,01589
Feny A x Feny C	$\chi^2 = 5,925926$ p = 0,20476	$\chi^2 = 6,004445$ p = 0,30580	$\chi^2 = 3,102137$ p = 0,68424
Feny B x Feny C	$\chi^2 = 6,954703$ p = 0,22404	$\chi^2 = 1,517691$ p = 0,82350	$\chi^2 = 1,377079$ p = 0,84817

* Na hladině významnosti $\alpha = 0,05$ byly zjištěny statistické významné rozdíly v podílech jednotlivých alel mezi porovnávanými skupinami fen

Tabulka 26: Statistické porovnání zastoupení jednotlivých alel mikrosatelitního lokusu FH 2985 mezi třemi skupinami fen stanovenými na základě hodnot Fx

FH 2985	Fx 5	Fx 8	Fx max
Feny A x Feny B	$\chi^2 = 1,377551$ p = 0,24052	$\chi^2 = 1,249737$ p = 0,26361	$\chi^2 = 0,2346686$ p = 0,88929
Feny A x Feny C	$\chi^2 = 4,000000$ p = 0,13534	$\chi^2 = 2,592592$ p = 0,27355	$\chi^2 = 0,0972222$ p = 0,75519
Feny B x Feny C	$\chi^2 = 7,579666$ * p = 0,02260	$\chi^2 = 6,028866$ * p = 0,04908	$\chi^2 = 0,5676532$ p = 0,75290

* Na hladině významnosti $\alpha = 0,05$ byly zjištěny statistické významné rozdíly v podílech jednotlivých alel mezi porovnávanými skupinami fen

5.2.4 Stanovení závislosti distribuce alel mikrosatelitních lokusů FH 2548, FH 2584 a FH 2985 na hodnotě Fx u všech psů

Tabulka 27: Statistické porovnání zastoupení jednotlivých alel mikrosatelitního lokusu FH 2548 mezi třemi skupinami psů stanovenými na základě hodnot Fx

FH 2548	Fx 5	Fx 8	Fx max
Psi A x Psi B	$\chi^2 = 2,352536$ p = 0,67122	$\chi^2 = 2,622405$ p = 0,62286	$\chi^2 = 16,18500$ * p = 0,00278
Psi A x Psi C	$\chi^2 = 1,616162$ p = 0,65573	$\chi^2 = 4,372468$ p = 0,22396	$\chi^2 = 11,59091$ * p = 0,00893
Psi B x Psi C	$\chi^2 = 5,882916$ p = 0,20807	$\chi^2 = 7,539500$ p = 0,10999	$\chi^2 = 5,914131$ p = 0,20566

* Na hladině významnosti $\alpha = 0,05$ byly zjištěny statistické významné rozdíly v podílech jednotlivých alel mezi porovnávanými skupinami psů

Tabulka 28: Statistické porovnání zastoupení jednotlivých alel mikrosatelitního lokusu FH 2584 mezi třemi skupinami psů stanovenými na základě hodnot Fx

FH 2584	Fx 5	Fx 8	Fx max
Psi A x Psi B	$\chi^2 = 7,406008$ p = 0,19216	$\chi^2 = 13,86249$ * p = 0,01651	$\chi^2 = 13,29432$ * p = 0,02078
Psi A x Psi C	$\chi^2 = 7,575758$ * p = 0,02265	$\chi^2 = 14,31169$ * p = 0,00078	$\chi^2 = 10,39773$ * p = 0,01547
Psi B x Psi C	$\chi^2 = 3,485315$ p = 0,62561	$\chi^2 = 4,451119$ p = 0,48645	$\chi^2 = 5,662523$ p = 0,22582

* Na hladině významnosti $\alpha = 0,05$ byly zjištěny statistické významné rozdíly v podílech jednotlivých alel mezi porovnávanými skupinami psů

Tabulka 29: Statistické porovnání zastoupení jednotlivých alel mikrosatelitního lokusu FH 2985 mezi třemi skupinami psů stanovenými na základě hodnot Fx

FH 2985	Fx 5	Fx 8	Fx max
Psi A x Psi B	$\chi^2 = 0,2738739$ p = 0,60075	$\chi^2 = 0,1658986$ p = 0,68378	$\chi^2 = 0,2409266$ p = 0,62354
Psi A x Psi C	$\chi^2 = 3,333333$ p = 0,18888	$\chi^2 = 1,809524$ p = 0,40464	$\chi^2 = 1,363636$ p = 0,50570
Psi B x Psi C	$\chi^2 = 7,600676$ * p = 0,02237	$\chi^2 = 6,506336$ * p = 0,03866	$\chi^2 = 5,114349$ p = 0,07753

* Na hladině významnosti $\alpha = 0,05$ byly zjištěny statistické významné rozdíly v podílech jednotlivých alel mezi porovnávanými skupinami psů

5.2.5 Stanovení závislosti distribuce alel mikrosatelitních lokusů FH 2548, FH 2584 a FH 2985 na hodnotě Fx u všech psů a fen

Tabulka 30: Statistické porovnání zastoupení alel mikrosatelitního lokusu FH 2548 u psů a fen ve skupinách vytvořených na základě hodnot Fx

FH 2548	Fx 5	Fx 8	Fx max
Psi A x Feny A	$\chi^2 = 2,589286$ p = 0,45937	$\chi^2 = 1,071429$ p = 0,78398	$\chi^2 = 3,928571$ p = 0,41576
Psi B x Feny B	$\chi^2 = 4,146502$ p = 0,38655	$\chi^2 = 5,369081$ p = 0,25149	$\chi^2 = 6,196738$ p = 0,18494
Psi C x Feny C	$\chi^2 = 3,032408$ p = 0,21955	$\chi^2 = 2,285714$ p = 0,31891	$\chi^2 = 1,244589$ p = 0,53671
Psi celkem x Feny celkem	$\chi^2 = 3,485995$ p = 0,48002	$\chi^2 = 3,275870$ p = 0,51277	$\chi^2 = 3,275870$ p = 0,51277

* Na hladině významnosti $\alpha = 0,05$ byly zjištěny statistické významné rozdíly v podílech jednotlivých alel mezi skupinami psů a fen

Tabulka 31: Statistické porovnání zastoupení alel mikrosatelitního lokusu FH 2584 u psů a fen ve skupinách vytvořených na základě hodnot Fx

FH 2584	Fx 5	Fx 8	Fx max
Psi A x Feny A	$\chi^2 = 8,472222$ p = 0,07574	$\chi^2 = 11,14286$ * p = 0,02501	$\chi^2 = 4,226191$ p = 0,51733
Psi B x Feny B	$\chi^2 = 7,445498$ p = 0,28161	$\chi^2 = 9,338939$ p = 0,15541	$\chi^2 = 7,328237$ p = 0,19736
Psi C x Feny C	$\chi^2 = 0,7017544$ p = 0,70407	$\chi^2 = 3,555556$ p = 0,46949	$\chi^2 = 3,212595$ p = 0,36000
Psi celkem x Feny celkem	$\chi^2 = 6,993755$ p = 0,31243	$\chi^2 = 6,993755$ p = 0,32143	$\chi^2 = 6,993755$ p = 0,32143

* Na hladině významnosti $\alpha = 0,05$ byly zjištěny statistické významné rozdíly v podílech jednotlivých alel mezi skupinami psů a fen

Tabulka 32: Statistické porovnání zastoupení alel mikrosatelitního lokusu FH 2985 u psů a fen ve skupinách vytvořených na základě hodnot Fx

FH 2985	Fx 5	Fx 8	Fx max
Psi A x Feny A	$\chi^2 = 0$ p = 1	$\chi^2 = 0$ p = 1	$\chi^2 = 0,555556$ p = 0,45606
Psi B x Feny B	$\chi^2 = 1,439288$ p = 0,23026	$\chi^2 = 1,785860$ p = 0,18143	$\chi^2 = 1,020119$ p = 0,60046
Psi C x Feny C	$\chi^2 = 2,222222$ p = 0,52759	$\chi^2 = 2,201058$ p = 0,353174	$\chi^2 = 1,180976$ p = 0,55406
Psi celkem x Feny celkem	$\chi^2 = 3,270243$ p = 0,35181	$\chi^2 = 3,270243$ p = 0,35181	$\chi^2 = 3,270243$ p = 0,35181

* Na hladině významnosti $\alpha = 0,05$ byly zjištěny statistické významné rozdíly v podílech jednotlivých alel mezi skupinami psů a fen

6. DISKUZE

6.1. Hodnocení populace, odběr vzorků a izolace DNA

Získávat vysokomolekulární DNA z živočišného materiálu, v našem případě ze psů, je možné různými způsoby. Velmi často je izolace DNA prováděna ze vzorku krve (Vilà a Wayne, 1999). Hartmanová *et al.* (2008) navrhuje další metody, jako je odběr vzorků DNA ze slin, tkáně, moči a chlupových cibulek. Izolaci DNA z tkání použili Andersone *et al.* (2002). Tento způsob izolace zvolili při hodnocení míry příbuznosti vlků a psů v Litvě. Při takovéto analýze není možné přímé odebrání vzorků divokých zvířat. Tkáně byly zajištěny lovci při lovu, sběrem uhynulých zvířat nebo odchycením mláďat. Izolaci DNA z krve a zubů provedl ve své studii Vilà *et al.* (2003b). Při tomto výzkumu byly použity zubní vzorky mrtvých zvířat uchovaných v muzeích. Při řešení této práce se extrakce DNA z krevních vzorků nejevila jako optimální. K odběrům vzorků krve je nutná přítomnost veterinárního lékaře, souhlas majitele a zajištění sterilních podmínek. Jelikož k odběru námi použitých vzorků docházelo na výstavách a jiných společenských akcích, byla by tato metoda vhodná spíše pro laboratoř spolupracující s veterinární klinikou. Také protože se jedná o poměrně stresující zákrok pro psa, často bychom se mohli setkat s nesouhlasem majitele. Náročné je také uchování tkáňových a krevních vzorků, kdy musí být uloženy ve 100% ethanolu a Tris/SDS pufru při -20°C. Dalším způsobem získávání DNA jsou sběry krve hárajících fen či vlčic. Tento způsob odběru nebývá problémem především v zimě, kdy je krev uchovávána při nižších teplotách a nedochází k degradaci DNA. Dále je možná izolace z chlupových cibulek. Tato metoda byla také používána v naší laboratoři a je možné ji využít i ke sběru vzorků ve volné přírodě např. sběrem chomáčků chlupů ze země, zachycených v kůře stromů apod. Tento způsob není vždy ideální, závisí totiž na přítomnosti chlupové cibulky, jejíž absence bývá častá u vylínalých chlupů. Po přelínání zvířete je možné získat nejkvalitnější materiál pro izolaci DNA z chlupových cibulek. Izolace DNA byla prováděna kitem NucleoSpin TissueXS (Macherey-Nagel, SRN), který se používá též pro izolaci z buněk bukálních sliznic.

Při řešení diplomové práce se z praktického hlediska jevila nejvýhodněji izolace DNA získaná ze setřených bukálních buněk. Jedná se o otěr buněk vnitřní tvářové sliznice na sterilní cytologické kartáčky „Cytobrush“. Kartáček se vsunul do tlamy a krouživými pohyby po vnitřní straně lící se provedl bukální stěr. Pro správný odběr vzorku DNA bylo nezbytné, aby zvíře alespoň dvě hodiny nepřijímalo žádnou potravu. S kartáčkem bylo po celou dobu manipulováno asepticky a po oschnutí (aby nedocházelo k degradaci DNA) byl kartáček ihned zchlazen a pro pozdější použití uložen v mrazícím boxu při -20°C.

Pro izolaci nukleových kyselin z různých biologických materiálů je vyráběna řada kitů. Metoda izolace DNA prostřednictvím kitu zajišťuje zachování identických podmínek při izolaci, sterilitu vzorku a celkový proces izolace je dále reprodukovatelný, spolehlivý a rychlý. Byly nalezeny ale i informace o použití izolace DNA z tkání fenol-chloroformovou purifikační metodou (Vilà a Wayne, 1997; Sundqvist *et al.*, 2001; Lieberg *et al.*, 2004). Pro izolaci DNA ze vzorků zubů použil Vilà *et al.* (2003b) Isoquick DNA extraction kit (Orca Research Inc., Bothell, WA, USA). Pro izolaci DNA z exkrementů použil Lieberg *et al.* (2004) Qiamp DNA stool mini kit (Qiagen, Valencia, CA, USA). Pro izolaci DNA z krve hárajících vlčic byl použit kit Qiagen (Liberg *et al.*, 2005). Pro izolaci DNA z bukálních buněk u lidí Poetsch *et al.* (2009) použil Invisorb Forensic Kit (Invitec, Berlin, Germany).

Při řešení diplomové práce byl pro vlastní izolaci použit kit NucleoSpin TissueXS (Macherey-Nagel, SRN) podle návodu, který výrobce doporučuje pro izolaci z chlupových cibulek a dodává společně s kitem. Vilà a Wayne (1999) použil pro Asch *et al.* (2010) použil metodu využívající Chelex. Pro odběr bukálních buněk je nezbytná krotkost a úplná socializace zvířat. U divoce žijících zvířat je tento způsob nemožný bez použití uspávacích narkotik. U československých vlčáků byl odběr prováděn především majitelem, chovatelem či Ing. Danielou Čílovou. Odběr vzorků německých ovčáků byl prováděn v chovné stanici npor. Bc. Vápeníka v Prackovicích nad Labem, kde jsou zvířata velmi dobře socializovaná. Odběr pouze majitelem byl prováděn především u psů bojácnějších povah (řada jedinců Saarlosových vlčáků). Odběr cytologickým kartáčkem byl výhodou u těchto větších plemen psů, kdy velikost kartáčku byla adekvátní k velikosti tlamy. Při našem výzkumu došlo k eliminaci chyb laboratorní analýzy a celkové optimalizaci metody izolace.

Na řešení této práce byla shromážděna skupina jedinců (tabulka 1) plemene československý vlčák, německý ovčák a Saarloosův vlčák. Bylo hodnoceno celkem 113 jedinců československého vlčáka, 57 jedinců německého ovčáka a 25 jedinců Saarloosova vlčáka. Nejpočetnější skupina vzorků byla zastoupena plemenem československý vlčák, které má u nás dlouhou tradici a je našim národním plemenem. Množství hodnocených genotypů Saarloosových vlčáků bylo menší z důvodu malého rozšíření plemene mimo zemi svého původu – Holandska, kde je toto plemeno, stejně jako u nás československý vlčák, národním bohatstvím. Během řešení této diplomové práce se u nás narodily pouze 3-4 vrhy štěňat Saarloosových vlčáků. Hodnocená populace německých ovčáků také nebyla příliš početná i přes velké rozšíření těchto zvířat po celém světě. Cílem této diplomové práce nebylo studovat variabilitu německých ovčáků a proto populace tohoto plemene sloužila pouze jako

srovnávací pro předchozí dvě. Vybraní psy byly fenotypově variabilní, hlavně z hlediska zbarvení.

6.2. Detekce alel mikrosatelitních lokusů FH2548, FH2584 a FH2985

K detekování variability v populaci bývá dnes často používáno mikrosatelitů. Vybraná metoda s použitím těchto mikrosatelitů (<http://www.fhrc.org>) musela být optimalizována podmínkám laboratoře. Velký vliv na optimalizaci měl výběr termostabilní polymerázy. Hlavní překážkou byl výskyt nespecifických amplifikací, které popsal Bryan *et al.*, (1997) jako tzv. „stutter bands“ (kockavé bendy). Tyto nevýrazně amplifikované produkty je možné odhalit pouze na základě sekvenační polyakrylamidové elektroforézy. V našem případě jsme použili DNA polymerázu *Taq* Fermentas, aby došlo k omezení těchto nespecifických amplifikací.

Separace na agarózovém gelu (obrázek 4) vždy předcházela sekvenační elektroforéze a sloužila k ověření úspěšné amplifikace. Touto elektroforézou nebyly zjištěny kockavé bendy ani velikosti alel.

Pro sekvenační elektroforézu (obrázky 5 a 6) byla použita optimalizovaná metoda podle Benbouza *et al.* (2006), která má univerzální použití sekvenování pro rostlinné i živočišné mikrosatelity. Mikrosatelit je na polyakrylamidovém gelu separovaný v denaturované podobě. Separuje na základě velikosti fragmentu. Tato metoda pro vizualizaci konečného produktu používá barvení stříbrem. Barvení a vizualizace, pomocí UV transluminátoru, gelu se provádí přímo na skle sekvenační cely. Výsledky v některých případech ovlivňovaly výše zmíněné kockavé bendy, kdy je následně obtížné identifikovat jednotlivé alely. Nevhodný pro vyhodnocení byl také gel postižený tzv. smiling efektem, kdy nedošlo k zachování standardních podmínek a teplota v laboratoři neodpovídala požadovanému stupni. Místo sekvenační elektroforézy je možné využít kapilární elektroforézu. Ta je plně automatizovaná, podmínky reakce jsou stabilní a je možné naráz a automaticky vyhodnocovat velké množství vzorků najednou příslušným softwarem. Tato metoda je velmi finančně náročná na pořízení kapilární elektroforézy, ale i na fluorescenčně značené primery. Odpadá zde však riziko lidských chyb při nanášení vzorků, možným zkontaminováním vzorků, smícháním vzorků či difundováním vzorků z jamky. Asch *et al.* (2010) popisuje využití kapilární elektroforézy ABIPRISM 3130XL pro studium variability mikrosatelitních markerů domestikovaných zvířat, včetně psů. Polymorfismy mikrosatelitních lokusů byly v diplomové práci hodnoceny na základě přítomností jednotlivých alel. Tyto alely

byly označeny čísly tak, že alela 1 u každého lokusu představovala amplicon s největším počtem opakování mikrosatelitního motivu a tudíž s nejmenší elektroforetickou mobilitou. Získaná data byla dále statisticky zpracována pomocí programů uvedených v kapitole výsledky. Při fragmentační analýze založené na principu kapilární elektroforézy je obvykle snímán polymorfni signál automaticky zpracován řadou speciálních programů, jako je např. Genemapper ID v 3.2, který použil Poetsch *et al.* (2009).

Pořizování polyakrylamidové sekvenační elektroforézy je naproti tomu relativně levné. Separace je však časově náročná (jedna separace trvá 3,5 – 4 hodiny), s omezeným množstvím naráz vyhodnocovaných vzorků. Také je zde velké riziko lidské chyby během vyhodnocování.

6.2.1. Detekce alel mikrosatelitních lokusů u fen a psů

Pro vyhodnocení polymorfismu alel byl použit program TFPGA. Byl spočítán výskyt alel, frekvence alel, počet heterozygotů a frekvence heterozygotů, která vyjadřuje relativní četnost heterozygotů s danou alelou. Dále byla vypočítána pozorovaná a očekávaná heterozygotnost daného mikrosatelitního lokusu. Použité mikrosatelitní markery amplifikovaly segment gonozómu X, který je u fen zastoupen dvěma alelami. Proto počet alel odpovídá dvojnásobku počtu hodnocených fen. Získané výsledky byly hodnoceny z hlediska heterozygotnosti pouze u fen všech plemen. Na získané výsledky uvedené v tabulkách 2 - 10 se ale nemůžeme dívat jako na hodnocení celé populace, protože již v úvodu této kapitoly bylo zmíněno, že diploidní založení mikrosatelitních markerů lokalizovaných na gonozómu X je pouze u fen. Tyto výsledky však podávají doplňující informace o variabilitě fen hodnocených plemen.

Polymorfismus SSR lokusů FH2548 u fen

Z tabulek 2 – 4 vyplývá, že bylo u sledovaných skupin psů bez ohledu na plemeno nalezeno 6 alel. Specifický výskyt jen u jednoho plemene vykazuje alela 6, která se vyskytovala pouze u zástupců československého vlčáka a to u fen i psů a alela 1, vyskytující se pouze u německých ovčáků také obojího pohlaví. Nejvíce zastoupena u československého vlčáka byla alela číslo 3, která oproti tomu u německého ovčáka nebyla zastoupena společně s několika dalšími alelami téměř vůbec. U německého ovčáka tohoto lokusu byla nejfrekventovanější alela číslo 2, která je ale také velmi početná u československých vlčáků. U plemene Saarloosův vlčák je nejvíce zastoupena alela číslo 5, která se u předešlých dvou plemen vyskytuje v malém množství. To poukazuje na vyšší příbuznost plemen československý vlčák a německý ovčák. Pozorovaná heterozygotnost byla nejvyšší u fen

plemene československého vlčáka. Byla větší než očekávaná v případě platnosti Hardy – Weinbergova zákona. To může být způsobeno nejpočetnějším zastoupením oproti ostatním dvou plemenům. Oproti tomu pozorovaná heterozygotnost fen německých ovčáků je na úrovni očekávané a u skupiny Saarloosových vlčáků je hodnota pozorované menší než očekávané. Tato skutečnost může být způsobena malým počtem hodnocených jedinců, ale i selekcí a inbreedingem.

Polymorfismus SSR lokusů FH2584 u fen

U SSR lokusu FH2584 bylo zjištěno celkem 11 alel. Z hlediska frekvence alel byly získány velice podobné výsledky jako u SSR lokusu FH2548, což je patrné z tabulek 5 - 7. U prvních dvou plemen je nejvíce zastoupena alela číslo 5, která se u Saarloosova vlčáka nevyskytuje vůbec. Oproti tomu u psů i fen Saarloosových vlčáků se s největší četností vyskytovala alela číslo 11, která ale není vůbec zastoupena u československých vlčáků a německých ovčáků. Dále zde byla zjištěna hodnota pozorované heterozygotity, která je u všech třech plemen téměř na úrovni té očekávané. Lze tudíž předpokládat, že z pohledu Hardy-Weinbergova zákona jsou tyto populace v rovnováze z hlediska variability alel lokusu FH2584. Zajímavým zjištěním však je výrazně nižší heterozygotnost u fen plemene Saarloosův vlčák. Tento výsledek může být způsoben nejen menším počtem hodnocených fen tohoto plemen, ale rovněž i obecně menší chovatelskou základnou v celosvětovém měřítku.

Polymorfismus SSR lokusů FH2985 u fen

U třetího SSR markeru byly zjištěny pouze 4 alely u psů a 5 alel u fen bez ohledu na plemennou příslušnost., kdy alela číslo 3 se vyskytovala pouze u fen všech plemen. Tento výsledek lze vysvětlit nahodilostí při výběru hodnocených zvířat. O lokusu FH2985 je známo, že je lokalizován na homologní části gonozómu X (Clark *et al.*, 2004; Tsai, 2005). SSR lokus FH2985 rovněž potvrdil blízkou příbuznost fen plemen československý vlčák a německý ovčák nejfrekventovanějším zastoupením alely číslo 7 především u fen. U fen třetího hodnoceného plemene je tato alela zastoupena v malém množství. Hodnota pozorované a očekávané heterozygotity u fen všech tří plemen byla téměř stejná. U tohoto mikrosatelitního lokusu bylo oproti předchozím lokusům dosaženo rozdílných výsledků z hlediska heterozygotnosti. Tyto výsledky jsou dobře patrné z tabulek 8 - 10. Nejvyšší heterozygotnost byla zjištěna u fen plemene Saarloosův vlčák. Naopak feny plemen československý vlčák a německý ovčák vykazovaly přibližně 3x nižší heterozygotnost. Tento výsledek zřejmě svědčí o velké variabilitě tohoto lokusu u fen nebo vlčic, které byly použity pro vyšlechtění plemene Saarloosův vlčák.

Hodnocení variability alel lokusů FH2548, FH2584 a FH2985 u fen pomocí shlukové analýzy

Na základě těchto analýz o přítomnosti či absenci alel markerů FH2548, FH2584 a FH2985 byl posléze programem TFGA a následnou shlukovou analýzou UPGMA vypracován kladogram zobrazený na grafu 1. Na principu koeficientu genetické vzdálenosti podle Rogers (1972) zde byly vyjádřeny v genetické vzdálenosti mezi alelami všech tří hodnocených lokusů. Hodnoty tohoto koeficientu se pohybují od 0 do 1. Nulová hodnota představuje stoprocentní identitu v distribuci alel mezi srovnávanými skupinami. Kladogram pouze potvrdil dříve vyřčenou hypotézu o genetické příbuznosti plemen. Z grafu jasně vyplývá, že plemeno československý vlčák je bližší plemenu německý ovčák a obě dvě tato plemena jsou vzdálena Saarlosovu vlčáku hodnotou Rogersova koeficientu genetické vzdálenosti 0,6267. Získané výsledky nebylo možno diskutovat se žádnými citovanými autory. Důvodem je fakt, že problematika křížení vlka a psa je obvykle studována u rurálních populací. Model psích plemen československý vlčák a Saarloosův vlčák žádný z citovaných autorů nepoužil.

Polymorfismus SSR lokusů FH2548, FH2584 a FH2985 u psů

Pro vyhodnocení genetické variability psů byl použit stejný program. V tomto případě hodnota výskytu alely představuje konkrétní počet psů, kde je každá alela gonozómu X zastoupena pouze jedenkrát. V tomto případě se nevyhodnocoval výskyt a frekvence heterozygotů, neboť pomocí námi zvolených markerů hemizygotní povahy nebylo takové hodnocení možné. U všech třech použitých SSR markerů bylo dosaženo podobných výsledků jako v případě fen, což je patrné z tabulek 11 - 19. Hodnota Rogersova koeficientu genetické vzdálenosti plemen československý vlčák a německý ovčák od Saarlosova vlčáka byla 0,5962 a je zobrazena na grafu 2. Tato skutečnost je možná z hlediska menšího počtu hodnocených jedinců.

Hodnocení variability alel lokusů FH2548, FH2584 a FH2985 u psů pomocí shlukové analýzy

Dané mikrosatelitní lokusy nekódují žádnou konkrétní vlastnost, proto je selekce vůči nim náhodná. Avšak hodnota Rogersova koeficientu genetické vzdálenosti 0,5962 mezi plemeny československý vlčák a německý ovčák, uvedená v grafu 2, může být taková, protože jsou si jedinci povahově podobní a selektováni na podobné vlohy. Oproti tomu Saarloosův vlčák byl původně šlechtěn jako pes vodící, ne jako pracovní a je daleko plašší než předchozí dvě plemena. Dané hodnoty jsou tedy náhodné z hlediska fenotypu, vliv na

jejich hodnotu může mít velikost populace, kdy populace hodnocených zvířat plemene Saarloosova vlčáka byla nejmenší, nebo možný inbreeding.

V našem případě jsme použili mikrosatelity gonozómu X, které v této kombinaci k hodnocení genetické variability československých vlčáků a Saarloosových vlčáků zatím nikdo nepoužil. SSR marker lokusu FH2548 použil Asch *et al.* (2010) při výzkumu mikrosatelitních lokusů gonozómu X u psů. Další dva, námi použité SSR markery FH2584 a FH2985, použil Clark *et al.* (2004) při studiu domestikovaných psů. Oba dva tyto autoři nepoužili k hodnocení ve svých pracích pouze daných mikrosatelitů, proto není možné provést porovnání konkrétních výsledků.

6.3. Statistické vyhodnocení závislosti distribuce alel mikrosatelitních lokusů FH2548, FH2584 a FH2985 na koeficientu inbreedingu

Pro statistické vyhodnocení stupně inbreedingu v závislosti distribuce alel mikrosatelitních lokusů FH2548, FH2584 a FH2985 byl použit Wrightův koeficient příbuzenské plemenitby označovaný F_x (Dostál, 2007). Tento koeficient je dnes automaticky počítán v rámci databáze chovných zvířat uvedených na stránkách Svět československého vlčáka (www.wolfdog.org). Pro charakteristiku koeficientu byly použity statistické parametry jako je aritmetický průměr, směrodatná odchylka a variační koeficient. Pro toto vyhodnocení byla skupina zvířat rozdělena do třech skupin A, B a C podle daných kritérií uvedených v tabulce 20. Tento způsob hodnocení variability SSR lokusů nepoužil žádný z citovaných autorů. Hodnocení závislosti distribuce alel na koeficientu inbreedingu je možný pouze u zvířat chovaných v zajetí s jednoznačně řízenou reprodukcí, kdy člověk má k dispozici rodokmeny sledovaných zvířat. Vzhledem k tomu, že většina prací zaměřených na mikrosatelitní analýzy vlků a vlčích kříženců vychází z volně žijících populací, nebyly tyto analýzy realizovatelné.

6.3.1. Statistická analýza vlivu koeficientu inbreedingu na distribuci alel u všech zvířat bez ohledu na jejich pohlaví

V tabulkách 21 - 23 jsou hodnocena zvířata bez ohledu na pohlaví. V tomto případě musíme brát na zřetel, že fena poskytuje alely dvě a pes jednu. V našem případě byla stanovována závislost distribuce alel z pěti, osmi a maximálního počtu generací. Běžně uznávanou je hodnota F_x 5, kdy se provádí výpočet z pěti generací. Z hodnocení koeficientu

inbreedingu vyplývá, že variabilita jeho hodnot při výpočtu z osmi a více generací je výrazně snížena. Tento fakt je způsoben tím, že při zahrnutí většího počtu generací do výpočtu jsou automaticky započítáváni i jedinci, kteří byli opakovaně použiti při plemenitbě ve fázích vzniku plemene. Hodnoty F_x 8 a F_x max slouží pouze pro srovnání. Distribuce alel u jednotlivých plemen byla porovnána – testem.

Z uvedené tabulky 21 pro mikrosatelitní lokus FH2548 vyplývá, že skupina A a B se od sebe statisticky významně neliší. U skupiny C na hladině významnosti $\alpha = 0,05$ byly zjištěny statisticky významné odlišnosti v podílech jednotlivých alel oproti skupinám A a B. Se zvyšující se hodnotou inbreedingu se snižuje variabilita alel. Tato tabulka je tedy jen potvrzením výpočtu frekvence alel u jednotlivých plemen. Stejného výsledku bylo dosaženo výpočtem distribuce alel z osmi generací. Výsledek hodnocení distribuce alel neparametrickým χ^2 testem potvrzují hypotézu, že skupina zvířat s extrémně vysokým koeficientem F_x je statisticky významně chudší z pohledu variability alel mikrosatelitního lokusu FH2548.

Tabulka 22 prezentuje hodnocení mikrosatelitního lokusu FH 2584, kdy byly zjištěny obdobné výsledky jako u mikrosatelitního lokusu FH2548. Statisticky významné byly rozdíly mezi skupinami A a C. Tyto výsledky rovněž potvrdily hypotézu vyslovenou v cíli práce, že inbreeding vede ve finále ke snížení genetického polymorfismu.

U mikrosatelitního lokusu FH2985 (tabulka 23) byla zjištěna nejvyšší míra shody v distribuci alel mezi skupinami A a B. Tento výsledek rovněž podporuje vyslovenou hypotézu. Do skupin A a B byly zařazeni jedinci z nízkou a průměrnou hodnotou koeficientu inbreedingu.

6.3.2. Statistická analýza vlivu koeficientu inbreedingu na distribuci alel u zvířat rozdělených podle jejich pohlaví

Skupiny A, B a C byly zhodnoceny také na základě pohlaví. První hodnocenou skupinou byly feny. Výsledky jsou uvedené v tabulkách 24 – 26. Výsledky hodnocení prvního mikrosatelitního lokusu FH2548 byly stejné jako při hodnocení bez ohledu na pohlaví. Byly zjištěny statisticky významné rozdíly mezi skupinami A a C, B a C. Při výpočtu z osmi generací byly rozdíly zjištěny pouze při porovnání skupin A a C. U mikrosatelitního lokusu FH2584 byly zjištěny statisticky významné rozdíly pouze při porovnání skupin A a B. To znamená, že u tohoto mikrosatelitního lokusu byla frekvence alel výrazně odlišná u skupiny fen s nízkou hodnotou F_x oproti fenám se střední a vysokou hodnotou F_x . U posledního mikrosatelitního lokusu FH2985 u fen byly zjištěny statistické rozdíly pouze mezi skupinami

B a C. Tento výsledek odpovídá rovněž úvodní hypotéze. Skupiny fen s nízkou a střední hodnotou F_x se vzájemně nelišily z hlediska distribuce alel.

U stejného porovnávání jednotlivých skupin psů bylo zjištěno, že statistické rozdíly na hladině významnosti $\alpha = 0,05$ byly nalezeny pouze u mikrosatelitního lokusu FH2584 mezi skupinami psů A a C a u mikrosatelitního lokusu FH2985 mezi skupinami psů B a C. Tyto výsledky jsou rovněž v souladu s hypotézou, která již byla zmíněna při hodnocení fen. Výsledky jsou uvedeny v tabulkách 27 – 29.

6.3.3. Statistická analýza vlivu koeficientu inbreedingu na distribuci alel u zvířat rozdělených podle pohlaví a hodnot F_x

Pro tento typ statistické analýzy byly porovnávány vždy distribuce alel u psů a fen v závislosti na zařazení jedinců do skupin podle úrovně jejich F_x . Z tabulek 30 – 32 vyplývá, že ani při jednom z výpočtů F_x nebyly zjištěny statisticky významné rozdíly na hladině významnosti alfa při distribuci alel u psů a fen. Tento výsledek platil pro všechny tři hodnocené mikrosatelitní lokusy. Zjištěná skutečnost doplňuje představu o tom, že na populaci je nutné vždy pohlížet jako na soubor jedinců samčího i samičího pohlaví, kteří jsou jedinou možností reprodukce této populace. V rámci diplomové práce byly hodnoceny SSR markery, které u fen vykazovaly kodominantní charakter, u psů však byly reprezentovány pouze jednou hemizygotní alelou. Z výsledků statistického šetření vyplývá, že mezi oběma pohlavími nebyly statisticky významné rozdíly v distribuci alel. Tento výsledek je důkazem toho, že při pohlavním rozmnožování dochází ke kombinaci alel obou dvou rodičů. Z tohoto pohledu je možné také posoudit skutečnost, že v lokusu FH2985 se alela 3 nacházela pouze u fen. Ze statistické analýzy je patrné, že toto specifikum týkající se pouze jediného lokusu nezpůsobilo statistickou významnost v rozdílech mezi distribucemi všech alel u psů a fen. Proto je možné se na specifický výskyt alely 3 lokusu FH2985 dívat doopravdy jako na výsledek nahodilosti při výběru hodnocených zvířat.

6.3.4. Posouzení meziplenné variability na základě mikrosatelitních lokusů FH2548, FH2584 a FH2985

Pro hodnocení mikrosatelitních lokusů gonozómu X bylo provedeno porovnání variability zvířat třech různých plemen. Největší variabilita byla zjištěna u československého vlčáka. Tato skutečnost mohla být ovlivněna největším počtem hodnocených jedinců. Nejméně bylo hodnoceno zástupců plemene Saarloosův vlčák, přičemž byla také zjištěna nejmenší genetická variabilita. Na mikrosatelitním lokusu FH2584 bylo nalezeno nejvíce alel

a vykazoval tedy vyšší stupeň polymorfismu. Z předchozích kapitol diskuze vyplynuly možné příčiny variability alel studovaných lokusů. Přestože tyto lokusy jsou využívány v mapování psího genomu popřípadě jako vazebné markery některých vlastností (Zhang *et al.*, 2001; Clark *et al.*, 2004; Asch *et al.*, 2010), nikdo z citovaných autorů se nezabýval hodnocením vztahu mezi variabilitou SSR markerů a mezi důsledkem příbuzenské plemenitby vyjádřeným hodnotou F_x .

7. ZÁVĚR

Podmínkou pro úspěšné vyřešení všech cílů diplomové práce bylo zvládnutí řady metodických experimentů vedoucích k vytvoření stabilních podmínek při izolaci DNA i při amplifikaci markerů hodnocených SSR lokusů. Většinu metodických postupů, které jsou prezentovány v kapitole čtvrté, materiál a metody, lze tudíž považovat za metodologické závěry plynoucí z řešení diplomové práce. Tyto závěry lze přehledně shrnout do následujících bodů:

- Metoda izolace DNA z bukálních sliznic byla vhodná a aplikovatelná pro následné analýzy genomů plemen československý vlčák, německý ovčák a Saarloosův vlčák. Vzhledem k dominantní povaze některých psů lze závěrem konstatovat, že pro správný aseptický odběr stěrů bukálních sliznic je nutná asistence majitele psa.
- Při řešení diplomové práce byla úspěšně optimalizována amplifikace SSR lokusů FH2548, FH2584 a FH2985. Výsledkem optimalizačních experimentů je amplifikace minimálně zatížená výskytem „stutter bands“.
- Pro jednoznačné identifikace polymorfismu všech studovaných lokusů se ukázalo jako zcela nezbytné použití sekvenační elektroforézy s denaturačním prostředím, které zajišťuje separaci ampliconu pouze podle jeho délky, bez vlivu možných sekundárních struktur DNA.

Výše uvedené metodické závěry byly nezbytným předpokladem pro objasnění hypotéz zmíněných v úvodu diplomové práce. Získané vědecké výsledky jsou shrnuty v následujících bodech:

1. Statistickými analýzami byly potvrzeny rozdíly ve variabilitě a distribuci alel všech tří hodnocených SSR lokusů mezi hodnocenými vzorky plemen československého vlčáka, německého ovčáka a Saarloosova vlčáka.
2. Pomocí shlukové analýzy a Rogersova koeficientu genetické vzdálenosti bylo potvrzeno, že distribuce alel mikrosatelitních lokusů FH2548, FH2584 a FH2985 je výrazně podobnější mezi plemeny československý vlčák a německý ovčák. Menší genetická vzdálenost mezi těmito plemeny byla zjištěna nejen při hodnocení obou pohlaví, ale i při samostatném hodnocení psů a fen.
3. Menší genetická vzdálenost mezi československými vlčáky, německými ovčáky a Saarloosovy vlčáky byla potvrzena rovněž na základě neparametrického χ^2 testu.

4. Závislost distribuce alel na hodnotě koeficientu inbreedingu byla potvrzena rovněž s využitím neparametrického χ^2 testu. Statisticky významné rozdíly byly zjištěny mezi skupinami psů s extrémními hodnotami koeficientu inbreedingu.
5. Naopak rozdíly v distribuci alel mezi fenami a psy zařazenými do stejné skupiny podle hodnoty koeficientu inbreedingu zjištěny nebyly.

V závěru diplomové práce lze tudíž konstatovat, že hypotézy vyslovené v kapitole dvě, cíle práce, byly potvrzeny. Podobný polymorfismus alel SSR lokusů FH2548, FH2584 a FH2985 byl zjištěn u plemen československý vlčák a německý ovčák. Hypotéza předpokládající zvýšení genetické variability v důsledku křížení několika vlčic se psy, která byla realizována i při vzniku Saarloosova vlčáka, však potvrzena nebyla. Toto plemeno ve všech hodnocených mikrosatelitních lokusech vykazovalo ve všech lokusech výrazně nižší počet alel. Tento výsledek můžeme v závěru vysvětlit dvěma hypotézami. Jednou z nich je fakt, že chovná základna plemene Saarloosův vlčák je výrazně nižší. Na tuto hypotézu navazuje další možné vysvětlení, které vychází z výrazně nižšího počtu hodnocených Saarloosových vlčáků v průběhu řešení diplomové práce.

8. SEZNAM LITERATURY

- Alberts, B., Bray, D., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. 1998. Základy buněčné biologie. Ústí nad Labem: Espero publishing. 630 s. ISBN 80-902906-2-0
- Andersone, Ž., Lucchini, V., Randi, E., Ozolins, J. 2002. Hybridization Between wolves and dogs in Latvia as documented using mitochondrial and microsatellite DNA markers. *Mammalian Biology*. 67 (2), 79 – 90
- Asch, B., Pinheiro, R., Pereira, R., Alves, C., Pereira, V., Pereira, F., Gusmão, L., Amorim, A. 2010. A framework for the development of STR genotyping in domestic animal species: Characterization and population study of 12 canine X – chromosome loci. *Electrophoresis*. 31 (7), 303 – 308
- Bachman, K. 1992. Nuclear DNA markers in angiosperm taxonomy. *Acta Botanica Neerlandica*. 41 (4), 369-384.
- Barbaro, A., Cormaci, P. 2006. Multiplex STRs amplification from hair shaft: Validation study. *International Congress Series*, 1288, 676 – 678
- Bardakci, F. 2000. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. *Turkish Journal of Biology*, 25 (2), 185 - 196
- Bartošová, D. 2001. Současný výskyt a ochrana rysa ostrovida, medvěda hnědého a vlka na západním okraji Západních Karpat v CHKO Beskydy. *Chránená územia Slovenska*. 47: 14 – 17
- Benbouza, H., Jacquemin, J. – M., Baudoin, J. – P., Mergeai, G. 2006. Optimization of a reliable, fast, cheap and sensitive silver staining method to detect SSR markers in polyacrylamide gels. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.*, 10 (2), 77 - 81
- Bergmann, F. 1975. Adaptive acid phosphatase polymorphism in conifer seeds. *Silvae Genetica* 24: 175-177.
- Bielfeld, H. 1996. Psi - plemena, výchova, chov. Knižní klub Praha. 208s. ISBN 80-7176-906-1
- Boitani, L. 2000. Action Plan for the Conservation of Wolves in Europe (*Canis lupus*). Council of Europe Publishing, Strasbourg, 86 s. ISBN 978-92-871-4425-6

- Bowling, A.,T., Eggleston – Stott, M.,L., Byrns, G., Clark, R.S., Dileanis, S., Wictum, E. 1997. Validation of microsatellite markers for routine parentage testing. *Animal Genetics*, 28 (4), 247 – 252
- Brown, T. A. 1999. *Genomes*. United Kingdom: Bios Scientific Publishers. 472 s. ISBN 1-85996-228-9
- Bryan, G.J., Collins, A.J., Stephenson, P., Orry, A., Smith, J.B., Gale, M.D. 1997. Isolation and characterisation of microsatellites from hexaploid bread wheat. *Theoretical and Applied Genetics*, 94 (5), 557 - 563
- Bufka, L., Heurich, M., Englender, T., Červený, J., Wölfl, M. & Scherzinger, W. 2004. Wolf occurrence in the Czech-Bavarian-Austrian border region: review of history and current status. *Silva Gabreta*, 11 (1), 27 - 42
- Cano, R.J., Poinar, H.N., Pieniazek, N.J., Acra, A., Poinar, Jr., G.O. 1993. Amplification and sequencing of DNA from a 120-135-million-year-old weevil. *Nature*, 363 (6429), 536-538
- Clark, L.A., Tsai, K.L., Steiner, J.M., Williams, D.A., Guerra, T., Ostrander, E.A., Galibert, F., Murphy, K.E. 2004. Chromosome-specific microsatellite multiplex sets for linkage studies in the domestic dog. *Genomics*, 84 (3), 550 - 554
- Coppinger, R.P., Coppinger, L. 2001. *Dogs: a new understanding of canine origin, behavior and evolution*. University of Chicago Press. 352 s. ISBN 0-226-11563-1
- Cunliffeová, J. 2002. *Encyklopedie psů*. Nakladatelství Sovart, s.r.o. 384 s. ISBN 80-7209-620-6
- Červený, J., Koubek, P., Bufka, L. 2000. *Velké šelmy v naší přírodě*. Koršach, Praha 32 s. ISBN 80-9003-468-3
- Červený, J., Anděra, M., Koubek, P., Homolka, M. & Toman, A. 2001. Recently expanding mammalian species in the Czech Republic: distribution, abundance and legal status. *Beiträge zur Jagd – und Wildforschung*, 26: 111 - 125
- Dostál, J. 2007. *Genetika a šlechtění psů*, Dona, České Budějovice. 260 s. ISBN 978-80-7322-104-1
- Edwards, A., Civitello, A., Hammond, H. A. and Caskey, C. T. 1991. DNA typing and genetic mapping with trimeric and tetrameric tandem repeats. *American Journal of Human Genetics*, 49 (4), 746-56.

- Findejs, J., Hartl, K., Machek, B., Čeliš, J., Loučka, R., Obermajerová, V., Petrusová, H. 1998. Česká národní plemena psů. Praha: Plot. 187s. ISBN 80-238-2833-9
- Greer, K.A.; Cargill, E.J.; Cox, M.L.; Clark, L.A.; Tsai, K.L.; Credille, K.M.; Dunstan, R.W.; Venta, P.S.; Murény, K.E. 2003. Digging up the canine genome – a tale to wag about. In Cytogenetic and genome research. 102 (1-4): 244-248
- Griffin, H. G., Griffin A. M. 1994. PCR Technology – Current Innovations. Second edition. London: CRC Press. 370 s. ISBN 0-8493-1184-5
- Grossman, M., Eisen, E. J. 1989. Inbreeding, Coancestry, and Covariance between Relatives for X – Chromosomal Loci. The Journal of Heredity, 80 (2), 137 – 142
- Hamanová, K. 2000. Polymorfismus DNA se zaměřením an mikrosatelity u koní. Dizertační práce, Česká zemědělská univerzita, Agronomická fakulta, Katedra genetiky a šlechtění.
- Hartl K., Jedlička J. 1996. Československý vlčák. Nakladatelství LOBA. Praha. 79s. ISBN 80-85853-66-3
- Hartmanová, H., Chudoba, D., Mrázová, L., Nosková, L., Novotná, D., Třešňová, H., Vlášková, H., Vyleťal, P. 2008. Sborník textů: Vybrané vyšetřovací metody v molekulární genetice a cytogenetice. Všeobecná fakultní nemocnice v Praze
- Innis, M. A., Gelfand, D. H., Sninsky, J. J., White, T. J. 1990. PCR protocols: A guide to methods and applications. New York: Academic Press 482 s. ISBN 0-12-372-180-6
- Koubek, P., Novotný, L., Červený, J. 2008. Šakal obecný v České republice. Svět myslivosti, 9 (4). Dostupné z: <http://svetmyslivosti.silvarium.cz/content/view/1281/>
- Krämer, E.-M. 1996. Průvodce plemeny psů. Vydavatelství a nakladatelství BLESK. 320 s. ISBN 80-900183-4-3
- Krämerová E.-M., Lenz, W. 1997. Německý ovčák. Bratislava: Kontakt Plus s. r. o. 1. vydání. 104 s. ISBN 80-88855-10-1
- Laštůvka, Z., Gaisler, J., Šťastná, P., Pelikán, J. 2001. Zoologie pro zemědělce a lesníky. Brno: Konvoj. 2. Vydání, 267 s. ISBN 80 – 7302 – 008 – 4
- Liberg, O., Andrén, H., Pedersen, H.-Ch., Sand, H., Sejberg, D., Wabakken, P., Åkesson, M., Bensch, S. 2005. Severe inbreeding depression in a wild wolf (*Canis lupus*) population. Biology Letters, 1 (1), 17 - 20

- Lindblad-Toh, K., Wade, C. M., Mikkelsen, T. S., Karlsson, E. K., Jaffe, D. B., Kamal, M., Clamp, M., Chang, J. L., Kulbokas, E. J. 3rd, Zody, M. C. *et al.* 2005: Genome sequence, comparative analysis and haplotype structure of the domestic dog. *Nature* 438 (7069), 803 – 819
- Litt, M., Luty, J. A. 1989. A hypervariable microsatellite revealed by *in vitro* amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. *American Journal of Human Genetics*, 44 (3), 397-401
- Lucchini, V., Fabbri, E., Marucco, F., Ricci, S., Boitani, L., Randi, E. 2002. Noninvasive molecular tracking of colonizing wolf (*Canis lupus*) packs in the western Italian Alps. *Molecular Ecology*. 11 (5): 857 - 868
- Miklósi, Á. 2007. Dog behaviour, Evolution, and Cognition. Oxford University Press Inc., New York. 276 s. ISBN 978-0-19-929585-2
- Poetsch, M., El – Mostaqim, D., Tschentscher, F., Browne, E. N. L., Timmann, Ch., Horstmann, R. D., Wurmb – Schwark, N. 2009. Allele frequencies of 11 X – chromosomal loci in a population sample from Ghana. *International Journal of Legal Medicine* 123 (1), 81- 83
- Pokorná, J. 2007. Původ a domestikace psa. *Fauna* 18 (12) Dostupné z: <http://www.ifauna.cz/clanek/psi/puvod-a-domestikace-psa/4270/>
- Primrose, S. B., Twyman, R. M. 2006. Principles of gene manipulation and genomics. Seventh edition. United Kingdom: Blackwell Publishing. 644 s. ISBN 1-4051-3544-1
- Räber, H. 1993. Encyklopedie – plemena psů. Vydavatelství a nakladatelství BLESK. Ostrava. 768 s., ISBN 80-85606-55-0
- Rickwood, D., Hames, B. D. 1990. Gel electrophoresis of nucleic acids. Oxford University Press. Second edition. 311 s. ISBN 0199630828
- Rogers, J. 1972. Measures of genetic similarity and distance. *Studies Genetics VII*. University Texas Publ. (7213). Texas. Pp 145-153.
- Ruvinsky, A.; Sampson, J. 2001. The genetics of the dog. New York : CABI Publishing. 564 s. ISBN 0-85199-520-9
- Saetre, G. - P, Borge, T, Lindell, J., Moum, T., Primmer, C. – R., Sheldon, B. C., Haavie, J., Johnsen, A., Ellegren, H. 2001. Speciation, introgressive hybridization and

- nonlinear rate of molecular evolution in flycatchers. *Molecular Ecology*, 10 (3), 737–749
- Sambrook, J., Maniatis, T., Fritsch, E. F. 1989. *Molecular cloning. A laboratory manual*. Second edition. Cold Spring Harbour Laboratory Press. ISBN 0-87969-576-5
- Sammsová, S. 2000. *Německý ovčák*. Praha: Fortuna Print, 1. vydání. 160 s. ISBN 80-86144-52-6
- Sillero – Zubiri, C., Hoffmann, M., Macdonald, D. 2004. *Canids: Foxes, Wolves, Jackals and Dogs*, IUCN, Gland, Switzerland and Cambridge, UK. 430 s. ISBN 2-8317-0786-2
- Sim, J. E., Lee, H. Y., Yang, W. I., Shin, K. – J. 2010. Population genetic study of four closely – linked X – STR trios in Koreans. *Molecular Biology Reports*, 37 (1), 333 – 337
- Snustad, D.P., Simmons, M.J. 2009. *Genetika*. Vydání první. Tiskárna Helbich a. s. Brno. 871 s. ISBN 978-80-210-4852-2
- Stuchlý, I. 1990: Ovčáčtí psi, Německý ovčák, č. 11: 11s.
- Sundqvist, A. K., Ellegren, H., Olivier, M., Vilà, C. 2001. Y chromosomes haplotyping in Scandinavian wolves (*Canis lupus*) based on microsatellite markers. *Molecular Ecology*. 10 (8): 1959-1966
- Šeda, O., Liška F., Šedová L.: Aktuální genetika. Multimediální učebnice lékařské biologie, genetiky a genomiky. Dostupné z: <http://biol.lf1.cuni.cz/ucebnice/index.htm>
Citováno dne: 1.4.2010
- Tautz, D. 1989. Hypervariability of simple sequences. *Current Opinion in Genetics and Development*, 4, 1193-9.
- Tautz, D.: Notes on the definition and nomenclature of tandemly repetitive DNA sequences. 1993. In Šátková – Jakabová, D., Trandžik, J., Hudcová – Kvasňáková, L., Hegedúšová – Zetochová, E., Bugarský, A., Buleca, J. Jr., Zöldág, L., Jakab, F., Fľak, P. 2004. Genetic diversity of slovak thoroughbred subpopulations. *Acta Veterinaria Hungarica* 52 (3): 259 – 265
- Tsai, K. L. 2005. Genetic analysis of canine hip dysplasia. Dissertation submitted to the Office of Graduate Studies of Texas A&M University. Dostupné z: <http://repository.tamu.edu/bitstream/handle/1969.1/4878/etd-tamu-2005C-VTMI-Tsai.pdf?sequence=1>

- Verhoef – Verhallen, E. J. J. 1996. Encyklopedie psů. Rebo Productions CZ, spol. s r. o. 4. vydání. 270 s. ISBN 80-7234-172-3
- Verhoef - Verhallenová, E. J. J. 2004. Německý ovčák. Rebo Productions CZ, spol. s r. o. 2. vydání. 124 s. ISBN 80-7234-133-2
- Vierstraete, A. 2001. PCR to amplify the requested gene. University of Ghent. Dostupné z: <http://allserv.rug.ac.be/~avierstr/>
- Vilà, C., Savolainen, P., Maldonado, J. E., Amorim, I. R., Rice, J. E., Honeycutt, R. L., Crandall, K. A., Lundeberg, J., Wayne, R. K. 1997. Multiple and ancient origins of the domestic dog. *Science*, 276 (5319), 1687 - 1689
- Vilà, C. a Wayne, R. K. 1999. Hybridization between Wolves and Dogs. *Conservation Biology*. 13 (1): 195 - 198
- Vilà, C., Walker, C., Sundqvist, A. K., Flagstad, Ø., Andersone, Z., Casulli, A., Kojota, I., Valdmann, H., Halverson, J., Ellegren, H. 2003a. Combined use of maternal, paternal and bi-paternal genetic markers for the identification of wolf-dog hybrids. *Heredity*. 90 (1): 17 - 24
- Vilà, C., Sundqvist, A. K., Flagstad, Ø., Seddon, J., Björnerfeldt, S., Kojola, I., Casulli, A., Sand, H., Wabakken, P., Ellegren, H. (2003b): Rescue of a severely bottlenecked wolf (*Canis lupus*) population by a single immigrant. *Proceedings of the Royal Society B*, 270 (1510), 91- 97
- Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., van de Lee, T., Hornes, M., Frijters, A., Pot, J., Peleman, J., Kuiper, M. (1995): AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucl. Acids Res.* 23 (21): 4407-4414
- Wachtel, H. 1998. Chov psů v roce 2000. Nakladatelství Dona. 277 s. ISBN 80-86136-29-9
- Wang, X., Tedford R. H. 2008. Dogs their fossil relatives a evolutionary history. Columbia University Press. 232 s. ISBN 978-0-231-13528-3
- Wayne, R. K., Geffen, E., Girman, D. J., Koepfli, K. P., Lau, L. M., Marshall, C.R. 1997. Molecular systematics of the Canidae. *Systematic Biology*, 46 (4), 622-653

- Weber, J. L., May, P. E. 1989. Abundant class of human DNA polymorphism which can be typed using the polymerase chain reaction. *American Journal of Human Genetics*, 44 (3), 388-396.
- Weissenbach, J., Gaypay, G., Dib, C., Vignal, A., Morisette, J., Millaseau, P., Vaysseix, G., Lathrop, M. 1992. A second generation linkage map of the human genome. *Nature*, 359 (6398), 1123 – 1128.
- Zhang, Q., Acland, G. M., Zangerl, B., Johnson, J. L., Mao, Z., Zeiss, C. J., Ostrander, E. A., Aguirre, G. D. 2001. Fine Mapping of Canine XLPRA Establishes Homology of the Human and Canine RP3 Intervals. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 42 (11), 2466 - 2471

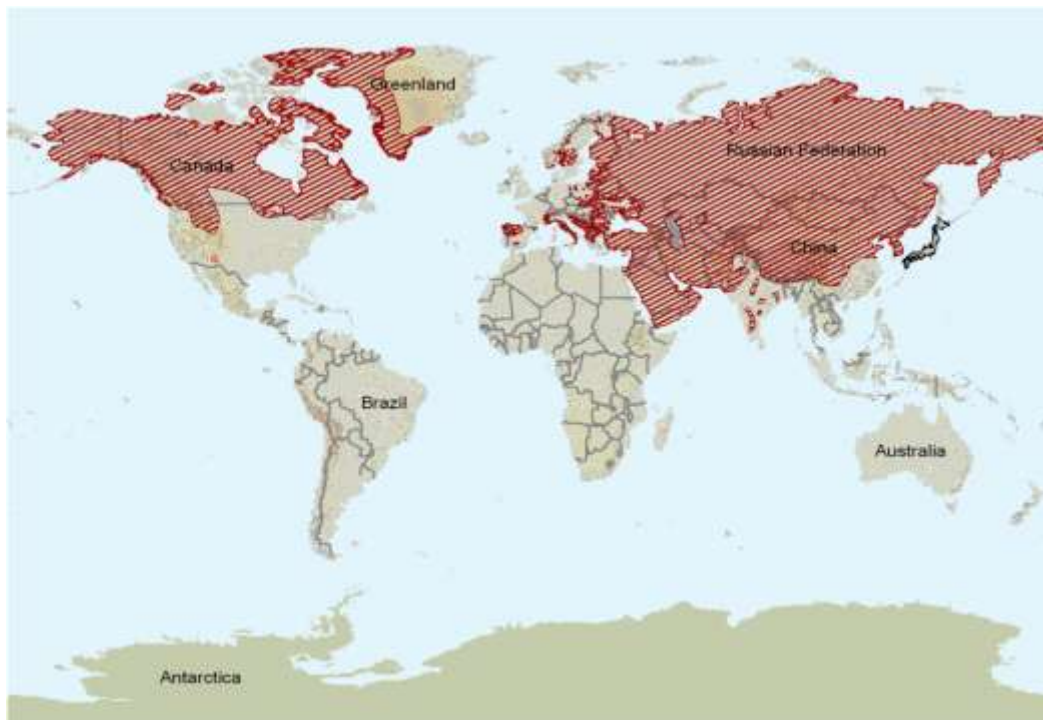
9. SAMOSTATNÉ PŘÍLOHY

Příloha 1: Samec vlka obecného (*Canis lupus*)



Zdroj: www.wolfdog.org

Příloha 2: Rozšíření vlka obecného ve světě v roce 2009



Zdroj: <http://www.redlist.org/apps/redlist/details/3746/0/rangemap>

Příloha 3: Vlčice se štěňaty



Zdroj: www.wolfdog.org

Příloha 4: Vlk obecný (*Canis lupus*) – detail hlavy snadno zaměnitelný se psem



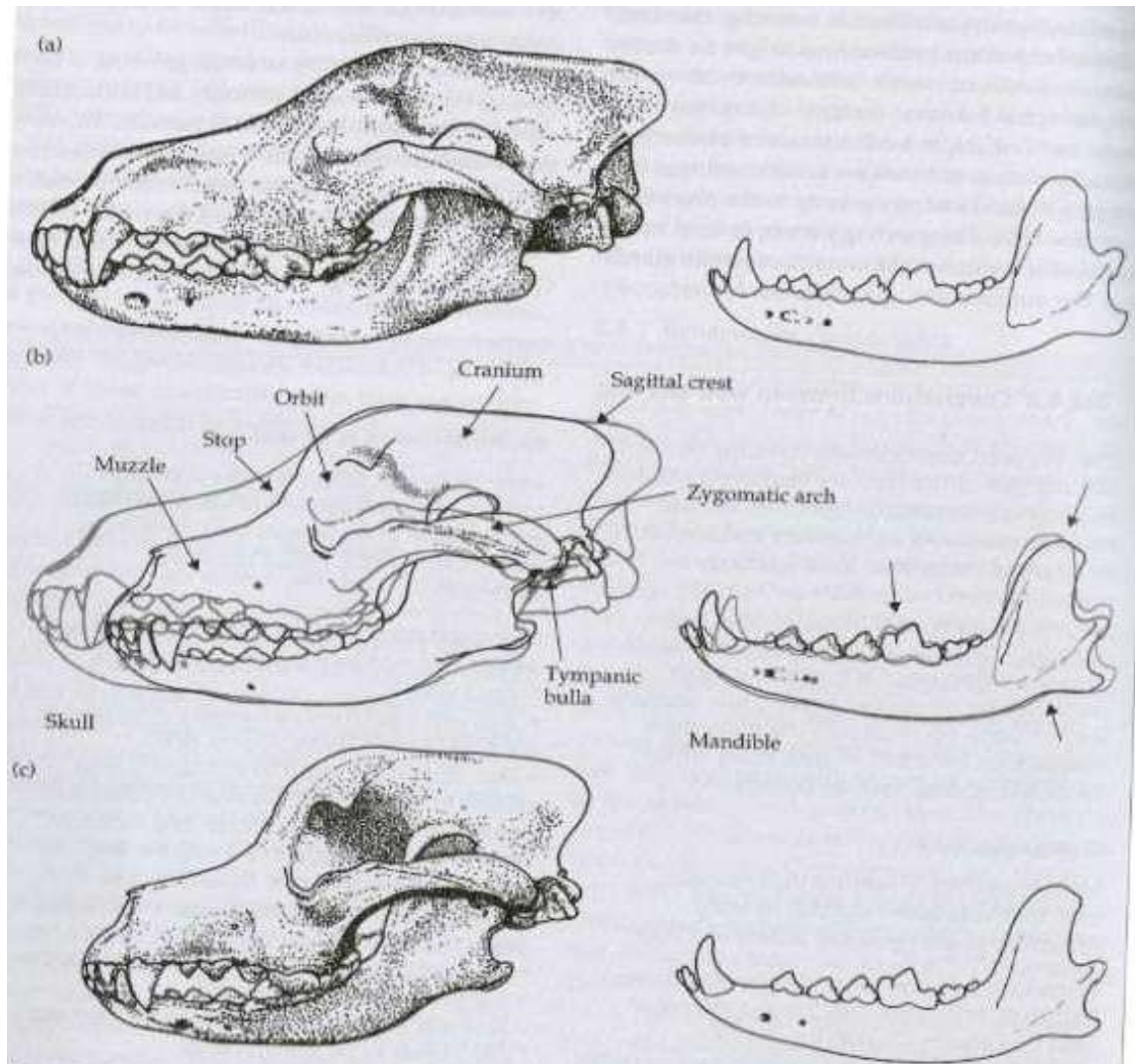
Zdroj: www.wolfdog.org

Příloha 5: Rozšíření šakala obecného ve světě v roce 2009



Zdroj: <http://www.redlist.org/apps/redlist/details/3744/0/rangemap>

Příloha 6: Porovnání lebky vlka obecného a psa domácího, kde (a) je lebka vlka, (b) je lebka vlka v porovnání s lebkou psa a odlišnosti jsou popsány a (c) je lebka psa



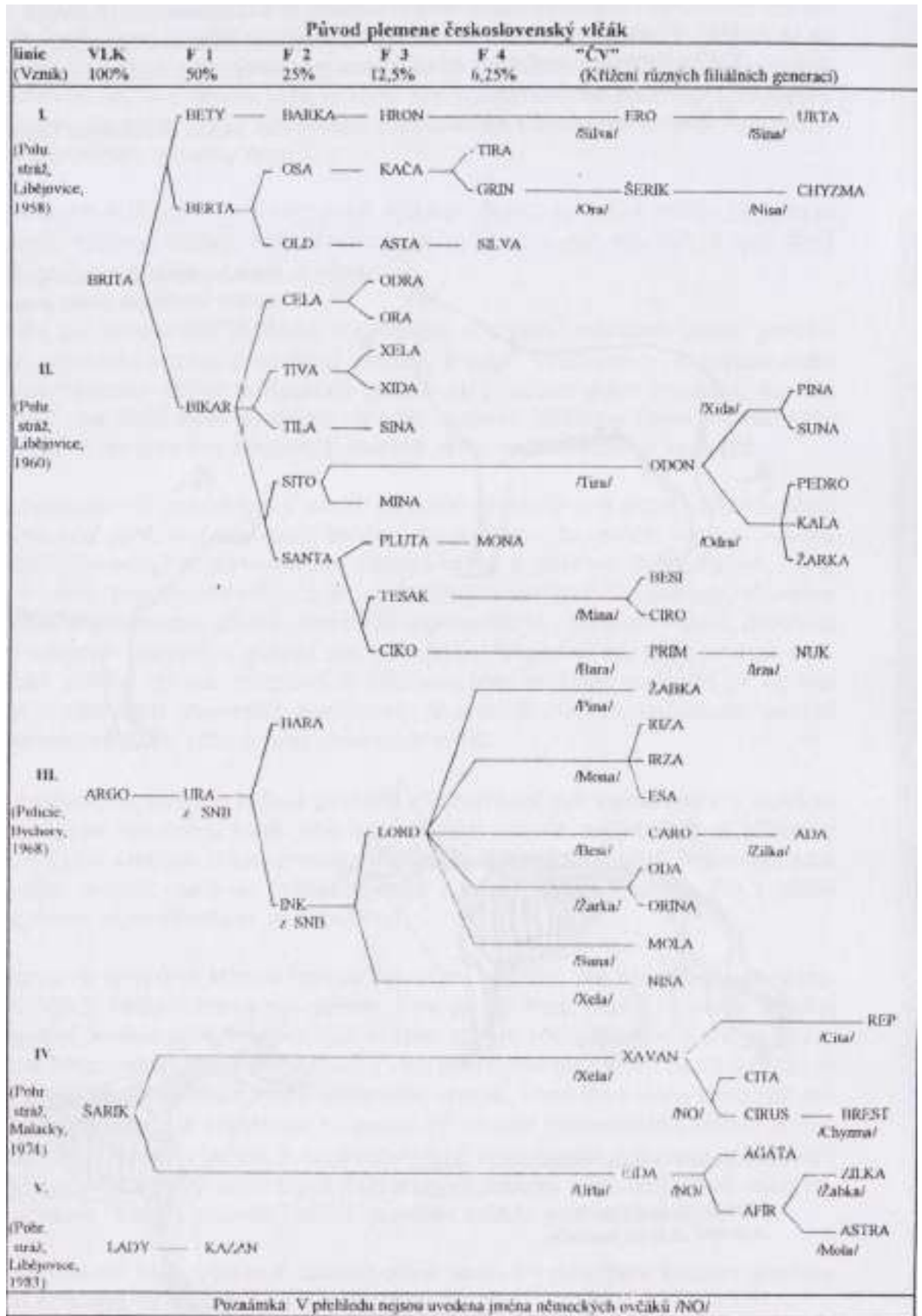
Zdroj: Miklósi, 2007

Příloha 7: První křížení německého ovčáka s vlčicí



Zdroj: www.wolfdog.org

Příloha 8: Původ plemene československý vlačák



Zdroj: Hartl a Jedlička, 1996

Příloha 9: Pes plemene československý vlčák



Zdroj: foto Ing. Daniela Čílová

Příloha 10: Fena plemene československý vlčák



Zdroj: foto Ing. Daniela Čílová

Příloha 11: Štěně plemene československý vlčák



Zdroj: foto Ing. Daniela Čílová

Příloha 12: Samec německého ovčáka



Zdroj: Verhoef - Verhallenová, 2004

Příloha 13: Šedé vlčí zabarvení německého ovčáka



Zdroj: Verhoef - Verhallenová, 2004

Příloha 14: Zástupce samčího pohlaví plemene Saarlosův vlčák



Zdroj: foto Ing. Daniela Čílová