

**Česká zemědělská univerzita v Praze**

**Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů**

**Katedra genetiky a šlechtění**



**Analýza chybovosti SSR markerů u psů a vlků**

**Diplomová práce**

**Autor práce: Yekaterina Polyanskaya**

**Obor studia: Biotechnologie a šlechtění zvířat**

**Vedoucí práce: : Ing. Jakub Vašek, Ph.D.**

**© 2018 ČZU v Praze**

## **Čestné prohlášení**

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Genetická variabilita psích plemen odvozených od vlka" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne \_\_\_\_\_

## **Poděkování**

Ráda bych touto cestou poděkovala řadě lidí, kteří se různou měrou podíleli na vypracování této práce. Jedná se o pracovníky Katedry genetiky a šlechtění České zemědělské univerzity v Praze. . Především bych chtěla poděkovat, vedoucímu své diplomové práce Ing. Jakubu Vaškovi, Ph.D. za odborné rady, vedení a pomoc na této diplomové práci a v průběhu celého inženýrského studia. Dále bych chtěla poděkovat Ing. Daniele Čílové za pomoc a vysoce kvalitní a odbornou překladatelskou a korektorskou činnost. V neposlední řadě můj dík patří paní Ing. Radce Štikarové za nezanedbatelnou pomoc a oporu při práci v laboratoři

# Analýza chybovosti SSR markerů u psů a vlků

## Souhrn

*Canis familiaris* (pes domácí) se dnes považuje, ze všech domácích zvířat, za zvíře člověku citově nejbližší. Mnohé studie uvádí, že pes pochází z vlka, a že se vlci a psi rozdělili do různých druhů zhruba před 100 000 lety. Uvádí se, že vlk (*Canis lupus*) je jediný předchůdce psa domácího. Na základě své genetické podoby byli vlk a pes vybráni pro účely této diplomové práce jako objekt pro analýzu s využitím STR lokusů.

Mikrosatelity (STR) jsou široce využívány v různých molekulárních analýzách DNA jako klasické genetické markery, jelikož jsou polymorfní a snadno detekovatelné pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR) za použití fluorescenčně značených primerů a laserového detekčního systému. STR jsou tvořeny z několikrát se opakujících motivů o délce 1- 6 bází. V experimentální části této diplomové práce byl využit mikrosatelitní systém Mini - DogFiler, který obsahuje 11 mikrosatelitních markerů rozdělených do dvou panelů (Panel A: K9 SRY, VGL1063, VGL2136, VGL1541, VGL1165, VGL1828, VGL2409, panel B: VGL3008, VGL3438, VGL2009, VGL3112, VGL1606) dle Wictum et al. (2013).

Nejprve byly provedeny nezávislé izolace DNA z bukalních stěrů a exkrementů. Pro analýzu byly získány vzorky 170 psů plemene československý vlčák (*Canis lupus familiaris*) a 39 vzorků vlka euroasijského (*Canis lupus lupus*). Dále na základě koncentrace primerů, celkového reakčního objemu, koncentrace DNA a počtu cyklů v PCR reakci byl optimalizován vhodný mikrosatelitní systém. Vybrané genotypy byly testovány prostřednictvím multiplex PCR a kapilární elektroforézy a provedeny 4 opakovaná genotypování. Celkem bylo detekováno 73 různých alel v 11 lokusech, pro samotné československé vlčáky bylo detekováno 67 různých alel v 11 lokusech, a u vlků bylo nalezeno 31 alel v 11 lokusech. V průběhu genotypovacího procesu byly zaznamenány prakticky všechny jevy, které mohou být zdrojem chyb, jako jsou kontaminace environmentálního DNA vzorku, alelický drop-out, PCR artefakty či technická nulová alela. Pro vyhodnocení genetické diverzity vybraných psích plemen/vlků a určení základních populačních parametrů bylo použito několik programů.

Zjištěné poznatky ukazují na vysokou rozlišovací sílu vybraného mikrosatelitního systému a na velmi nízkou chybovost.

**Klíčová slova:** *Candidae*, *Canis familiaris*, *Canis lupus*, fylogenetický původ, mikrosatelity, genotypování, multiplex PCR, kapilární elektroforéza, chybovost

# Estimation of Genotyping Error of SSR Markers in Dogs and Wolves

## Summary

*Canis familiaris* (domestic dog) for today is considered as the most emotionally intimate animal. Various studies indicate that the dog comes from a wolf, and that the wolf and the dog are divided into different species about 100,000 years ago. It is also believed that the wolf is the only predecessor of the dog. Therefore, on the basis of its genetic similarity, the dog and the wolf were selected to be the research objectives of this degree work using STR loci.

Microsatellites (STR) are commonly used classic genetic markers in molecular DNA analysis because they are easily detectable by polymerase chain reaction using stained primers and a laser system. STR consist of repeated motives and have a length of 1 - 6 base pair. The microsatellites system was used in the experimental part of this thesis, which consists of 11 microsatellite markers, divided into two panel panels.

In the beginning, DNA was isolated from the excrement and swab test has done. The analysis was carried out on DNA samples of 170 Czechoslovakian wolf dog breed and 39 DNA samples of the Eurasian wolf. Further, a suitable microsatellite system was optimized based on the primer concentration, the volume of the reaction mixture, the DNA concentration, and the number of cycles. The selected genotypes were tested using multiplex PCR and capillary electrophoresis and four repetitive genotyping were carried out.

In total, 73 different alleles were detected in 11 loci, among the Czechoslovakian dogs 67 different alleles in 11 loci, the wolves found 31 alleles in 11 loci.

During genotyping process errors has been reported almost in all phenomena that can be in error sources. These include the contamination of enviromental DNA samples, allelic dropout, PCR artefacts, zero allele. For evaluating the genetic diversity of selected breeds of dogs and wolves and determining the population parameters, several software programs were used.

The obtained results indicated a high distinctive ability of the microsatellite system and a low Genotyping Error.

**Keywords:** *Candidae*, *Canis familiaris*, *Canis Lupus*, phylogeny, microsatellites, genotyping, multiplex PCR, capillary electrophoresis, errors

## Obsah

1 Úvod.....	1
2 Cíle práce .....	2
2.1 Vědecká hypotéza .....	2
2.2 Cíle práce .....	2
3 Literární rešerše .....	3
3.1 Canidae (psovití).....	3
3.1.1 Taxonomické zařazení psa .....	3
3.1.2 Domestikace psa .....	5
3.1.3 Fylogenetický původ.....	6
3.1.4 Genetika psů .....	8
3.2 Repetitivní sekvence .....	8
3.2.1 Mikrosatelity .....	11
3.3 Metody .....	14
3.3.1 Polymerázová řetězová reakce (PCR) .....	14
3.3.2 Elektroforéza.....	17
3.3 STR genotypování .....	20
3.4 Problematika chybovosti při genotypování .....	21
4 Materiál a metody .....	23
4.1 Živočišný materiál a izolace DNA.....	23
4.2 Izolace DNA .....	23
4.3 Polymerázová řetězová reakce (PCR) .....	25
4.3.1 Testování DNA izolované z bukálních stěrů .....	27
4.3.2 Testování DNA izolované z exkrementů .....	28
4.4 Elektroforéza.....	29
4.4.1 Agarózová elektroforéza.....	29
4.4.2 Kapilární elektroforéza .....	29
4.5 Statistická analýza a zpracování dat .....	30
5 Výsledky .....	32
5.1 Ověření čistoty a stanovení množství DNA .....	32
5.2 Výsledky optimalizace reakční směsi pro analýzu DNA izolované z exkrementů .....	34
5.3 Analýza chybovosti.....	35
5.4 Populační analýza .....	38
6 Diskuze .....	43
6.1 Optimalizace mikrosatelitních markerů.....	43
6.2 Hodnocení chybovosti .....	43

7 Závěr .....	45
8 Seznam citované literatury.....	47
9 Seznam použitých zkratek .....	57
10 Přílohy.....	58

## Seznam obrázků

Obr. 1	Fylogenetické vztahy v rámci čeledi Canidae vypočítané na základě 15 kb jaderných exonů a intronů .....	4
Obr. 2	Schéma vzniku psa z vlka. Šířka šipky naznačuje velikost populace, jsou vyznačeny bottlenecky na počátku domestikace a při vzniku plemen.....	7
Obr. 3	Fylogenetický strom vytvořený na základě analýzy mikrosatelitů, znázorňující nejstarší plemena psů.....	7
Obr. 4	Opakující se DNA sekvence v eukaryotickém genomu .....	9
Obr. 5	Velikosti motivu, délky a množství satelitních sekvencí v eukaryotických organismech .....	10
Obr. 6	Replikační sklouznutí .....	12
Obr. 7	Ukázka koktavých produktů u genetického profilu.....	13
Obr. 8	Faktory ovlivňující mutaci a frekvenci mutace mikrosatelitů.....	13
Obr. 9	Schéma reakce PCR.....	15
Obr. 10	Schéma namnožení úseku DNA v PCR reakci .....	16
Obr. 11	Termocycler C1000 (Bio-Rad) .....	16
Obr. 12	Schématické znázornění amplifikace několika lokusů templátové DNA pomocí různých primerů v multiplexové PCR.....	17
Obr. 13	Aparatura na agarosovou elektroforézu .....	18
Obr. 14	Genetický analyzátor ABI PRISM 310 (Life Technologies).....	19
Obr. 15	Schematický popis kapilární elektroforézy.....	19
Obr. 16	Parametry kapiláry (Heiger, 2010).....	20
Obr. 17	STR genotypování .....	21
Obr. 18	Záznamy SSR profilů z kapilární elektroforézy .....	22



Obr. 19	Výsledek kontaminace environmentálního vzorku DNA.....	36
Obr. 20	Ukázky jevů ovlivňujících kvalitu genotypovacího procesu .....	37
Obr. 21	Ukázka testování vysokomolekularity DNA izolované z bukálních stěrů .....	33
Obr. 22	Ukázka testování vysokomolekularity DNA izolované z bukálních stěrů.....	34
Obr. 23	Základní informace o primerech pro Mini-DogFiler .....	25
Obr. 24	Ukázka vytvořeného alelického žebříku pro panel A mikrosatelitního systému Mini Dog-Filer .....	26
Obr. 25	Ukázka vytvořeného alelického žebříku pro panel B mikrosatelitního systému Mini Dog-Filer .....	27
Obr. 26	Porovnání odhadů frekvencí homozotů se skutečnými pro lokus VGL240.....	40
Obr. 27	Porovnání odhadů frekvencí velikostních rozdílů mezi alelami se skutečnými pro lokus VGL2409.....	41
Obr. 28	Výsledek shlukové analýzy. Na x-ose jsou uvedeny jednotlivé genotypy a na y-ose standardizované hodnoty genetické vzdálenosti	42

## Seznam tabulek

<i>Tab. 1</i>	<i>Koncentrace a čistota DNA izolované z exkrementů.....</i>	<i>32</i>
<i>Tab. 2</i>	<i>Koncentrace a čistota DNA izolované z bukálních srěrů.....</i>	<i>3</i>
<i>Tab. 3</i>	<i>Koncentrace primerů pro panel A a panel B.....</i>	<i>27</i>
<i>Tab. 4</i>	<i>Teplotní profil PCR reakce pro vzorky DNA izolované z bukálních stěrů.....</i>	<i>28</i>
<i>Tab. 5</i>	<i>Koncentrace primerů pro panel A a panel B.....</i>	<i>28</i>
<i>Tab. 6</i>	<i>Teplotní profil PCR reakce pro vzorky DNA izolované z exkrementů..</i>	<i>29</i>
<i>Tab. 7</i>	<i>Hodnoty chybovosti na alelu a genotyp pro jednotlivé lokusy.....</i>	<i>35</i>
<i>Tab. 8</i>	<i>Výsledky deskriptivní statistické analýzy pro populace Československých vlčáků .....</i>	<i>38</i>
<i>Tab. 9</i>	<i>Výsledky deskriptivní statistické analýzy pro vlky.....</i>	<i>39</i>
<i>Tab. 10</i>	<i>Výsledky deskriptivní statistické analýzy populace Československých vlčáků a vlků dohromady .....</i>	<i>39</i>

# 1 Úvod

Pes domácí (*Canis lupus familiaris*) je největší domestikovaná šelma. Proces domestikace psů začal o několik tisíc let dříve než domestikace jiných savců. Během procesu domestikace, který byl ukončen před 14 až 15 tisíci lety, došlo na základě selekce ke změně řady fyziologických a povahových vlastností. Dnes existují různé morfologie psů a po celém světě se chová více než 400 plemen a místních rázů psů.

V současné době se pes stal hojně využívaným modelem v mnoha moderních molekulárně genetických studiích. Jednou z nejrozšířenějších metod v genetických výzkumech psů je využití mikrosatelitních markerů (SSR). Na základě analýz s použitím SSR markerů se dá určit příslušnost daného jedince k plemeni nebo ověřit rodičovství, zkoumat evoluční vývoj, proces domestikace a fylogenetické vztahy psa, studovat genetickou diverzitu psích plemen. S ohledem na vysokou variabilitu SSR a jejich biologickou podstatu, jsou mikrosatelity velmi vhodným markerem pro populační studie.

## **2 Cíle práce**

### **2.1 Vědecká hypotéza**

Genetický výzkum využívající molekulární markery je nevyhnutelně zatížen chybami, které mohou být způsobeny řadou rozličných faktorů. To se týká jakéhokoliv typu vzorku ze kterého je izolovaná DNA a především u vzorků s nižší kvalitou či kvantitou DNA. Systematická analýza chybovosti dat založená na nezávislých izolacích a opakovaném genotypování pak umožňuje odhalovat příčiny a zároveň minimalizovat chybovost.

### **2.2 Cíle práce**

Pro ověření výše uvedené hypotézy je zapotřebí splnit dílčí cíle práce, které jsou pro přehlednost uvedeny v následujících bodech:

- 1) Provést nezávislé izolace DNA z různých materiálů (bukální stěry, exkrementy)
- 2) Optimalizovat vhodný mikrosatelitní systém
- 3) Provést opakované genotypování u vybrané skupiny vzorků a stanovit chybovost analýzy
- 4) Vyhodnotit genetickou diverzitu vybraných psích plemen/vlků a určit základní populační parametry

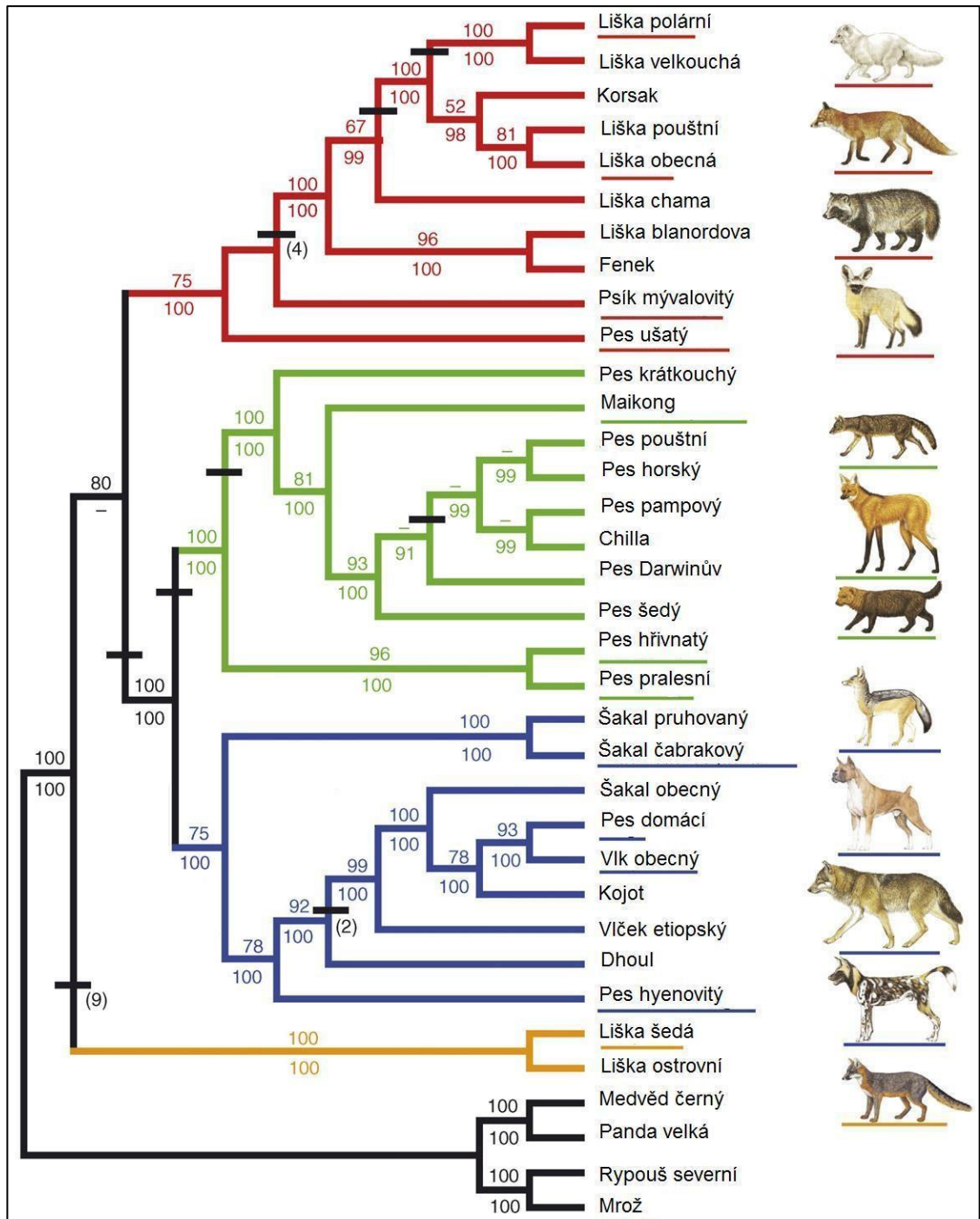
## 3 Literární rešerše

### 3.1 Canidae (psovítí)

#### 3.1.1 Taxonomické zařazení psa

Psi, vlci, kojoti, šakali a lišky jsou souhrnně označováni jako psovité šelmy a patří do čeledi psovitých (Canidae). Šelmy jsou řazeny do skupiny *Laurasiatheria* (Madsen et al., 2001), jedné ze čtyř základních linií placentálních savců (Murphy et al., 2001). V rámci řádu šelem patří psovité šelmy mezi psotvárné (Caniformia) a zahrnují 38 známých druhů (Serpell, 1995).

Co se týče fylogenetických vztahů v rámci čeledi Canidae, bylo odhaleno tři základní skupiny (Obr. 1), které ukázala analýza sekvencí vybraných variabilních oblastí jaderné DNA u 30 zástupců psovitých šelem (Lindbladh-Toh et al., 2005).



Obr. 1 Fylogenetické vztahy v rámci čeledi Canidae vypočítané na základě 15 kb jaderných exonů a intronů

Tři hlavní fylogenetické skupiny jsou vyznačeny různými barvami: liškovití (červeně), jihoameričtí (zeleně) a vlčí (modře). Molekulární fylogenetický strom byl vytvořen na základě sekvenace 12 exonů a 4 intronů o celkové délce 14 948 bp DNA. Černé značky naznačují výskyt tzv. indelů (inzerce a delece), ke kterým se vztahují hodnoty v závorkách uvádějící jejich množství. Hodnoty bootstrapu a bayesovské posteriorní pravděpodobnosti jsou uvedeny nad a pod jednotlivými větvemi fylogenetického stromu.

Upraveno dle Wayne a Ostrander, 2007.

### 3.1.2 Domestikace psa

Domestikace je dlouhý proces během kterého dochází na základě selekce ke změně řady fyziologických a povahových vlastností. Proces domestikace psů začalo několik tisíc let dříve než domestikace jiných savců, a to bez ohledu na velmi dlouhou fázi, kterou někteří nazývají protodomestikace (Galibert et al., 2011).

Doba procesu domestikace a studie vývoji vzpsů je prováděná na základě anatomického srovnání archeologických nálezů a molekulárních analýz (Germonpré et al., 2009; Castroviejo et al., 1999; Jennifer et al., 2002).

Kosterní nálezy vlků a raných hominidů byly nalezeny společně na několika místech, jako je Zhoukoudian v severní Číně, přičemž jejich stáří je datováno přibližně do doby 300 000 let před naším letopočtem, nebo jeskyně Lazaret na jihu Francie s pozůstatky starými 150 000 let před naším letopočtem. Tyto společné nálezy neprokazují, že již docházelo k domestikaci, ale naznačují, že lidé a vlci pravděpodobně sdíleli stejná území a žili v úzkém kontaktu (Germonpré et al., 2009). K nejstarším nálezům psa patří čelist z Německa stará 14 tisíc let (Benecke, 1987) a kosterní pozůstatky z Izraele, které jsou datovány do doby před 12 tisíci lety (Tchernov et Valla, 1997). Proto se předpokládá, že se psi poprvé objevili v Eurasii před 12 až 14 tisíci lety, a že pes byl jedním z prvních domestikovaných živočichů (Taylor, 2008).

Mezi molekulárními metodami převládají analýzy pomocí s použitím mitochondriální DNA, které naznačují, že se vlci a psi rozdělili do různých druhů zhruba před 100 000 lety (Castroviejo et al., 1999; Jennifer et al., 2002). Analýzy mitochondriální DNA (mtDNA) naznačily, že k tomu došlo před 40 000 lety (Peter Savolainen et al., 2002) a 16 300 (Carles Vilà et al., 1997). Zhang (2002) ve svém studiu mtDNA uvádí, že se pes oddělil od vlka jako samostatný druh před 100 000 lety. Srovnání jaderné genomické informace z vlků, psů a kojotů naznačuje možný čas domestikace 18 000 - 27 000 před n.l. (9 000 generací) (Lindblad-Toh et al., 2005). Nehledě na to, že se molekulární výpočty týkající se doby domestikace velmi liší, mají tendenci souhlasit s tím, že psovitě druhy byly domestikovány před cca 15 000 lety (Peter Savolainen et al., 2002).

Kombinované studie o chování, morfologii a obzvláště molekulární biologii dnes jasně ukazují, že vlk, *Canis lupus*, je hlavní, ne-li jediný předchůdce psa domácího. Jedna studie ukázala, že pes a vlk sdílí 98% své mitochondriální (mt) DNA. Mezi vlkem a nejbližším divokým příbuzným kojotem (*Canis latrans*) je společně pouze 92,5% mtDNA (Carles Vilà et al., 1997).

*Canis familiaris* (pes domácí) se dnes považuje ze všech domácích zvířat za zvíře člověku citově nejbližší (Räber, 1995). Různé morfologie psů existují již tisíciletí a reprodukční izolace mezi nimi byla formalizována s příchodem klubů plemen a standardy plemene v polovině 19. století (Schaefer, 2005). Dnes se po celém světě chová přes 400 plemen a místních rázů psů (Van Asch et al., 2009). Evoluční procesy, které jsou základem geneze této rozmanitosti, nejsou dotatečně prozkoumány (Boyko et al., 2010).

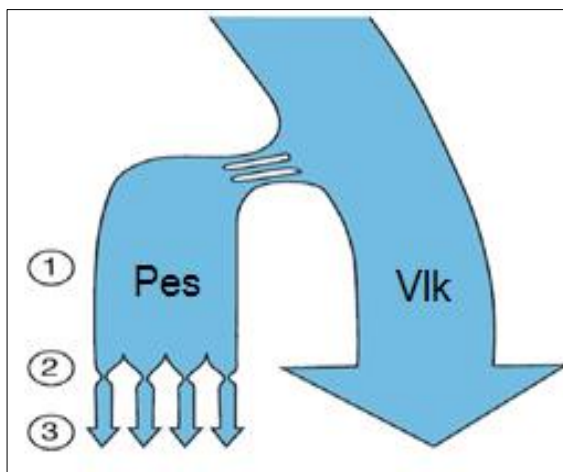
### 3.1.3 Fylogenetický původ

Obecně jsou za úplně první předky všech šelem považováni *Credonti* (Lange-Badré, 2009) a za prvního společného prapředka psovitých šelem se považuje *Miacis*, který je společným předkem vlků, šakala a kojota (Sole et al., 2012). Před 30–40 miliony lety se z rodu *Miacis* vyvinula psovitá to první skutečná psovitá šelma *Cynodictis*. Dále se z *Cynodictis* vyvinul předek vlků, psů a lišek *Tomarctus*, který se považuje za nejstaršího „prapsa“ (SMITH et al., 2016). Dnes je však dokázáno, že *Tomarctus* se na přímém vývoji psa domácího nepodílel a byl jen slepou vývojovou větví (Taylor et al.). V současné době se považuje, že předkem psů byl menší druh vlka (*Canis lupus pallipes*), který dodnes žije v Indii. Dalšími možnými předky psa jsou vlk mongolský (*Canis lupus chanco*) ze severní části Indie a Tibetu a také vlk stepní (*Canis lupus campestris*) ze Středního východu. Všichni psi domácí pocházejí z jednoho zdroje a nejsou geneticky spřízněni s žádným jiným druhem (Taylor, 2008).

Na společný fylogenetický původ vlků, šakala a kojota taky ukazuje schodný počet chromozómů a že se ve skutečnosti všichni členové *Canis* mohou mezi sebou pářit a produkovat fertillní hybridy (Adams et al., 2003). Na základě genetických prací prováděných pomocí mitochondriální DNA (mtDNA) existují názory, že psi pocházejí ze čtyř (Department of Bioresource Chemistry et al., 1996) nebo pěti (Peter Savolainen et al., 2002) izolovaných populací vlků.

Moderní plemena psů vznikla v důsledku minimálně dvou sad demografických událostí spojeným s rapidním zmenšením populační velikosti (bottleneck-efekt hrdla lahve) v začátcích domestikace. První bottleneck je spojen s domestikací vlka a to před asi 7 000 až 50 000 generacemi. Druhá série bottlenecků vyplývá z intenzivní selekce pro vytvoření moderních plemen, která proběhla přibližně před 50 až 100 generacemi (Obr. 2) (Lindbladh- Toh et al., 2005).

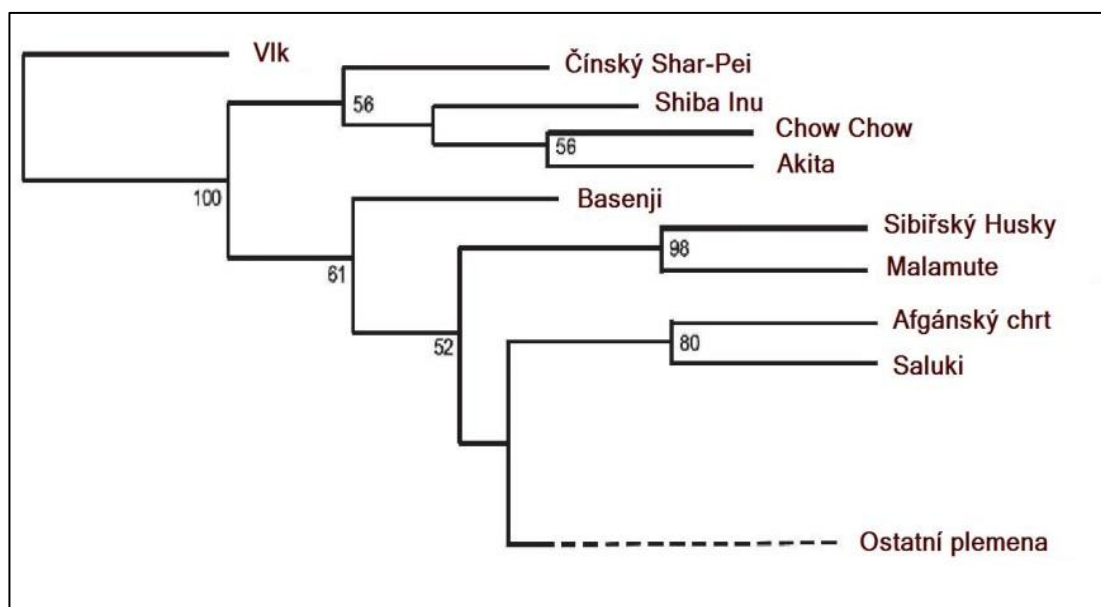




Obr. 2 Schéma vzniku psa z vlka. Šířka šipky naznačuje velikost populace, jsou vyznačeny bottlenecky na počátku domestikace a při vzniku plemen.

Upravebo dle Lindblad-Toh et al. 2005.

Na základě výsledků práce Parker et al. (2004), během které bylo analyzováno 96 mikrosatelitních lokusů u 414 čistokrevných psů reprezentujících 85 plemen, se dá rozlišovat malou skupinu starých plemen různého geografického původu, která byla základem pro moderní plemena (Obr.3).



Obr.3 Fylogenetický strom vytvořený na základě analýzy mikrosatelitů, znázorňující nejstarší plemena psů.

Hodnoty bootstrapu jsou uvedeny nad a pod jednotlivými větvemi fylogenetického stromu.

Upraveno dle Parker et al. 2004.

### 3.1.4 Genetika psů

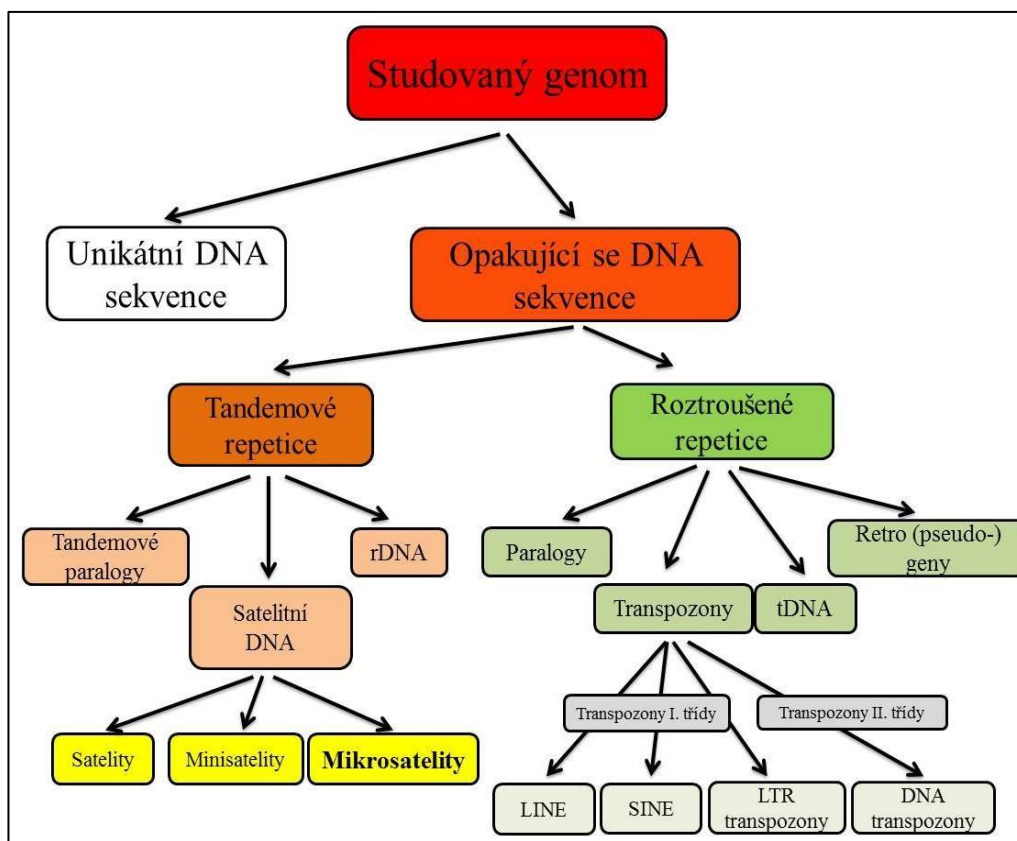
V roce 2005 byly publikovány výsledky projektu, jehož cílem bylo sekvenovat celý genom psa. Byla použita DNA feny Tashy plemene boxer, která byla vybrána ze skupiny 120 psů na základě nejnižší úrovně heterozygotnosti v testovaných lokusech (Lindbladh-Toh et al. 2005). Sestavená sekvence ukázala, že genom psa obsahuje cca  $2,4 \times 10^9$  párů bází DNA, což psa je o 18 % menší, než je genom člověka, a o 6 % menší než myší genom. Pes má 19 300 strukturních genů. Větší část DNA nic nekóduje (Parker et al., 2010 ; Hitte et al., 2005). Na základě sekvenování genomu psa bylo objeveno 2.1 milionů SNP (Lindblad-Toh et al., 2005). Bylo zjištěno, že četnost výskytu SNP činí mezi různými plemeny psů zhruba 1 SNP na 900 bp, mezi psy a kojotem 1 SNP na 420 bp, mezi psy a vlky zhruba 1 SNP na 580 bp (Ostrander a Wyen, 2004).

Na základě výzkumů bylo stanoveno, že lidé a psi mají podobné úrovně celkové nukleotidové diverzity,  $8 \cdot 10^{-4}$ , které představují celkový počet nukleotidových substitucí na bp. Rozdíly mezi plemeny psů jsou však mnohem větší než variace mezi lidskými populacemi (27,5% oproti 5,4%). Naopak, stupeň genetické homogenity je mnohem vyšší v rámci jednotlivých plemen psů než u odlišných lidských populací (Ostrander a Wyen, 2004).

Studie používající mikrosatelitní markery ukázaly, že každé plemeno má unikátní genetickou strukturu založenou na frekvenci a distribuci alel, která umožňuje jedinečnou identifikaci téměř každého plemene. Silná genetická diferenciací mezi plemeny psů naznačuje, že z jednotlivých genotypů psů může být určena příslušnost k plemenu (Heidi G. Parker et al., 2004).

### 3.2 Repetitivní sekvence

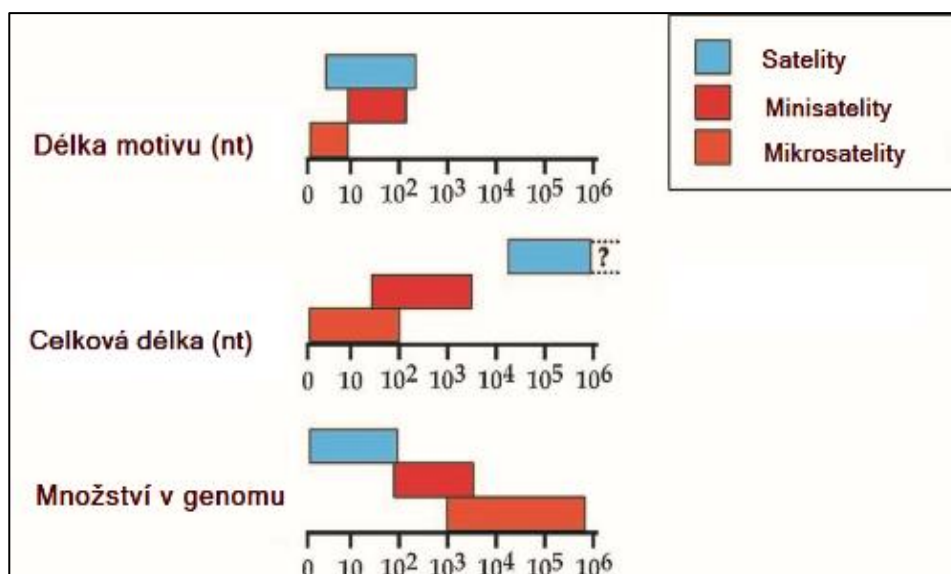
Genom, především eukaryotních organismů, se skládá z unikátní DNA a z opakujících se neboli repetitivních DNA sekvencí (Obr. 4). Opakující se sekvence většinou nekódují žádný peptidový řetězec a dělí se na tandemové a roztroušené repetice.



Obr. 4 Opakující se DNA sekvence v eukaryotickém genomu.

Upraveno dle Richard et al., 2008.

Roztroušené repetice jsou rozptýleny po celém genomu (Beránek, 2016), kdežto tandemové repetice následují těsně za sebou a jejich délka může dosahovat až řádu megabází. Podle délky repetitivních motivů, počtu jejich kopií v genomu a nukleotidového složení repetitivních sekvencí se tandemové repetice dále dělí na satelity, minisatelity a mikrosatelity (Obr. 5) (Richards et al., 2008).



Obr. 5 Velikosti motivu, délky a množství satelitních sekvencí v eukaryotických organismech.

Vysvětlivky: Pro každou kategorii (satellity, minisatelity a mikrosatelity) se v logaritmické stupnici zobrazuje rozdělení délky motivů, celková délka opakujících se jednotek a množství každé opakované kategorie tandemových repetic v eukaryotickém genomu. Maximální délka satelitní DNA není známa kvůli nedostatku informací o sekvenci (tečkované čáry a otazník).

Satelitní DNA jsou nekódující DNA sekvence dlouhé 20 – 1000 bp tvořících bloky o velikosti až milionu párů bází (Volkov, 2007).

Minisatelitní DNA představuje motivy dlouhé 6 – 100 bp, které jsou součástí telomer a jiných částí chromosomů (Vergnaud et Denoeud, 2000). Celková délka minisatelitů bývá od 100 bp do 20 000 bp (Beránek, 2016). Minisatelity jsou často bohaté na G / C báze a rychle mutují (Vergnaud et Denoeud, 2000) a předpokládá se, že vznikají díky replikačnímu sklouznutí nebo rekombinace mezi krátkými přímými opakováními (Haber et Louis, 1998; Taylor et Breden, 2000).

Mikrosatelity jsou krátké tandemové repetice dlouhé 1- 6 nukleotidů (Hile et al., 2010), nicméně někteří autoři uvádějí odlišnou délku jako např. 2 – 8 bp (Bellemain, 2005) či 2- 5 bp (Chistiakov et al., 2008). Typicky dosahují celkové délky v řádu několik desítek bází (Roztočil et Bartoš, 2011).

### 3.2.1 Mikrosatelity

Mikrosatelity jsou známé také jako krátké tandemové repetice (SSR- Single Sequence Repeats) nebo jednoduché opakující se sekvence (STRs- Short Tandem Repeats) (Lepais et al., 2011).

U eukaryotických organismů se STRs nejvíce vyskytují v genomu savců, přičemž mezi savci se neobvykle velký počet mikrosatelitů objevuje u hlodavců (Bellemain et al., 2005). V genomu prokaryotních organismů se mikrosatelitní sekvence příliš nevyskytují (Morgante et al., 2002).

Bylo zjištěno, že počet mikrosatelitních lokusů pozitivně koreluje s velikostí genomu u savců (Jurka et al., 2000; Katti et al., 2001), ale u rostlin je tomu naopak (Morgante et al., 2002). Zároveň platí, že četnost výskytu SSR oblastí se značně liší i mezi blízkými příbuznými druhy jako jsou lidé a šimpanzi (Webster et al., 2002).

Nejčastějším typem mikrosatelitního opakování jsou jednonukleotidové repetice, především adeninové (Bellemain et al., 2005). Druhým nejrozšířenějším typem motivů jsou dinukleotidové motivy, mezi které patří (CA)<sub>n</sub>, (AT)<sub>n</sub>, (GA)<sub>n</sub>, (GA)<sub>n</sub>, které se často nachází v intronech a v případě (AT)<sub>n</sub> i v místech replikačních počátků (Bellemain et al., 2005). Pro kódující sekvence některých genů jsou typické hexanukleotidové a trinukleotidové repetice (Beránek, 2016).

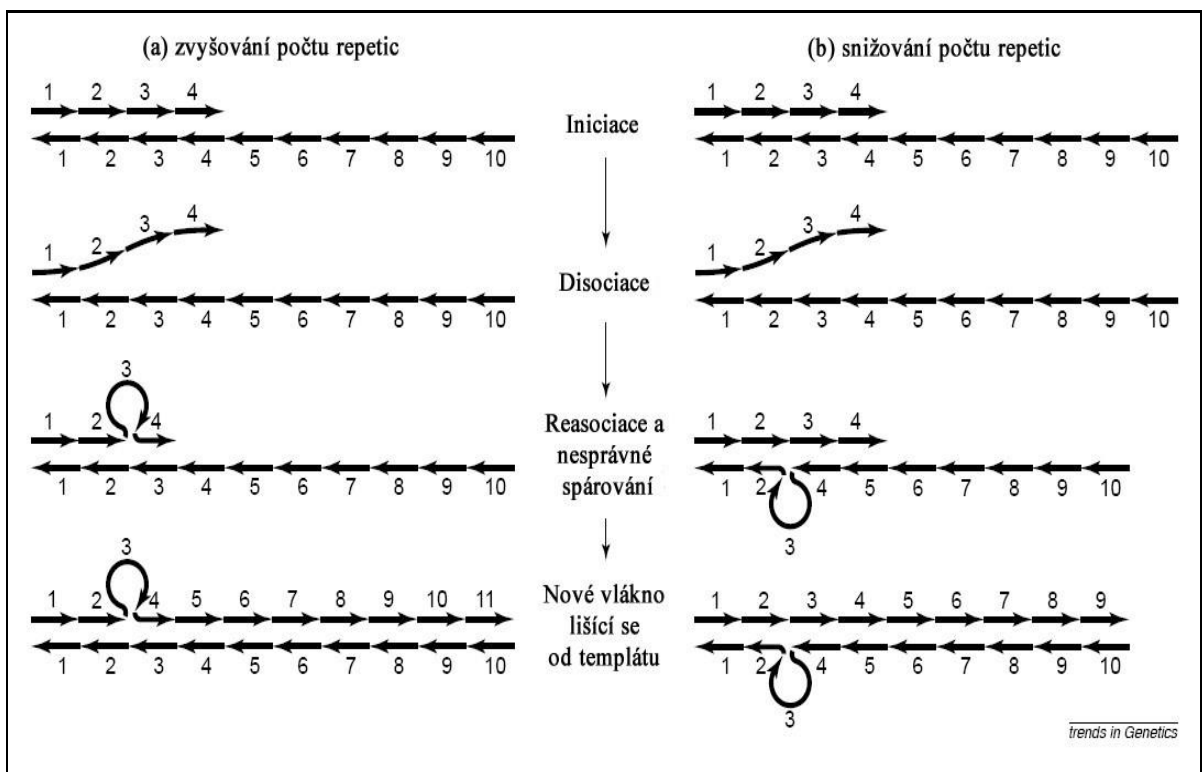
#### 3.2.1.2 Polymorfismus a mutace mikrosatelitů

Polymorfismem v DNA se nazývá přirozeně se objevující změny v sekvenci DNA s více než jednou alelou, která je zastoupena v populaci s frekvencí více než 1%. Příčinou mnoha polymorfismů DNA je vysoká variabilita opakujících se sekvencí DNA (Vojáček et Kettner, 2017).

Mikrosatelitní polymorfismy jsou multialelické a většinou to jsou dinukleotidové repetice. Fenotypově se obvykle neprojevují, neboť se nacházejí buď v úsecích mezi geny nebo uvnitř genů, zejména v intronech. Některé typy mikrosatelitních opakování se však mohou nacházet i v kódujících oblastech genů. Tyto polymorfismy mohou vést k záměně aminokyseliny, a pak se mohou projevit proteinovým polymorfismem (Vojáček et Kettner, 2017). Stále častěji se ukazuje, že i polymorfismy v nekódujících oblastech či polymorfismy, které nevedou k záměně aminokyseliny, nemusí být fenotypově neutrální – mohou podmiňovat

určité lehčí, netypické formy nemocí (hranice mezi polymorfismem a mutací je někdy velmi tenká) (Zhivotovsky et al., 2003; Омельченко et al., 2018).

Vysoký polymorfismus SSR je důsledkem jejich zvýšené mutační rychlosti. Dle Li Jin (1996) se frekvence mutace mikrosatelitů pohybuje od  $1.2 \cdot 10^{-4}$  do  $1.5 \cdot 10^{-2}$ . Bylo navrženo několik mutačních mechanismů, které zvyšují variabilitu mikrosatelitů, mezi které patří replikační sklouznutí, retrotranspozóny a nerovnoměrný crossing-over (Richard a Pâques, 2000). Převládajícím z těchto mechanismů je sklouznutí DNA polymerázy, při kterém může dojít k posunu nukleotidu v rámci repetice a prodloužení nebo zkrácení replikovaného vlákna při replikaci. Sklouznutí je způsobeno zastavením DNA polymerázy v průběhu syntézy komplementárního řetězce, její disociací a rychlé reasociací v odlišné pozici (Obr. 6). Při opětovném nasednutí polymerázy nemusí být vlákna vždy plně komplementární kvůli chybnému párování nukleotidů, jelikož část vlákna může vytvořit „smyčku“ (Beránek, 2016), což vede k prodloužení či zkrácení řetězce podle toho, jestli se jedná o templátové vlákno (mateřské) nebo nově syntetizované (dceřiné).

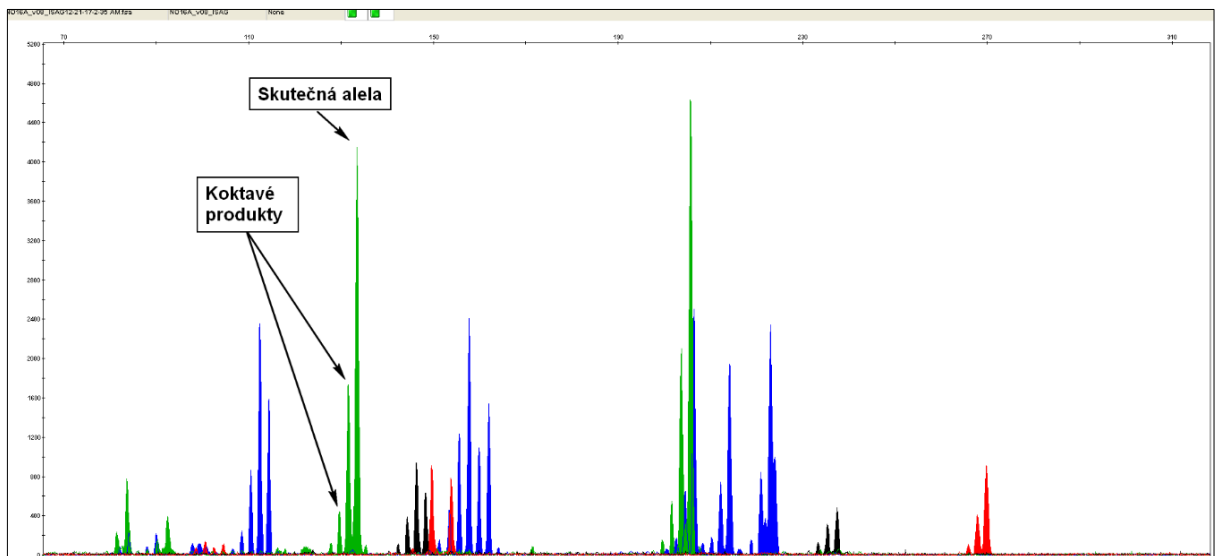


Obr. 6 Replikační sklouznutí.

Vysvětlivky: každá číslice reprezentuje jeden repetitivní motiv.

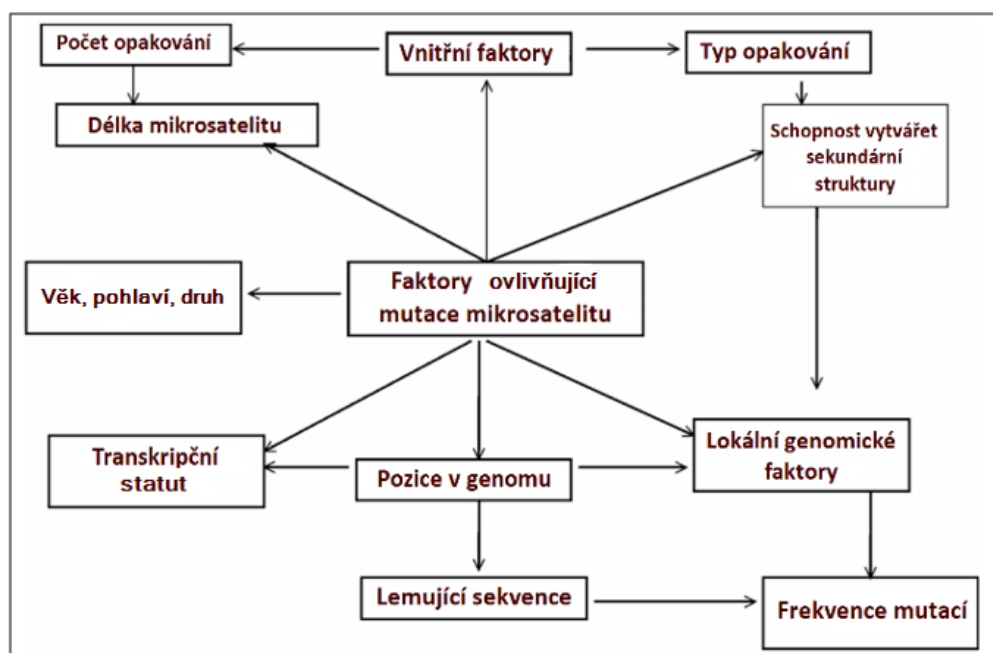
Upraveno dle Ellegren, 2004.

Ke sklouznutí polymerázy může také docházet při replikaci STR lokusů *in vitro* během PCR a vytvářejí se tzv. „kockavé“ produkty (Obr. 7).



Obr. 7 Ukázka kockavých produktů u genetického profilu.

Vnitřní faktory ovlivňující frekvence mutací mikrosatelitů zahrnují typ repetice a počet opakování (Obr. 8) (Atul Grover et Sharma, 2011).



Obr. 8 Faktory ovlivňující mutaci a frekvenci mutace mikrosatelitů.

Upraveno dle Atul Grover et Sharma, 2011.

Některé motivy mají větší mutační frekvenci kvůli vlastní komplementaritě, která způsobuje replikační sklouznutí DNA polymerázy na těchto místech. Stejně tak je pravděpodobné, že delší opakování poskytne více prostoru pro DNA-polymerázu, aby podstoupila sklouznutí. Nicméně mikrosatelity, které spadají do určitých genomických oblastí, například v genu, vykazují nižší frekvenci mutace ve srovnání s mikrosatelity, které jsou od těchto oblastí vzdáleny (Atul Grover et Sharma, 2011).

Polymorfismy jsou důsledkem přirozené variability DNA a jsou využívány v genetickém mapování, diagnostice, individuální identifikaci i při studiu fylogenetické příbuznosti mezi organismy (Zhivotovsky et al., 2003).

### 3.2.1.3 Využití mikrosatelitů jako molekulárně – genetických markerů

STR lokusy byly identifikovány v řadě genomů rostlin a živočichů a v současné době jsou široce používány v různých molekulárních analýzách DNA jako genetické markery (Butler, 2007).

SSR se staly zlatým standardem pro profilování DNA, jelikož jsou polymorfní a snadno detekovatelné pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR) za použití fluorescenčně značených primerů a laserového detekčního systému (Wictum et al., 2013).

U psů také bylo zaznamenáno velké množství markerů STR (Neff et al., 1999) a tyto jsou široce využívány v populační genetice a při analýze příbuznosti jak pro účely chovu, tak i pro forenzní analýzu (Jouquand et al., 2000; Wictum et al., 2013).

Molekulární analýza DNA živočichů se stále častěji používá jako důkaz v systémech trestního soudnictví po celém světě. U lidí analýza využívá možnosti přenosu biologického materiálu mezi pachatelem a obětí. U psů se DNA může odebírat například ve formě chlupů, slin, krve, moči a výkalů, která je přítomna ve velkém množství v domácím prostředí a je často používána během vyšetřování zločinu (D'Andrea et al., 1998; Tarditi et al., 2011)

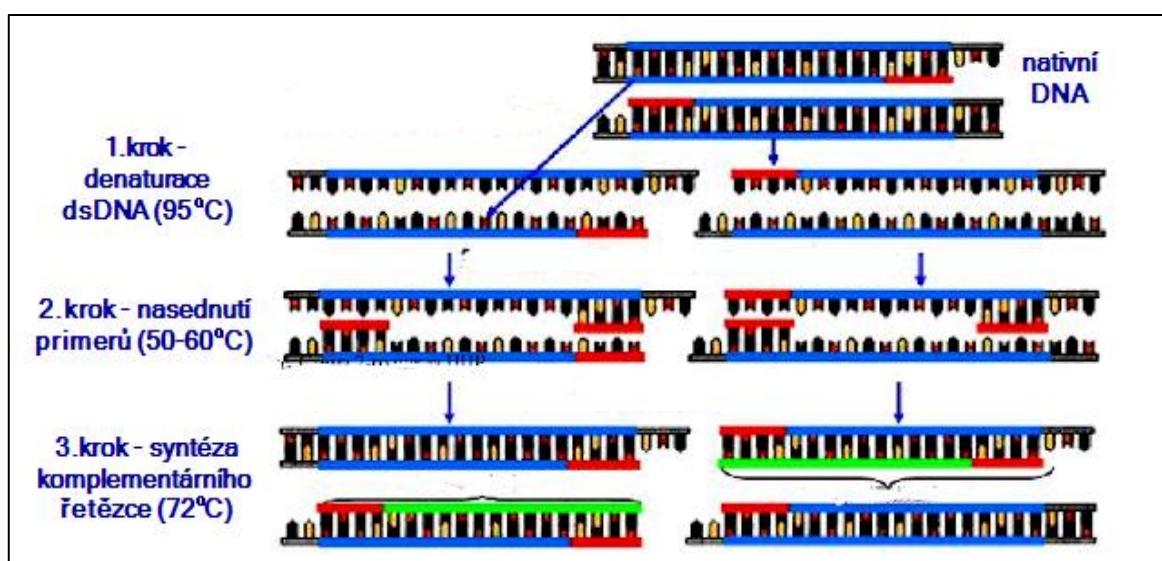
## 3.3 Metody

### 3.3.1 Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Polymerázová řetězová reakce (PCR- Polymerase chain reaction) je metoda umožňující detekci specifické sekvence DNA pomocí amplifikace *in vitro*. Princip PCR byl vyvinut v roce 1984 americkým biochemikem Karlem Banksem Mullisem v Kalifornii, který byl za tento objev v roce 1993 oceněn Nobelovou cenou za chemii (Bartlett et Stirling, 2003).



Princip PCR je založen na opakujících se cyklech, kdy každý cyklus zahrnuje tři kroky (BAKAR et al., 2017; Bouchalová et Hajdúch, 2016). V prvním kroku dochází k denaturaci dvouvláknových molekul DNA za působení vysoké teploty (90-97°C). Dále následuje fáze, která označuje jako anelace, při které dochází k rychlému poklesu teploty na 50-60°C a nasednutí primerů (hybridizace) na komplementární úseky DNA. Třetím krokem je syntéza komplementárního DNA vlákna pomocí *Taq* polymerázy při teplotě cca 72 °C (Obr. 9) (Joshi et Deshpande, 2010).

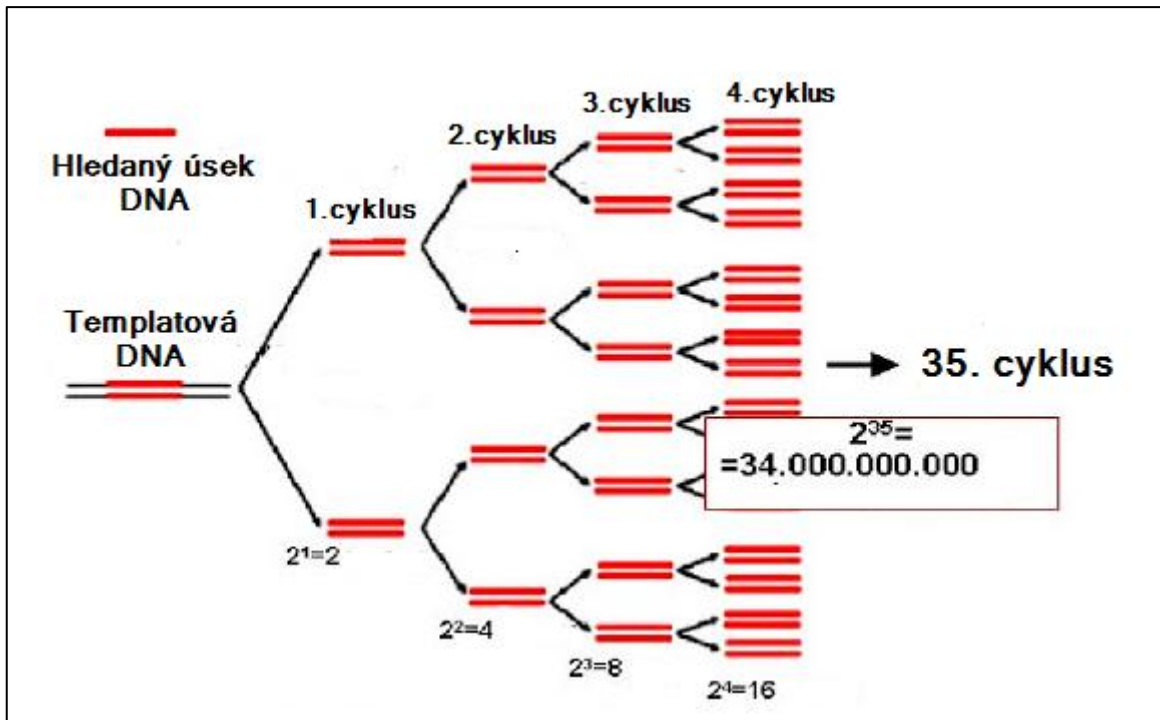


Obr. 9 Schéma reakce PCR.

Upraveno dle Сыч (2012).

Pro správný průběh PCR musí reakce obsahovat templátovou DNA, F a R primery, PCR pufr, *Taq* polymerázu,  $MgCl_2$  a směs všech 4 deoxynukleotidtrifosfátů (Lorenz, 2012).

Počet cyklu v PCR reakci se obvykle pohybuje od 15 do 35 cyklů (Кийко, 2011). Po každém cyklu PCR dojde k zdvojnásobení počtu kopií úseku, který je vymezen příslušnými primery, a proto množství cílové sekvence DNA roste exponenciálně (Gaurav Solanki, 2014). V ideálním případě se po 35 cyklech PCR vytvoří cca 34 000 000 000 kopií požadované sekvence výchozího templátu (Obr.10).



Obr. 10 Schéma namnožení úseku DNA v PCR reakci (2012).

PCR probíhá v přístroji zvaném termocykler (Obr.11), který zajišťuje zvýšení nebo snížení teploty o několik desítek stupňů Celsia během několika vteřin (Penka et Slavičková, 2011).



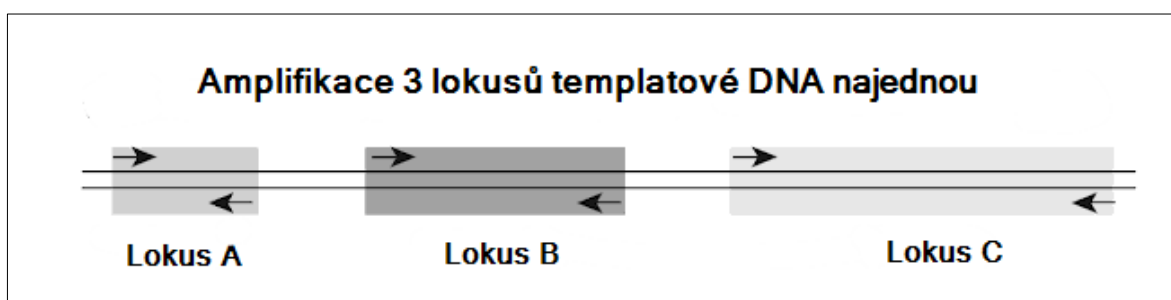
Obr. 11 Termocykler C1000 (Bio-Rad).

### 3.3.1.1 *Taq* polymeráza

Amplifikace DNA v PCR reakci probíhá pomocí termostabilní DNA polymerázy (Henry A. Erlich et al., 1991). Nejčastěji se používá *Taq* polymeráza, která byla izolována z bakterie *Thermus aquaticus* žijící v horkých pramenech při teplotě 110°C (Randall K. Saiki et al., 1988). *Taq* polymeráza syntetizuje komplementární vlákno podle templátové ssDNA ve směru od 5' konce k 3' konci (Gibbs, 1990). Vlastní syntéza nového vlákna probíhá ve 3. fázi - elongaci při teplotě 72°C. Po dokončení syntézy se znovu opakuje první krok PCR (denaturace při teplotě 95°C), ale *Taq* polymeráza zůstává aktivní.

### 3.3.1.2 *Multiplex* PCR

Při multiplexové PCR je v reakční směsi přítomno více párů primerů, což dovoluje amplifikovat různé oblasti templátové DNA (Obr. 12). Multiplex PCR umožňuje identifikovat jednotlivé typy ampliconů pomocí fluorescenční značky kovalentně navázané na primery (Butler, c2010).



Obr. 12 Schématické znázornění amplifikace několika lokusů templátové DNA pomocí různých primerů v multiplexové PCR.

Upraveno dle Butler (2010).

### 3.3.2 Elektroforéza

Elektroforéza je metoda, která se využívá k separaci molekul v elektrickém poli na základě jejich náboje nebo velikosti (Стручкова et Кальясова, 2012.).

### 3.3.2.1 Agarózová elektroforéza

V případě separace DNA se nejčastěji používá gelová elektroforéza (Obr. 13). Standardní gel obsahuje 1- 1,5 % agarózy. Gely tvoří poměrně hustou trojrozměrnou síť (Кузнецова et Романова, 2012), kterou kratší fragmenty a tedy menší molekuly procházejí rychleji než větší fragmenty a molekuly (Юрген Бёккер, 2017). Čím je obsah agarózy vyšší, tím je lepší separační schopnost gelu, ale zároveň je průběh elektroforézy pomalejší a technika přípravy gelu je náročnější (Кузнецова et Романова, 2012). Molekuly DNA se pohybují směrem ke kladné elektrodě (anodě) díky svému elektrickému náboji, který jim dávají fosfátové skupiny (Dovich et Zhang, 2000). Pro detekci DNA se využívá barvení například ethidium bromidem (Кондратенко et al., 2015).



Obr. 13 Aparatura na agarosovou elektroforézu.

Horizontální separační cela Sub Cell (Bio- Rad).

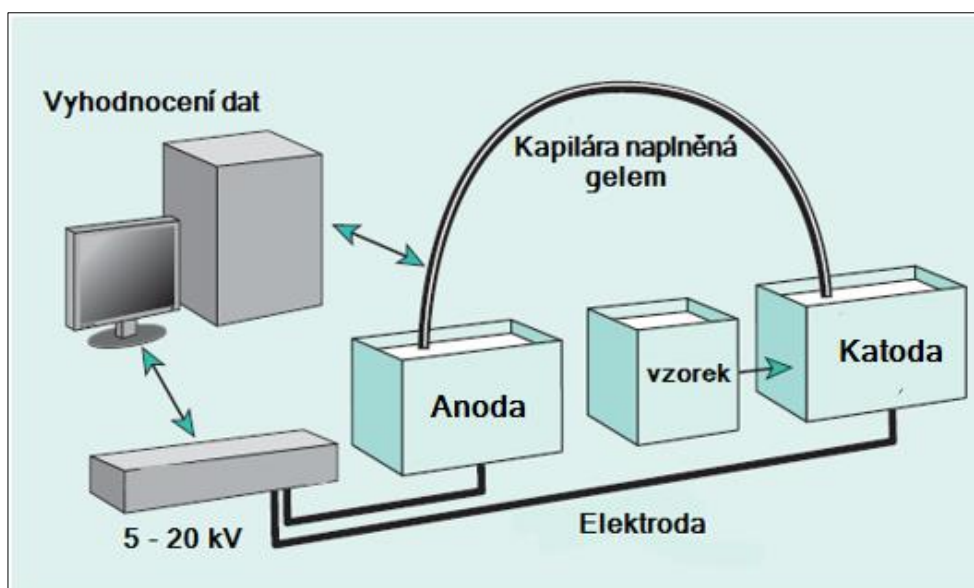
### 3.3.2.2 Kapilární elektroforéza

Kapilární elektroforéza (Obr. 14) je moderní analytická metoda, která využívá princip migrace nabitých částic v elektrickém poli (Kemp, 2015).



Obr. 14 Genetický analyzátor ABI PRISM 310 (Life Technologies).

Systém kapilární elektroforézy zahrnuje laser, skleněnou kapiláru, fluorescenční detektor, automatický podavač zkumavek (Butler, 2012) a zařízení, které vyhodnocuje data (Rak et al., 2008), jak je znázorněno na obrázku 15.

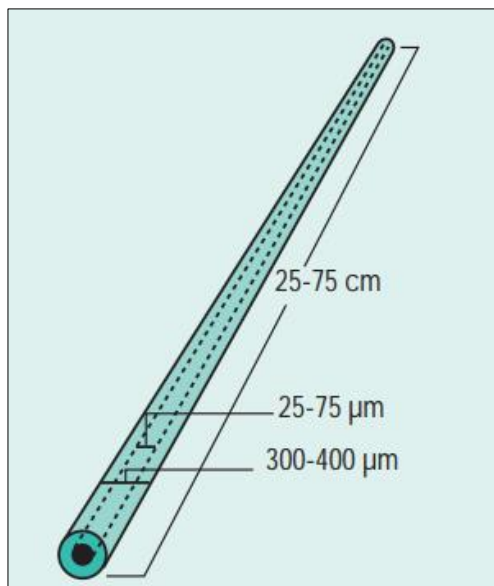


Obr. 15 Schematický popis kapilární elektroforézy.

Upraveno dle Heiger, 2010.



Separace probíhá v kapiláře naplněné roztokem elektrolytu (nejčastěji puftrem), kterým procházejí fragmenty molekul DNA (Bartůňková et Paulík, 2005). Kapiláry jsou vyrobené ze skla o průměru 25-75  $\mu\text{m}$ . Celková délka je taky různá, obvykle 25 až 75 cm (Obr. 15). Před každým vzorkem je nasán nový pufr (Heiger D., 2010).

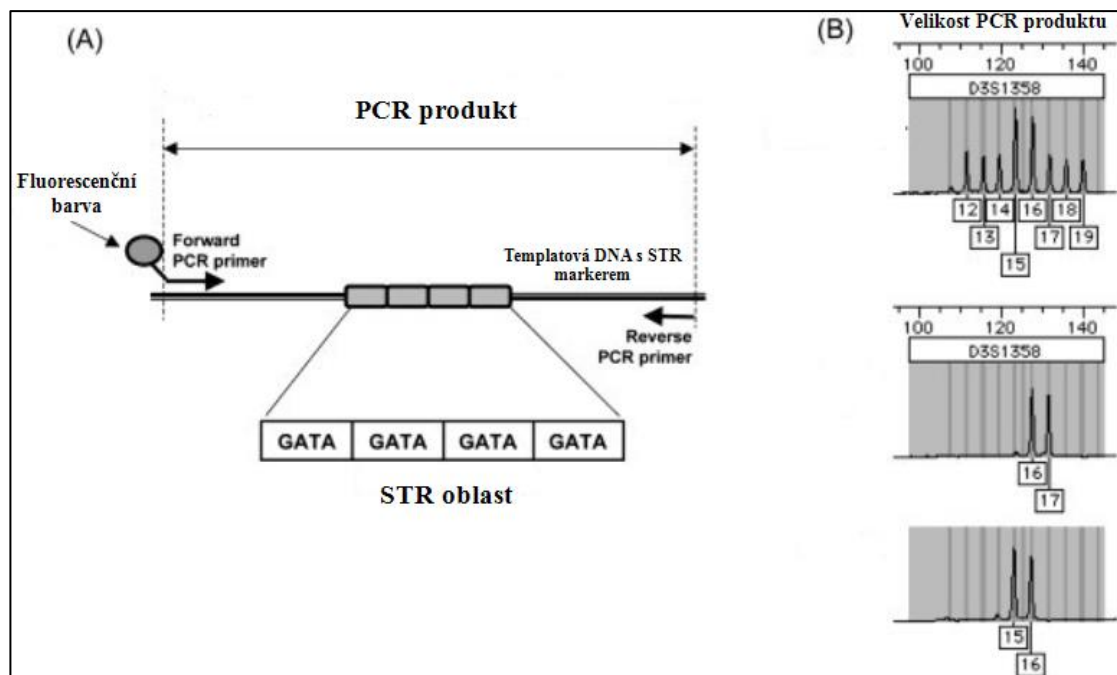


Obr. 16 Parametry kapiláry (Heiger, 2010).

Pro určení délky amplifikovaných fragmentů se obvykle používá fluorescenční metoda (Pelt-Verkuil et al., c2008).

### 3.3 STR genotypování

Pro stanovení genotypu daného jedince se nejčastěji používají STR markery. Analýzu lze provést různými způsoby, přičemž nejběžnějším postupem je amplifikace vybraných lokusů pomocí singleplex či multiplex PCR a následná separace v kapilární elektroforéze (Obr. 17) (Rak et al., 2008; Butler, 2004).



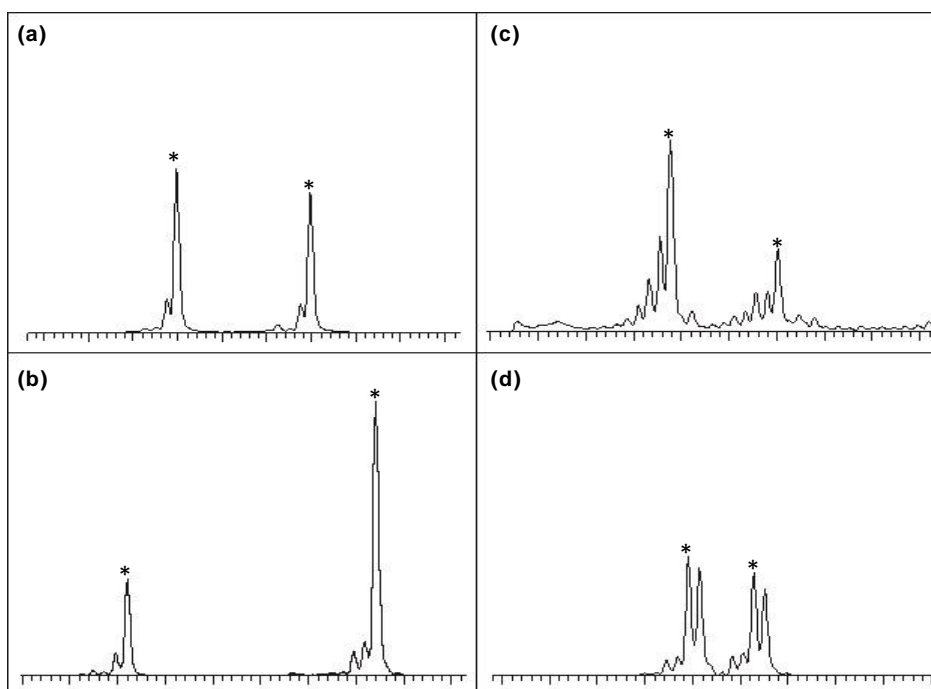
Obr. 17 STR genotypování.

- A) Amplifikace úseku DNA s STR oblastí pomocí fluorescenčně značených primerů.  
 B) Alelický žebřík pro STR marker D3S1358 a dva různé heterozygotní genotypy.

### 3.4 Problematika chybovosti při genotypování

Při genotypování může docházet k různým chybám (Obr. 18), mezi které patří sklouznutí polymerázy, netemplátové přidání nukleotidu, výskyt nulové alely a koktavých produktů (Lepais et al., 2011). Dalším faktorem zkreslujícím výsledek genotypování může být například i kontaminace vzorku (Obr. 19) a řada dalších jevů.

Mezi nejdůležitější jevy ovlivňující kvalitu genotypování je výskyt tzv. nulové alely, což je jev, kdy nedochází k amplifikaci jedné nebo obou alel příslušného lokusu během PCR (Obr. 20 d). Důvody mohou být různé a jako častá příčina je uváděna záměna nukleotidu či indel v místě nasedání primeru (PRIMMER et al., 1995). Někteří autoři ještě rozlišují tzv. technickou nulovou alelu či alelický drop-out, kdy amplifikaci ovlivňují podmínky PCR např. přítomnost inhibičních látek v reakci či kvalita templátové DNA (Chatain et al., 1998; Gagneux et al., 1997). Další příčinou může být i rozdílná účinnost PCR reakce kvůli různé délce alel u heterozygotního jedince. Kvůli tomu, že se krátké alely syntetizují rychleji než dlouhé, se podaří detekovat jenom kratší alelu (Wattier et al., 1998). Při vyhodnocení bude mít v takovém případě heterozygotní jedinec homozygotní profil (Dakin et Avise, 2004).



*Obr. 18 Záznamy SSR profilů z kapilární elektroforézy.*

Správný profil (a), špatný poměr výšky jednotlivých piků u heterozygota (PHR – peak height ratio), který vede k tzv. alelickému drop-outu (b), nadměrné kockání (c) a „dvojité“ píky (d). Skutečné alely jsou označeny hvězdičkami (Lepais et al., 2011).

Komplikace při genotypování však mohou způsobovat i další jevy jakými je výskyt kockavých produktů a přidávání netemplátového A. Kockavé produkty vznikají sklouznutím DNA polymerázy v průběhu PCR a vznikají tak amplikony kratší o jednu či několik repetic. Často pak bývá problém určit, jestli je příslušný signál skutečnou alelou nebo pouze kockavým produktem. Identifikaci alel ztěžuje i tzv. +A či netemplátové A, což je vlastnost řady polymeráz, které při syntéze nového vlákna často přidávají jeden nukleotid navíc oproti templátové sekvenci a typicky se jedná právě o adenin. Díky tomu při PCR vzniká část produktů bez netemplátového A a část produktů s netemplátovým A, což se projevuje jako „dvojpík“ na elektroforeogramu. Tento problém lze vyřešit několika způsoby, jakým je používání speciálních polymeráz, které tuto vlastnost nemají a nebo se prodlužuje doba trvání finální elongace, aby měla polymeráza čas syntetizovat netemplátové A u všech produktů.



## 4 Materiál a metody

### 4.1 Živočišný materiál a izolace DNA

Pro analýzu byly získány vzorky 170 psů plemene československý vlčák (*Canis lupus familiaris*) a 39 vzorků vlka euroasijského (*Canis lupus lupus*).

U plemene československý vlčák byly získány vzorky DNA pocházející z bukálních stěrů. Pro účely kvantifikace chybovosti bylo náhodně vybráno 23 jedinců plemene československý vlčák (čsv), u kterých byl získán kvalitní profil. U těchto vzorků byla provedena nezávislá izolace DNA a opakována genetická analýza stejným způsobem jako u původních vzorků, které nyní sloužily jako referenční genotypy. Každý z 23 vzorků byl testován ve 4 nezávislých opakováních.

Vzorky vlčí DNA pocházely z exkrementů a u všech 41 vzorků byla opětovně provedena její izolace. Jako referenční vzorky sloužily vzorky z původní izolace uskutečněné v roce 2015. Tyto nové izoláty byly stejně jako v případě vzorků čsv testovány ve 4 opakováních.

### 4.2 Izolace DNA

Izolace DNA byla provedena pomocí komerčně dodávaného kitu dle manuálu výrobce. Pro izolaci DNA z bukálních stěrů byl použit kit NucleoSpin Tissue (Macherey-Nagel) a pro izolaci z exkrementů byl použit DNA QIAmp DNA Mini Kit (Qiagen).

Stručný protokol pro izolaci genomové DNA z exkrementů je uveden v následujících bodech:

1. Bylo zváženo 180 – 220 mg exkrementů.
2. Bylo přidáno 1,6 ul roztoku Buffer ASL a důkladně promícháno pomocí vibrační třepačky po dobu 1 minuty, dokud nebyla směs homogenní.
3. Vzorek byl centrifugován po dobu 1 minuty při maximální rychlosti.
4. Byl odebrán supernatant cca 1,4 ml a přidána 1 tabletu InhibitEx.
5. Vzorek byl promíchán pomocí vibrační třepačky po dobu 1 minuty, inkubován při pokojové teplotě (15 - 25 °C) a centrifugován po dobu 3 min.
6. Supernatant byl přenesen na kolonku a centrifugován po dobu 3 min.
7. Do nové zkumavky byl přidán 25 µl protein kinázy A a 600 µl supernatantu. Zkumavka byla promíchána pomocí vibrační třepačky po dobu 15 sekund.

8. Vzorek byl inkubován při teplotě 70 °C po dobu 10 minut.
9. Bylo přidáno 600 µl 96 – 100 % etanolu a promícháno pomocí pipety nebo pomocí vibrační třepačky.
10. Připravený lyzát (600 µl) byl přenesen na kolonku, která byla vložena do sběrné zkumavky. Kolonka byla centrifugována po dobu 1 minuty. Sběrná zkumavka se supernatantem byla odstraněna. Kolonka byla umístěna do nové 2 ml sběrné zkumavky (v kitu).
11. Byl přidán 500 µl Buffer AW1. Zkumavka s kolonkou byla centrifugována po dobu 1 minuty. Sběrná kumavka se supernatantem byla odstraněna. Kolonka byla umístěna do nové 2 ml sběrné zkumavky (v kitu).
12. Přidat 500 µl Buffer AW2. Centrifugovat po dobu 3 minut. Sběrná zkumavka se supernatantem byla odstraněna. Kolonka byla umístěna do nové 2 ml sběrné zkumavky (v kitu).
13. Byl přidán 100 Buffer AE, inkubován při pokojové teplotě po dobu 1 min a následně centrifugován po dobu 1 min. Sběrná kumavka se supernatantem byla odstraněna.

Stručný protokol pro izolaci genomové DNA z bukálních stěrů je uveden v následujících bodech:

1. Do zkumavky s kartáčkem pro odběr DNA bylo přidáno 180 µl T1 a 25 µl roztoku Proteinázy K a promícháno. Směs byla důkladně promíchána pomocí pipety nebo pomocí vibrační třepačky pro získání uniformní suspenze.
2. Vzorek byl inkubován při teplotě 56 °C po dobu 3 hodin. Během inkubace byl třikrát promíchán pomocí vibrační třepačky.
3. Bylo přidáno 200 µl B3, promícháno pomocí vibrační třepačky a inkubováno při 70°C po dobu 10 minut.
4. Bylo přidáno 210 µl 100% ethanolu a roztok byl lehce promíchán.
5. Bylo přeneseno 600 µl připraveného lyzátu na kolonku, která byla vložena do sběrné zkumavky. Kolonka byla centrifugována po dobu 1 minuty při 11 000 x g. Sběrná zkumavka se supernatantem byla odstraněna. Kolonka byla umístěna do nové 2 ml sběrné zkumavky (v kitu).
6. Byl přidán 500 µl Wash Buffer I (s přidaným etanolem). Zkumavka byla centrifugována po dobu 1 minuty při 11000 x g. Sběrná zkumavka se supernatantem byla odstraněna. Kolonka byla umístěna do nové 2 ml sběrné zkumavky (v kitu).
7. Bylo přidáno 600 µl B5 na kolonku. Zkumavka byla centrifugována po dobu 1 minuty při 11000 x g. Sběrná zkumavka se supernatantem byla odstraněna. Kolonka byla umístěna do nové 2 ml sběrné zkumavky (v kitu).
8. Bylo přidáno 100 µl BE na kolonku. Centrifugovat po dobu 1 minuty při 11000 x g.

9. Sběrná kumavka se supernatantem byla odstraněna.

Získaná DNA byla následně testována z hlediska kvality a kvantity pomocí UV spektrometru S-111107 NanoPhotometer (Implen). Čistota izolované DNA byla zjišťována na základě poměru absorbcí A260/A280 (Tab. 1 a 2 ) a vysokomolekularita DNA byla ověřena pomocí elektroforetické separace v 1% agarózovém gelu. Vzorky byly barveny ethidium bromidem a vizualizovány pomocí UV transiluminátoru (Obr. 21 a 22).

### 4.3 Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Analýza chybovosti byla provedena na dvou panelech značených A a B u mikrosatelitního systému Mini-DogFiler (Kun et al., 2013), který byl speciálně navržený pro analýzu vzorků s degradovanou DNA. Detailní informace ohledně vybraných lokusů, sekvencí primerů, použitých fluoroforech a orientační velikosti uvádí obrázek 23.

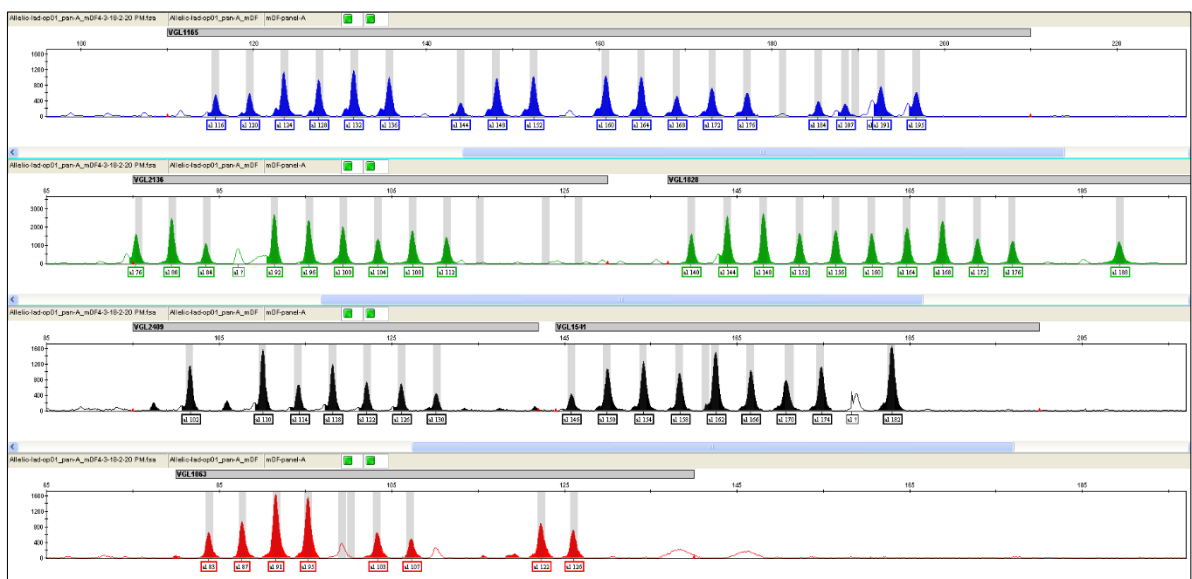
Lokus	Panel		Fluorescenční barva	MiniSTR sekvence primeru (5' - 3')	Velikostní rozmezí
K9 SRY	A	F	NED	GAACGCATTCCTGGTGTTGGT	80
		R		TGATCTCTGAGTTTTCGCAITTTGG	
VGL1063	A	F	PET	AGCCACAGAGCCTGAGAGTG	86-138
		R	GTTTCTT	CAATCACACCTTCCCTCCT	
VGL2136	A	F	VIC	TTAAAGGTAACAAGGATGTACTGATGG	77-121
		R		GCATGGAGAAAAAGCAGGTG	
VGL1541	A	F	NED	CCTGATGGAAGAGCTTACTGAGTTT	147-203
		R	GTTTCTT	TGAAGGTCTAGAGAGCAACTCCTG	
VGL1165	A	F	6FAM	ATCTTCCTCTGGCACCACCT	120-202
		R	GTTTCTT	TGAAGATACATAGAAAATAAGGCCAGA	
VGL1828	A	F	VIC	TCCCTTCATTTCTTCTCTCTC	135-199
		R	GTTTCTT	GGAGCCTGCTTCTCTCTCTC	
VGL2409	A	F	NED	GTGCTTCAACCTCTGTTTCTGAAT	100-148
		R	GTTTCTT	GATAGACCTCCATAACTGACCATAGG	
VGL3008	B	F	6FAM	AGAACACGGTTATTTGCTAGGC	112-180
		R	GTTTCTT	CCAACAGCAGCAGAGGAAGT	
VGL3438	B	F	VIC	TGCTACACTATATGTTGGCAAATTGA	100-152
		R	GTTTCTT	GGACTGCCCTCACAAAGCAT	
VGL2009	B	F	PET	GCTCTTAAATTTTCTGGGTTTGG	105-145
		R	GTTTCTT	GAATTTCCGGTGTGTATATCCAGT	
VGL3112	B	F	PET	CCAATAGAGCATTAAAGTAGAGCTGAAA	160-192
		R	GTTTCTT	TTCAGAATTAATCTCCTCACTTTTAATAATATC	
VGL1606	B	F	NED	TCTGATTCTAAAGGGTAGTAAAAAGGA	112-176
		R	GTTTCTT	TAAGCTAAAAAGATACTATTTCATTGG	

Obr. 23 Základní informace o primerech pro Mini-DogFiler.

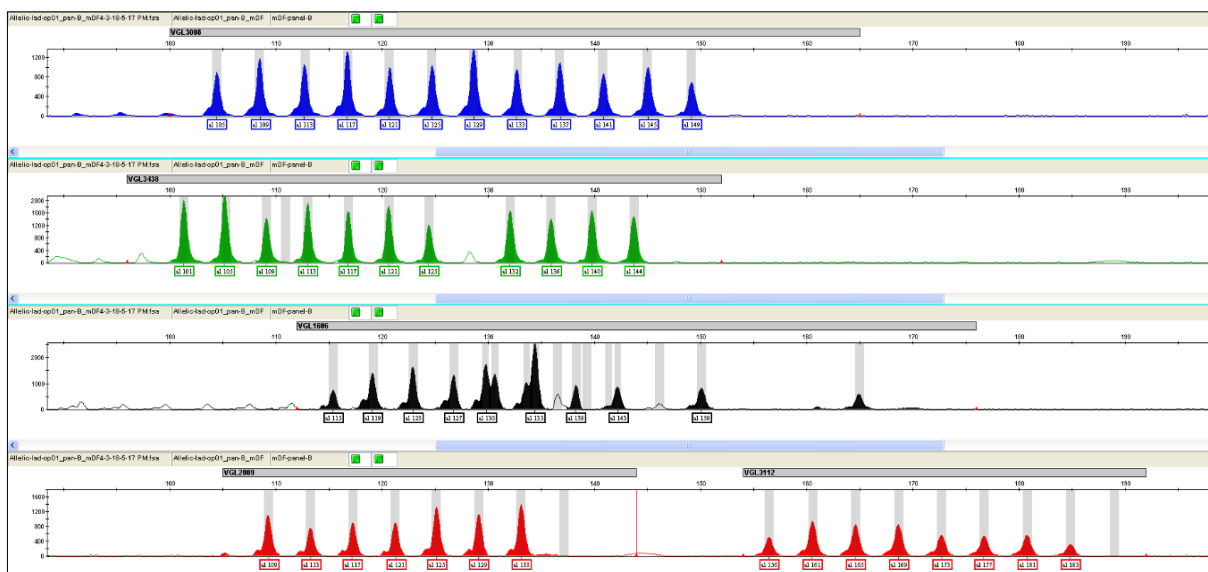
První fáze optimalizace byla prováděna na 4 testovacích genotypech s dostatečným množstvím DNA, která byla izolována z bukálních stěrů, a poté následovalo testování na dalších 4 vzorcích, jejichž DNA byla získána izolací z exkrementů. Nejdůležitější součástí optimalizačního procesu bylo stanovení nejvhodnějších koncentrací pro jednotlivé primery s ohledem na účinnost amplifikace, velikost ampikonů a použitou fluorescenční barvičku. Dle

příslušného primeru byly testovány koncentrace v rozmezí od 0,07  $\mu\text{M}$  do 0,6  $\mu\text{M}$ . Pro DNA izolovanou z exkrementů bylo dále testováno množství DNA v reakci (2 nebo 4  $\mu\text{l}$ ), počet PCR cyklů (35 nebo 40) a celkový objem reakční směsi (10 nebo 20  $\mu\text{l}$ ).

Pro srovnávací účely paralelně běžících analýz, zajištění konzistence mezi jednotlivými běhy a celkové zvýšení kvality práce byl spolu s testovacími genotypy použit i tzv. alelický žebřík vytvořený v laboratoři KGŠ (Obr. 24 a 25). Tento žebřík byl vytvořen smícháním vhodných genotypů, které dohromady reprezentují většinu detekovaných alel pro testované lokusy. Dále byly rovněž používány negativní kontroly, které sloužily k ověření zda nedošlo ke kontaminaci vzorků během PCR.



Obr. 24 Ukázka vytvořeného alelického žebříku pro panel A mikrosatelitního systému Mini Dog-Filer.



Obr. 25 Ukázka vytvořeného alelického žebříku pro panel B mikrosatelitního systému Mini Dog-File.

#### 4.3.1 Testování DNA izolované z bukálních stěrů

Veškeré amplifikace byly prováděny v podobě tzv. multiplex PCR a finální složení reakční směsi o objemu 10  $\mu$ l bylo následující: 1x Multiplex PCR Plus Kit (Qiagen), 1  $\mu$ l primerové směsi obsahující 7 (panel A) nebo 5 (panel B) párů primerů, 10 ng DNA a 3  $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O. Koncentrace jednotlivých primerů pro panel A a panel B uvádí tabulka 3.

Tab.3 Koncentrace primerů pro panel A a panel B.

Panel	Lokus	c [ $\mu$ M]
A	K9 SRY	0,1
A	VGL1063	0,4
A	VGL2136	0,1
A	VGL1541	0,2
A	VGL1165	0,2
A	VGL1828	0,1
A	VGL2409	0,2
B	VGL3008	0,07
B	VGL3438	0,05
B	VGL2009	0,2
B	VGL3112	0,2
B	VGL1606	0,2

Amplifikace probíhala v termocykleru C1000 (Bio-Rad) nebo T Gradient Thermo (Biometra) s teplotním profilem uvedeným v tabulce 4. Po ukončení amplifikace byly vzorky v termocykleru ochlazeny na 12°C.

*Tab. 4 Teplotní profil PCR reakce pro vzorky DNA izolované z bukalních stěrů.*

	<b>Doba trvání</b>	<b>Teplota °C</b>	<b>Počet cyklů</b>
<b>Před-denaturace</b>	900 s	95	1
<b>Denaturace</b>	30 s	94	35
<b>Annelace</b>	90 s	60	35
<b>Elongace</b>	60 s	72	35
<b>Finální elongace</b>	4800 s	72	1

#### 4.3.2 Testování DNA izolované z exkrementů

Na základě testování řady variant multiplex PCR bylo finální složení reakční směsi o objemu 10 µl následující: 1x Multiplex PCR Plus Kit (Qiagen), 1 µl primerové směsi obsahující 7 (panel A) nebo 5 párů (panel B) primeru a 4 µl DNA. Koncentrace jednotlivých primerů pro panel A a panel B uvádí tabulka 5.

*Tab.5 Koncentrace primerů pro panel A a panel B.*

<b>Panel</b>	<b>Lokus</b>	<b>c [µM]</b>
<b>A</b>	K9 SRY	0,1
<b>A</b>	VGL1063	0,4
<b>A</b>	VGL2136	0,2
<b>A</b>	VGL1541	0,4
<b>A</b>	VGL1165	0,4
<b>A</b>	VGL1828	0,2
<b>A</b>	VGL2409	0,4
<b>B</b>	VGL3008	0,07
<b>B</b>	VGL3438	0,1
<b>B</b>	VGL2009	0,4
<b>B</b>	VGL3112	0,6
<b>B</b>	VGL1606	0,4

Amplifikace probíhala v termocykleru C1000 (Bio-Rad) nebo T Gradient Thermo (Biometra) s teplotním profilem uvedeným v tabulce 6.

Po ukončení amplifikace byly vzorky v termocykleru ochlazeny na 12°C a hned použity v návazných analýzách nebo byly uloženy do mrazícího boxu při teplotě -20°C.

*Tab. 6 Teplotní profil PCR reakce pro vzorky DNA izolované z exkrementů*

	<b>Doba trvání</b>	<b>Teplota °C</b>	<b>Počet cyklů</b>
<b>Před-denaturace</b>	900 s	95	1
<b>Denaturace</b>	30 s	94	40
<b>Annelace</b>	90 s	60	40
<b>Elongace</b>	60 s	72	40
<b>Finální elongace</b>	4800 s	72	1

## **4.4 Elektroforéza**

### **4.4.1 Agarózová elektroforéza**

Tento základní typ elektroforézy byl použit pro ověření výsledků izolace DNA. Pro testování byla použita cela SubCell GT (Bio-Rad) naplněná 1x TBE pufrem. Vlastní elektroforetická separace probíhala v 1% agarózovém gelu při napětí 4 V cm<sup>-1</sup>.

### **4.4.2 Kapilární elektroforéza**

Před separací v kapilární elektroforéze byly PCR produkty nejprve naředěny v poměru 1:9-19 vodou. Dále byl 1 µl ředěného PCR produktu smíchán s 12 µl Hi-Di formamidu a 0,2 µl hmotnostního standardu GeneScan LIZ600 (Life Technologies). Výsledná směs byla denaturována v termocykleru při teplotě 95°C po dobu 5 minut a prudce ochlazená na 4°C.

Fragmentační analýza byla provedena pomocí přístroje ABI PRISM 310 (Life Technologies) s 47 cm dlouhou kapilárou, která byla vyplněna polymerem POP4 (Life Technologies). Doba nástřiku se pohybovala v rozmezí 5 až 7 s při napětí 3 až 15kV v závislosti na testovaném panelu a vzorku. Vlastní separace probíhala při teplotě 60°C po dobu 20 minut.

## 4.5 Statistická analýza a zpracování dat

Zpracování hrubých dat z fragmentační analýzy a identifikace jednotlivých alel dle vytvořených alelických žebříků bylo provedeno pomocí programu GeneMapper v4.1 (Life Technologies).

Chybovost dat byla počítána na základě nejčastěji používaných parametrů, jako je chybovost na alelu, chybovost na lokus a pozorovaná chybovost na genetický profil (Pompanon, 2005) společně s průměry těchto hodnot. Vychází se z předpokladu kdy bylo u  $n$  jedinců provedeno genotypování po jednotlivých lokusech u  $t$  opakování. Pro diploidní organismy bylo hodnoceno  $2nt$  alel a  $nt$  lokusů proti referenčním vzorkům.

Průměrná chybovost na alelu ( $e_a$ ) se počítá jako podíl alelických rozdílů ( $m_a$ ) vůči počtu replikovaných alel ( $2nt$ ):

$$e_a = \frac{m_a}{2nt}$$

Průměrná chybovost na lokus ( $e_l$ ) je vyjádřena jako podíl počtu genotypů s minimálně jedním alelickým rozdílem v příslušném lokusu vůči počtu replikovaných genotypů příslušného lokusu ( $nt$ ):

$$e_l = \frac{m_l}{nt}$$

Chybovost na genetický profil ( $e_{obs}$ ) je dána podílem počtu genetických profilů s minimálně jedním alelickým rozdílem a počtem replikovaných profilů ( $nt$ ):

$$e_{obs} = \frac{m_g}{nt}$$

Pro stanovení základních populačních deskriptorů jakými je počet alel ( $k$ ), polymorfní informační obsah (PIC), heterozygotnost pozorovaná ( $H_{obs}$ ) a očekávaná ( $H_{exp}$ ) byl použit software Cervus v3.0.3 (Kalinowski et al., 2007). Odhad střední chyby průměru heterozygotnosti očekávané byl proveden s pomocí programu Pedant (Johnson a Hayden, 2007). Testování případných odchylek od Hardy-Weinbergerovské rovnováhy a odhad frekvence nulových alel bylo provedeno v několika programech a sice Cervus v3.0.3 (Kalinowski et al., 2007) a MicroChecker v2.2.3 (van Oosterhout et al., 2004).



Dále byla zjišťována rozlišovací schopnost testovaného mikrosatelitního systému tj. schopnost jednoznačně identifikovat každého jedince a schopnost odlišit od sebe psa a vlka na molekulární úrovni. První metodou bylo párové porovnání jedinců, které bylo provedeno rovněž v programu Cervus 3.0.3 (Kalinowski et al., 2007), kdy byl postupně stanoven počet stejných genotypů při shodě ve všech lokusech, při rozdílu v jednom lokusu, dvou lokusech atd. Jako doplňující metoda byla použita hierarchická shluková analýza (CLU), která byla udělána v programu STATISTICA 13.3. (TIBCO Software Inc., 2017). Pro výpočet genetických vzdáleností mezi jedinci byla vytvořena  $D_A$  matice (Nei et al., 1983) v programu Populations v1.2.3.0 (Langella, 1999), která sloužila jako vstupní soubor pro CLU analýzu. Vlastní shlukování bylo provedeno metodou neváženého průměru skupin dvojic (UPGMA).

## 5 Výsledky

### 5.1 Ověření čistoty a stanovení množství DNA

Souhrnné výsledky stanoveného množství izolované DNA spolu s hodnotami poměrů absorbancí  $A_{260}/A_{280}$  uvádí tabulky 4a a 4b. Zároveň byla rovněž ověřena vysokomolekularita DNA pomocí agaróзовé elektroforézy (Obr. 20 a Obr. 21). Jak je z obrázků patrné, DNA izolovaná z bukálních stěrů vytváří očekávaný profil odpovídající slabě fragmentované a tedy kvalitní DNA. Naopak u řady vzorků DNA izolované z exkrementů byl získán profil svědčící o jejím malém množství a silné degradaci.

Tab. 1 Koncentrace a čistota DNA izolované z exkrementů

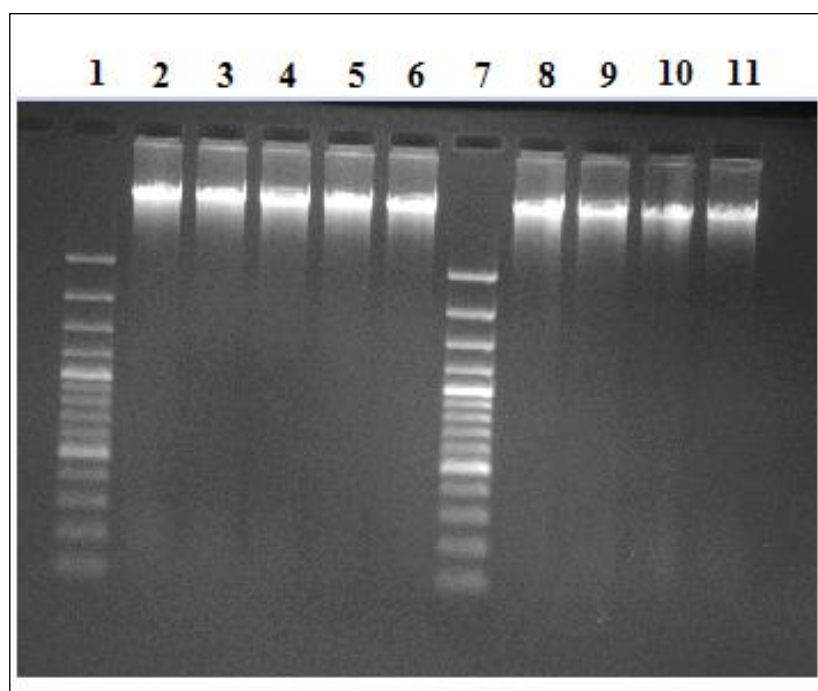
Název vzorku	c [ng/μl]	$A_{260/280}$	Název vzorku	C ng/μl	$A_{260/280}$	Název vzorku	c [ng/μl]	$A_{260/280}$
V1a	430	1,937	V14c	3033	2,061	V28	448	1,954
V2a	402	1,917	V15c	384	1,874	V29	727	1,988
V3a	568	1,934	V16c	1226	1,948	V30	250	1,845
V4	15	1,579	V17c	925	1,823	V31	2134	1,914
V5	10	1,538	V18	5396	1,544	V31a	862	1,977
V6	21,5	2,048	A19	6	3	V31b	2908	2,045
V7	334	2,055	A20	17	1,789	V31c	2958	2,023
V8	30,5	1,848	A21	40	2,286	V32	134	1,829
V9	42	1,909	A22	207	2,107	V32a	646	1,827
V10	74,5	1,935	A23	164	2,137	V32b	1087	1,962
V11	15,5	1,632	V24	63,5	2,016	V33	47	1,958
V12	29,5	1,735	V24	63,5	2,016	V34	172	1,859
V13c	1057	1,840	V25	274	1,919	V35	102	1,933

Poznámka: c – koncentrace.

Tab. 2 Koncentrace a čistota DNA izolované z bukálních srěrů

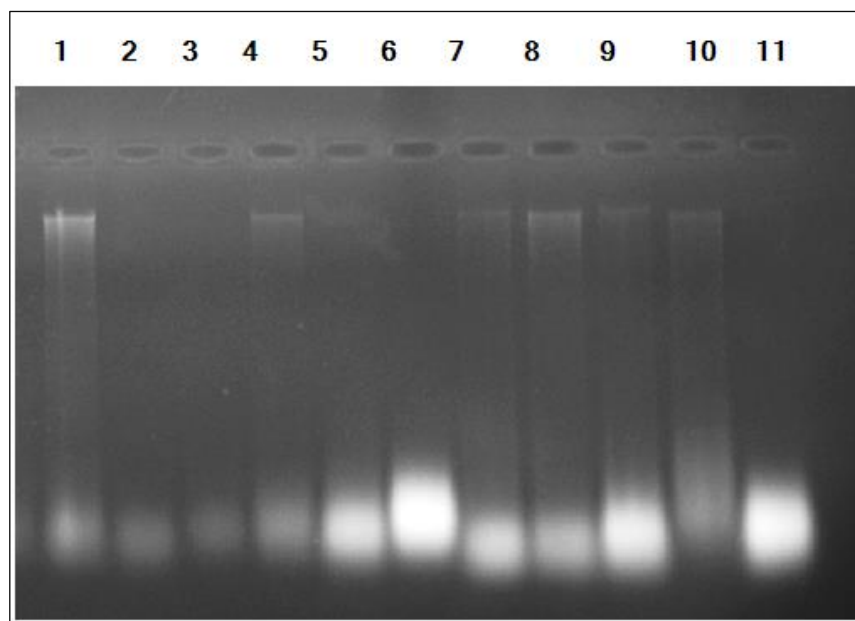
Název vzorku	c ng/μl	A <sub>260/280</sub>	Název vzorku	c [ng/μl]	A <sub>260/280</sub>	Název vzorku	c [ng/μl]	A <sub>260/280</sub>
<b>CSV34</b>	15,8	1,8	<b>CSV620</b>	10,5	2,1	<b>CSV906</b>	7,8	2,2
<b>CSV1311</b>	12,0	1,6	<b>CSV629</b>	10,8	2,1	<b>CSV990</b>	11,9	2,1
<b>CSV83</b>	8,4	2,0	<b>CSV634</b>	12,3	1,5	<b>CSV1013</b>	13,4	2,0
<b>CSV87</b>	9,5	2,1	<b>CSV676</b>	15,5	2,3	<b>CSV1018</b>	14,8	1,8
<b>CSV89</b>	18,3	2,2	<b>CSV874</b>	20,8	1,7	<b>CSV1020</b>	22,0	1,9
<b>CSV110</b>	20,5	1,9	<b>CSV844</b>	29,3	1,8	<b>CSV906</b>	7,8	2,2
<b>CSV612</b>	25,0	2,0	<b>CSV903</b>	24,0	1,8	<b>CSV990</b>	11,9	2,1
<b>CSV614</b>	22,0	1,7	<b>CSV904</b>	8,2	1,5			
<b>CSV616</b>	5,5	2,0	<b>CSV905</b>	6,3	1,9			

Vysvětlivky: CSV - československý vlčák.



Obr. 21 Ukázka testování vysokomolekularity DNA izolované z bukálních srěrů

Vzorky: 1 – hmotnostní standard GeneRuler Mix, 2 – CSV620, 3 – CSV629, 4 – CSV634, 5 – CSV844, 6 – CSV903, 7 – hmotnostní standard GeneRuler Mix, 8 – CSV905, 9 – CSV990, 10 – CSV1018, 11 – CSV1020



*Obr. 22 Ukázka testování vysokomolekularity DNA izolované z bukálních stěrů*

Vzorky: 1 – V4, 2 – V5, 3 – V14c, 4 – V17c, 5 – V28, 6 – V29, 7 – V30, 8 – V7, 9 – V8, 10 – V9, 11 – V10

## **5.2 Výsledky optimalizace reakční směsi pro analýzu DNA izolované z exkrementů**

Vzhledem k odlišné kvalitě a vysoké fragmentaci “exkrementové” DNA oproti DNA z bukálních stěrů, bylo zapotřebí upravit koncentraci jednotlivých primerů v reakční směsi, jelikož v řadě případů výrazně dominoval signál z menších fragmentů, což vedlo k nevyrovnanému profilu na kapilární elektroforéze. Díky tomu pak docházelo k tomu, že malé fragmenty byly tzv. “off-scale”, čili CCD kamera nebyla schopna rozlišovat jednotlivé barevné signály, kdežto větší fragmenty bylo velmi obtížné detekovat.

Zároveň bylo zjištěno, že lepších výsledků amplifikace vlčích vzorků bylo dosaženo v menším objemu reakční směsi a tedy zvýšením koncentrace DNA spolu se zvýšením počtu cyklů PCR. Nicméně spolu s navýšením počtu PCR cyklů z 35 na 40 docházelo v řadě případů k výskytu nežádoucích artefaktů (Obr. 20c), které mohou zkreslovat výsledky genotypování. Na uvedeném obrázku 20c je ukázán stejný vzorek amplifikovaný při 35 cyklech (horní část Obr. 20c) a při 40 cyklech (dolní část Obr. 20c). Jak je patrné, tak při menším počtu cyklů nebyl detekován žádný PCR produkt, kdežto při 40 cyklech bylo detekováno několik signálů z nichž minimálně dva produkty (dolní část Obr. 20c) vyskytující se v oblasti ~120-130 bp by mohly být snadno zaměněny za skutečné alely. Díky možnostem srovnání s alelickým standardem je patrné, že se produkty vyskytují mimo binovací pole a není příliš pravděpodobné, že by se u

jednoho vzorku vyskytovaly hned dvě nové alely. Podobných případů bylo zaznamenáno více a bez zavedených standardů by identifikace artefaktů tohoto typu byla obtížná ne-li nemožná.

### 5.3 Analýza chybovosti

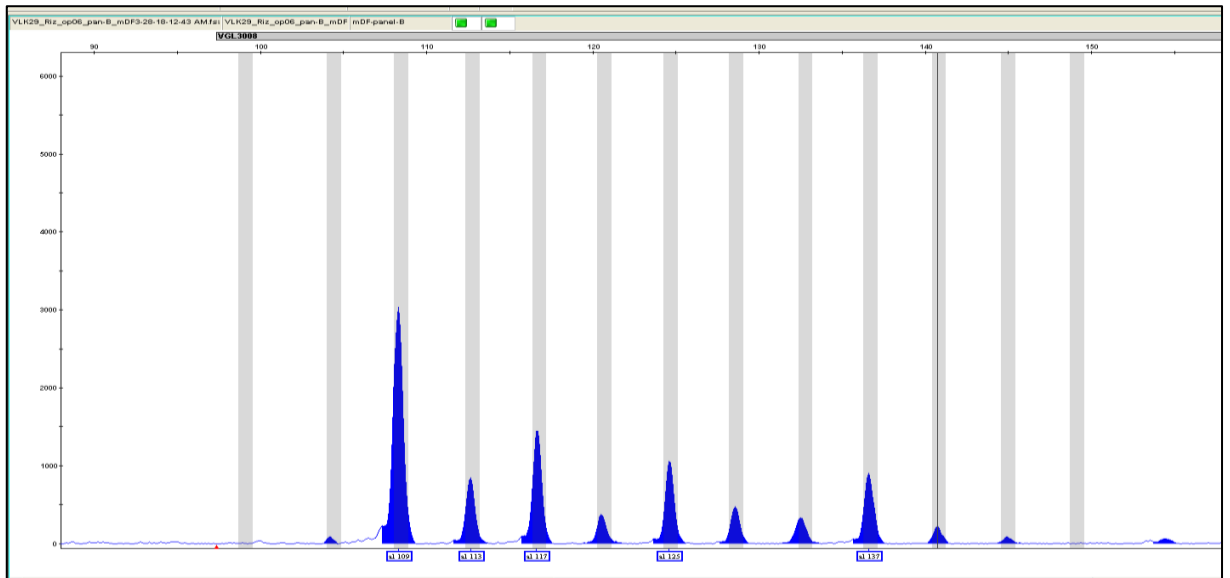
V průběhu genotypovacího procesu byly zaznamenány prakticky všechny jevy, které mohou být zdrojem chyb. Ať už se jedná o DNA kontaminaci enviromentálního vzorku (Obr. 19), alelický drop-out (Obr. 20a), PCR artefakty (Obr. 20b, c) či technickou nulovou alelu (Obr. 20d). Přestože tyto jevy převládají u potenciálně problematických vzorků s nízkou kvantitou a kvalitou DNA, zejména výskyt technické nulové alely byl poměrně běžný i u vzorků s DNA získané z bukálních stěrů.

V souhrnu bylo úspěšně amplifikováno pro oba panely všech 23 vzorků plemene československých vlčák ve 4 opakováních tj. 92 replikátů. Hodnoty chybovosti na alelu a genoty p pro každý lokus panelu A i B jsou uvedeny v tabulce 7, přičemž průměrná chybovost na alelu byla 0,09 % a průměrná chybovost na genotyp byla 0,18 %. Z hlediska nejpřísnějšího kritéria, chybovosti na genetický profil, byla chybovost 2,17 %. Dále byl zjištěn výskyt technické nulové alely v lokusu VGL2136 u 9,8 % genotypů, nicméně tento jev nevedl ke zkreslení výsledků z hlediska chybovosti, jelikož nedocházelo k amplifikaci žádné alely příslušného lokusu a tudíž záměně heterozygotů za homozygoty.

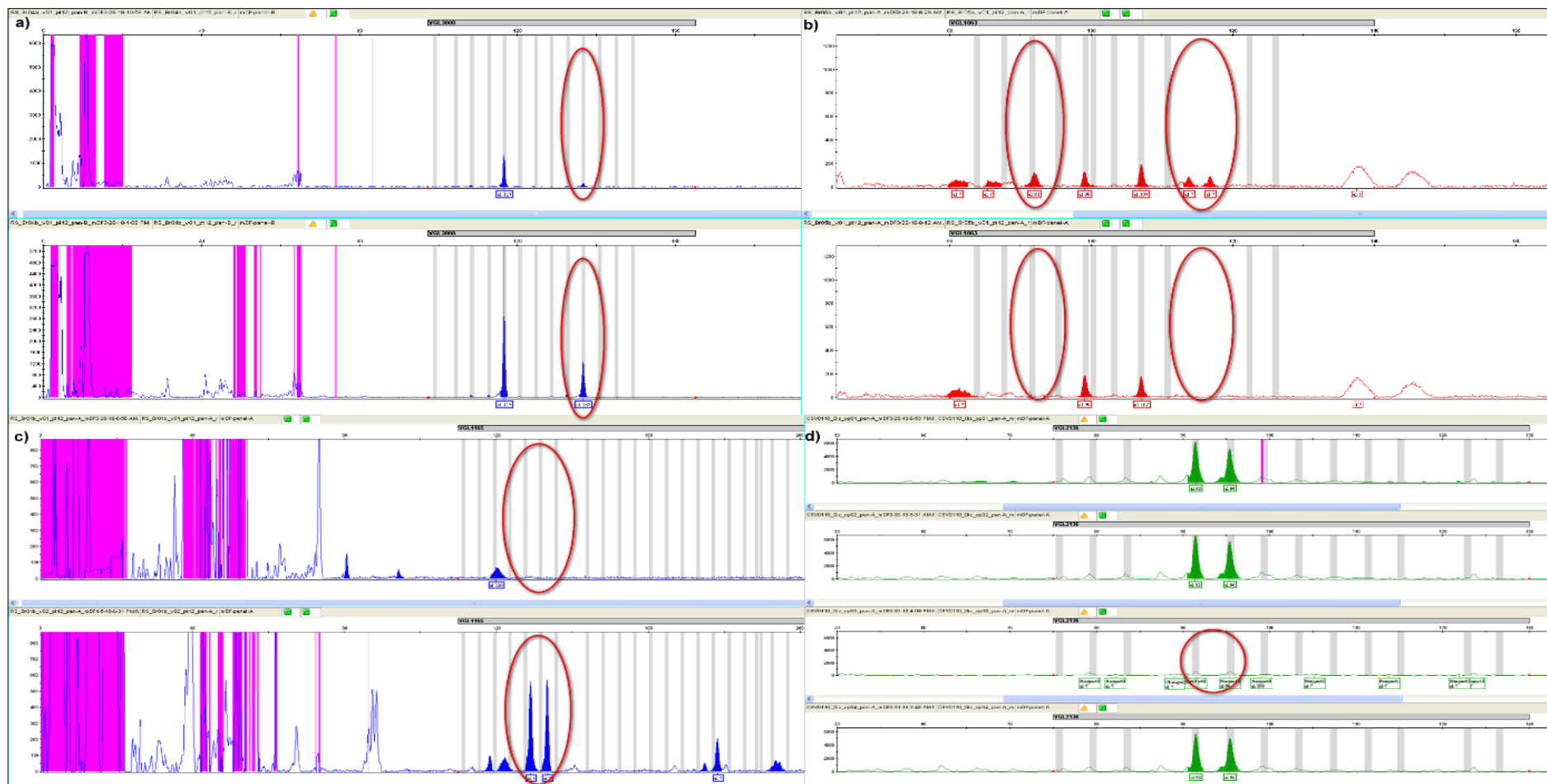
*Tab. 7 Hodnoty chybovosti na alelu a genotyp pro jednotlivé lokusy*

<b>Panel</b>	<b>Lokus</b>	<b>Chybovost na alelu</b>	<b>Chybovost na genotyp</b>
<b>A</b>	VGL1063	0	0
<b>A</b>	VGL2136	0	0
<b>A</b>	VGL1541	0	0
<b>A</b>	VGL1165	0	0
<b>A</b>	VGL1828	0	0
<b>A</b>	VGL2409	0	0
<b>B</b>	VGL3008	0,54	1,09
<b>B</b>	VGL3438	0	0
<b>B</b>	VGL2009	0	0
<b>B</b>	VGL3112	0	0
<b>B</b>	VGL1606	0	0
<b>Průměr</b>		0,09	0,18

U vlčích vzorků se podařilo opakovaně úspěšně amplifikovat pouze 8 (panel A) a 7 (panel B) genotypů alespoň ve dvou opakováních ze 4. U těchto vzorků byla zjištěna nulová chybovost na alelu i genotyp. Rovněž byl detekován výskyt nulových alel v několika lokusech a sice VGL2009 (6,25 % genotypů), VGL3112 (68,75 %) a VGL1606 (31,25 %).



Obr19. Výsledek kontaminace environmentálního vzorku DNA



Obr. 20 Ukázky jevů ovlivňujících kvalitu genotypovacího procesu

Alelický drop-out (a), PCR artefakty způsobené zvýšením počtu cyklů - 35 (horní část) vs 40 cyklů (dolní část) u stejného vzorku a stejné izolace (b), PCR artefakty u dvou nezávislých izolací stejného vzorku při 40 cyklech PCR (c), technická nulová alela u třetího opakování ze 4 u stejného vzorku

## 5.4 Populační analýza

Základní populační parametry byly odhadnuty pro tři datové soubory a sice pouze pro plemeno československý vlčák, pouze pro vlky a pro vlky a čsv dohromady (Tab. 8, 9, 10). O skutečné populaci se dá samozřejmě mluvit pouze v případě čsv vzhledem k počtu vzorků u vlků, ale další tabulky umožňují rychlé porovnání např. z hlediska počtu alel aj. Celkem bylo detekováno 73 různých alel v 11 lokusech s průměrem 6,64 alel na lokus, pro samotné čsv bylo detekováno 67 různých alel v 11 lokusech s průměrem 6,09 alel na lokus a u vlků bylo nalezeno 31 alel v 11 lokusech s průměrem 2,81 alel na lokus. Detailnější informace ohledně frekvencí jednotlivých alel všech studovaných lokusů jsou uvedeny v Tab. 11 a 12. Heterozygotnost pozorovaná se pohybovala v rozmezí od 0,362 do 0,767 u všech vzorků, pouze u čsv byla v rozmezí od 0,367 do 0,769 a pouze u vlků od 0,2 do 0,8.

Tab 8 Výsledky deskriptivní statistické analýzy pro populace Československých vlčáků

Panel	Lokus	K	H <sub>obs</sub>	H <sub>exp</sub>	HW	F <sub>null</sub>
A	VGL1063	5	0,612	0,600	NS	-0,0153
A	VGL2136	8	0,556	0,603	NS	+0,0405
A	VGL1541	5	0,714	0,672	NS	-0,0314
A	VGL1165	10	0,752	0,783	NS	+0,0194
A	VGL1828	2	0,422	0,463	NS	+0,0446
A	VGL2409	4	0,605	0,683	*	+0,0566
B	VGL3008	7	0,714	0,760	NS	+0,0304
B	VGL3438	6	0,490	0,547	NS	+0,0566
B	VGL2009	4	0,678	0,708	NS	+0,0168
B	VGL3112	8	0,769	0,829	NS	+0,0354
B	VGL1606	8	0,367	0,360	NS	-0,0089
<b>Průměr</b>		6,09	0,6080	0,6373		

Poznámky: k – počet alel, Hobs – pozorovaná heterozygotnost, Hexp – očekávaná heterozygotnost, PIC – polymorfni informační obsah, HW – Hardy- Weinbergova hodnota, NS - není statisticky významný rozdíl, \* - statisticky signifikantní rozdíl od HW rovnováhy pro  $p < 0,05$ .



Tab. 9 Výsledky deskriptivní statistické analýzy pro vlky

Panel	Lokus	K	H <sub>obs</sub>	H <sub>exp</sub>
A	VGL1063	2	0,200	0,200
A	VGL2136	3	0,800	0,600
A	VGL1541	2	0,200	0,200
A	VGL1165	3	0,800	0,600
A	VGL1828	3	0,200	0,622
A	VGL2409	2	0,400	0,200
B	VGL3008	2	0,800	0,356
B	VGL3438	4	0,800	0,778
B	VGL2009	4	0,400	0,711
B	VGL3112	3	0,667	0,733
B	VGL1606	3	0,200	0,511
<b>Průměr</b>		2,82	0,497	0,5010

Poznámky: K – počet alel, Hobs – pozorovaná heterozygotnost, Hexp – očekávaná heterozygotnost, PIC – polymorfni informační obsah.

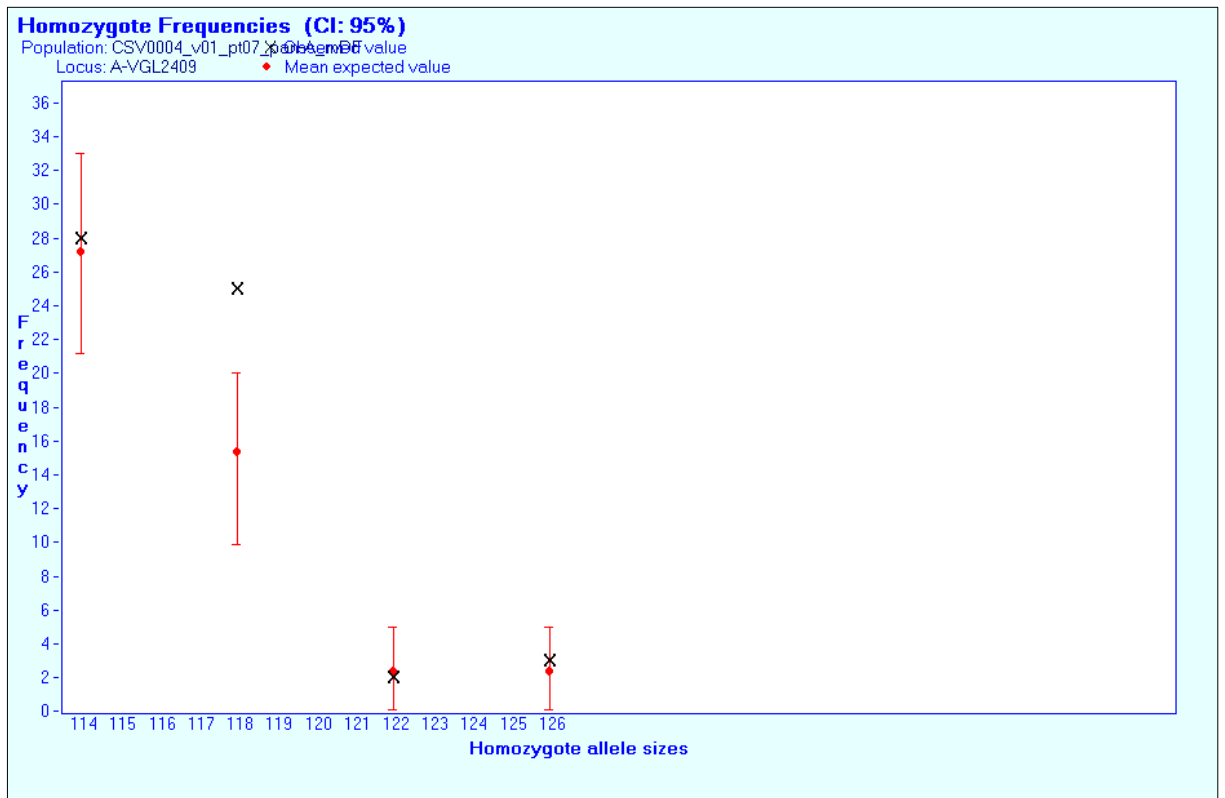
Tab. 10 Výsledky deskriptivní statistické analýzy populace Československých vlčáků a vlků dohromady.

Panel	Lokus	k	H <sub>obs</sub>	H <sub>exp</sub>
A	VGL1063	5	0,599	0,615
A	VGL2136	9	0,565	0,622
A	VGL1541	5	0,697	0,692
A	VGL1165	11	0,753	0,794
A	VGL1828	4	0,434	0,493
A	VGL2409	4	0,592	0,676
B	VGL3008	7	0,704	0,764
B	VGL3438	7	0,500	0,558
B	VGL2009	4	0,669	0,712
B	VGL3112	8	0,767	0,830
B	VGL1606	9	0,362	0,391
<b>Průměr</b>		6,64	0,6038	0,6496

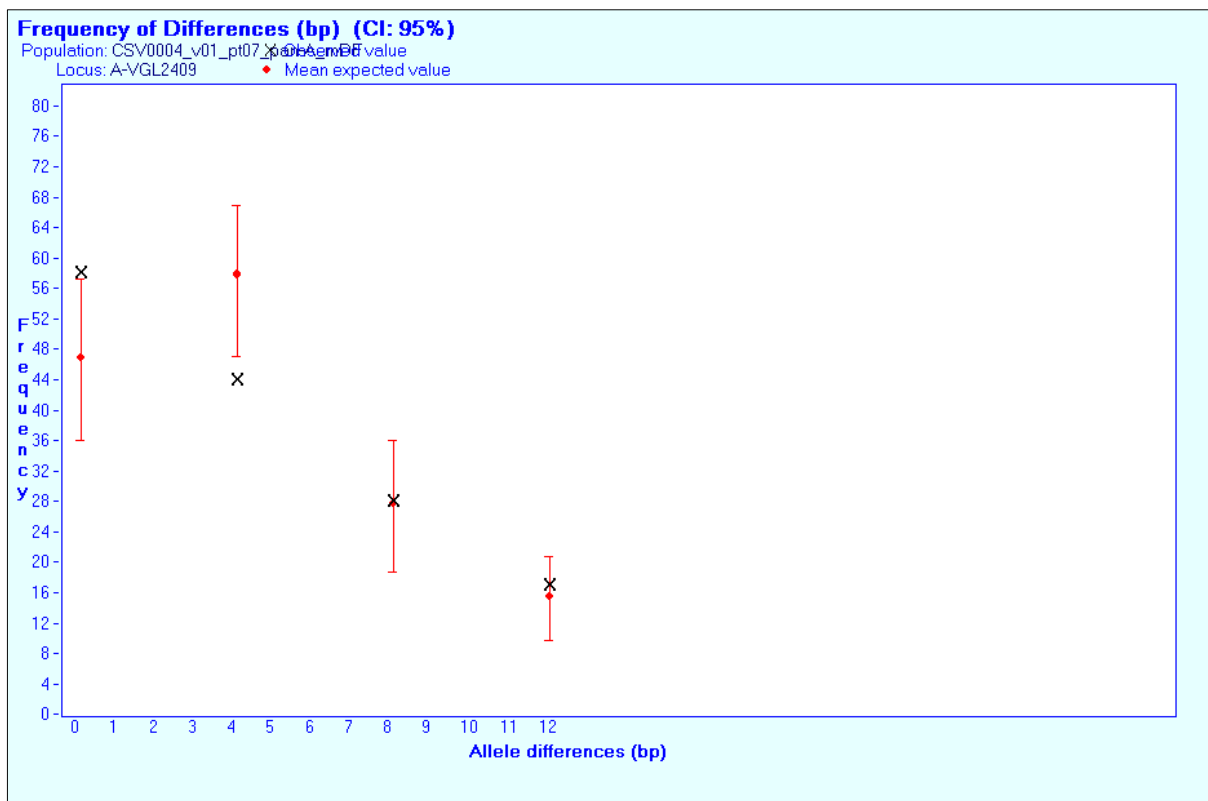
Poznámky: K – počet alel, Hobs – pozorovaná heterozygotnost, Hexp – očekávaná heterozygotnost, PIC – polymorfni informační obsah.

Testování na H-W rovnováhu a odhad frekvence nulové alely bylo provedeno pouze pro čsv a s výjimkou lokusu VLG2409 nebyly zjištěny statisticky významné rozdíly oproti H-W

rovnováze. Pro daný lokus rovněž vycházela nejvyšší hodnota frekvence potenciální nulové alely (0,0586). Potenciální výskyt nulové alely a tudíž zdroje potenciálních chyb jak pro genotypování, tak pro odhad frekvencí alel, byl nezávisle potvrzen i pomocí analýzy v programu MicroChecker, který porovnává předpokládané odhady počtu homozygotů (Obr. 26) a velikostních rozdílů alel s pozorovanými (Obr. 27). Výsledky pro ostatní lokusy jsou uvedeny v Přílohách obr. 29 – obr. 33.

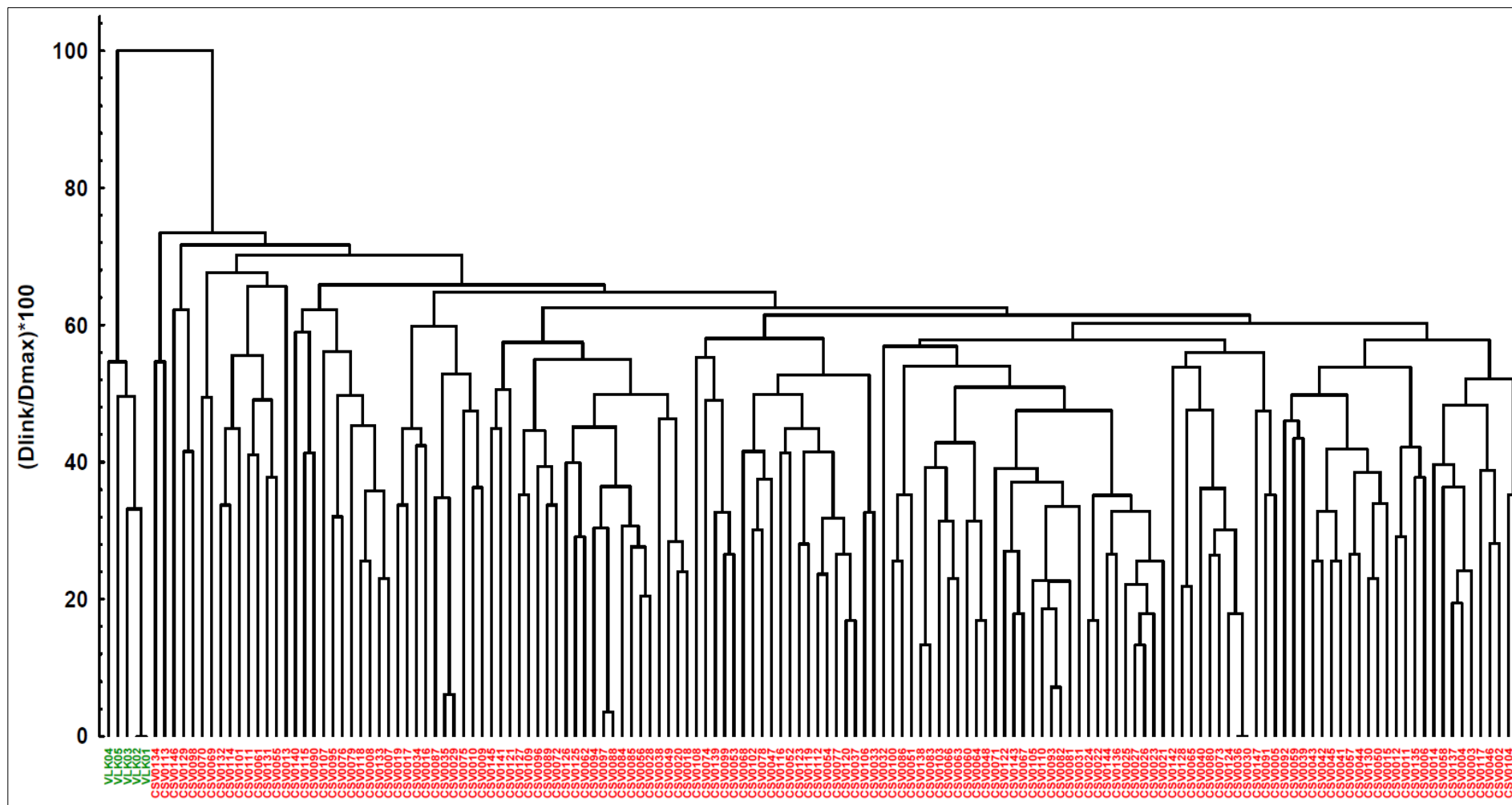


Obr. 26 Porovnání odhadů frekvencí homozygotů se skutečnými pro lokus VGL2409



Obr. 27 Porovnání odhadů frekvencí velikostních rozdílů mezi alelami se skutečnými pro lokus VGL2409

Párové porovnání jedinců ukázalo, že v případě absolutní shody ve všech lokusech byly nalezeny 2 páry jedinců, v prvním případě se jednalo o shodu mezi dvěma čsv a ve druhém mezi vlky. Hodnota náhodné shody pro nepříbuzné jedince byla  $4.0649 \cdot 10^{-9}$  a pro sourozence  $2.9353 \cdot 10^{-4}$  u čsv a u vlků byly tyto hodnoty  $3.5023 \cdot 10^{-19}$  a  $2.3003 \cdot 10^{-5}$ . Při snížení kritéria pro shodu kdy byl postupně povolen rozdíl v jednom, ve dvou, ve třech a čtyřech lokusech tj. stačila absolutní shoda pro 10, 9, 8 a 7 lokusů bylo nalezeno 3, 5, 8 a 40 shodných párů jedinců. Robustnost použitého markerovacího systému byla potvrzena i shlukovou analýzou, která dokázala jednoznačně odlišit všechny vlky od čsv (Obr. 28).



Obr. 28 Výsledek shlukové analýzy. Na x-ose jsou uvedeny jednotlivé genotypy a na y-ose standardizované hodnoty genetické vzdálenosti

## 6 Diskuze

### 6.1 Optimalizace mikrosatelitních markerů

V experimentální části byl použit mikrosatelitní systém, který navrhl Kun et al. (2013). Testovací fáze DNA izolované z bukálních stěrů proběhla poměrně rychle a bez problémů, byl vytvořen očekávaný profil dosaženy požadované hodnoty, což ukázalo na dostatečné množství a vysokou kvalitu DNA. Co se týče DNA izolované z exkrementů, u řady vzorků byl získán profil svědčící o jejím malém množství a silné degradaci. Na stejný problem ukázaly i neskutečně vysoké hodnoty měření koncentraci a čistoty DNA pomocí UV spektrometru S-111107 NanoPhotometer (Implen). Největší koncentrace se rovnala 5396 ng/μl, zatímco zjištěné hodnoty koncentrace DNA v podobném studiu (Lindquist et Wictum, 2016) se pohybovaly v rozmezí 0,004 – 33,96 ng/μl. Vyšší ukazatele se také můžou objevovat kvůli přítomnosti inhibitorů, které mají stejný absorbní koeficient UV záření jako DNA. Agarozová elektroforéza ukázala, že DNA je silně fragmentována. Z tohoto vyplývá, že stanovení koncentrace DNA pomocí UV spektrometrie není dostatečně spolehlivou metodou pro DNA izolovanou z exkrementů. Proto by bylo vhodnější použití kvantitativní polymerázové řetězové reakce (Real-time PCR nebo qPCR) se specifickou Taq-man sondou (Kanthaswamy et al., 2015), což by ale vedlo k nárůstu finančních a časových nákladů.

Přestože k izolaci byl použit speciální kit pro degradovanou DNA, u některých vzorků opakovaně nedošlo k amplifikaci u jednoho nebo více lokusů, což byl důvod tyto vzorky vyřadit.

Dalším cílem byla eliminace problému s „off-scale“ píky v některých lokusech u velkého počtu vzorků. Bylo provedeno testování různých koncentrací u jednotlivých primerů, kterým bylo dosaženo větší vyrovnanosti fluorescenčního signálu. Přesto k izolaci byl použit speciální kit pro degradovanou DNA, u některých vzorků opakovaně selhávala amplifikace u jednoho či více lokusů, a proto byly tyto vzorky vyřazeny.

### 6.2 Hodnocení chybovosti

U DNA izolované z bukálních stěrů byla zjištěna velmi nízká chybovost amplifikovaných produktů. Přesto v lokusu VGL2136 byla detekována technická nulová alela, jejíž příčina není zřejmá. Ale je jasné, že tento jev nezpůsobila mutací, protože výskyt nulové alely byl zaznamenán jen v jednom opakování ze čtyř. V lokusu VGL1228 byly detekovány jenom 2

alely, což vykazuje nízkou variabilitu. Daný fakt vyvolává pochybnost vhodnosti použití mikrosatelitního systému Mini – DogFiler pro lokus VGL1228 u plemene československý vlčák.

Výsledky analýzy DNA izolované z exkrementů vlků jsou zatíženy velkou chybou, protože konečný počet vhodných vzorků byl příliš malý. Největší problem nastal u amplifikací lokusů, které amplifikují velké alely. Velmi nízkou variabilitu (2 alely) ukázaly lokusy VGL1063, VGL1541, VGL3008. Největší počet alel (4 alely) byl detekován v lokusech VGL2009 a VGL3438.

Robustnost použitého markerovacího systému byla potvrzena i shlukovou analýzou, která dokázala odlišit 98, 68% jedinců a zároveň všechny vlky od československých vlčáků. Pro CLU analýzu byla použita Da vzdálenostní matice, která je nejvhodnější pro určení genetické vzdálenosti na základě SSR markerů (Odong et al., 2011).

U vlčích vzorků se podařilo opakovaně úspěšně amplifikovat pouze 8 (panel A) a 7 (panel B) genotypů alespoň ve dvou opakováních ze čtyř. U těchto vzorků byla zjištěna nulová chybovost na alelu i genotyp. Rovněž byl detekován výskyt nulových alel v několika lokusech a sice VGL2009 (6,25 % genotypů), VGL3112 (68,75 %) a VGL1606 (31,25 %), což je pravděpodobně způsobeno silnou fragmentací DNA, protože se jedná o lokusy s největší velikostí amplikonů.

Z výsledků populační analýzy studovaných vzorků vyplynula existence 2 geneticky výrazně odlišných skupin, které odpovídají plemenu československý vlčák a souboru vlků.

## 7 Závěr

Závěrem lze konstatovat, že se podařilo úspěšně splnit vytyčené cíle práce, ačkoliv v případě analýzy izolátů z exkrementů byla úspěšnost nižší oproti očekávání. Díky tomu byl získán malý soubor vlčích jedinců a výsledky statistického zpracování u těchto dat mají menší vypovídací hodnotu. Nejdůležitější poznatky z této práce jsou pro přehlednost uvedeny v následujících bodech:

- 1) Byla úspěšna izolována DNA pocházející z různého materiálu (bukální stěry, exkrementy) u 170 jedinců československého vlčáka a 39 vlků. Zároveň byla ověřena kvantita a kvalita izolované DNA, kdy se ukázalo, že v případě vzorků izolovaných z exkrementů nemusí být UV spektrometrie nejvhodnější metodou pro stanovení množství DNA kvůli řadě látek absorbujících při stejné vlnové délce jako DNA nebo v důsledku vysoké fragmentace DNA.
- 2) Podařilo se optimalizovat nový mikrosatelitní systém Mini – DogFiler pro problematické vzorky, kdy bylo především nutné upravit koncentrace primerů, jelikož docházelo k velkým rozdílům z hlediska intenzity signálů jednotlivých alel a řada alel tak byla tzv. „off-scale“. Vyrovnaný genetický profil je, proto z hlediska signálu jedním z předpokladů pro kvalitní a správné vyhodnocení dat.
- 3) Analýza chybovosti ukázala velmi nízkou chybovost u DNA izolované z bukálních stěrů, která se pohybovala v hodnotách 0,09 (chybovost na alelu), 0,18 (chybovost na genotyp) a 2,17 (chybovost na genetický profil). Získané hodnoty byly nižší i oproti publikovaným výsledkům srovnávaných analýz. Na druhou stranu byl detekován častý výskyt tzv. technické nulové alely pro lokus VGL2136, jejíž příčinu se nepodařilo odhalit. Analýza DNA z exkrementů poukázala na náročnost získání důvěryhodných výsledků, jelikož u vzorků s malým množstvím vysoce fragmentované DNA se pojí řada nežádoucích jevů jako je alelický dropout, nulové alely či PCR artefakty. Výsledky potvrdily nutnost vícenásobné izolace DNA z jednoho vzorku a velký počet opakování k získání konsensus genotypu.
- 4) Populační analýza dat potvrdila vysokou rozlišovací schopnost použitého mikrosatelitního systému, jelikož 11 markerů dokázalo spolehlivě odlišit všechny jedince s plným profilem s výjimkou jedné dvojice čsv a jedné dvojice vlků. Podle rodokmenů se u čsv jedná o nepříbuzné jedince, a jelikož pravděpodobnost náhodné shody byla velmi nízká, tak se předpokládá lidská chyba v značení vzorků. U vlka

jde pravděpodobně o toho samého jedince analyzovaného z různých odebraných exkrementů. Robustnost SSR systému navíc potvrdila schopnost jednoznačně odlišit vlky a psy.



## 8 Seznam citované literatury

- Adams, J. R., Waits, L. P., Leonard, J. A. 2003.** Widespread occurrence of a domestic dog mitochondrial DNA haplotype in southeastern US coyotes. *Molecular Ecology* [online]. 12 (2). 541 - 546. [cit. 2018-03-28]. DOI: 10.1046/j.1365-294X.2003.01708.x. ISSN: 09621083.
- Atul Grover, P. C. Sharma. 2011.** Is spatial occurrence of microsatellites in the genome a determinant of their function and dynamics contributing to genome evolution?. *Current Science* [online]. 100 (6). 859. [cit. 2018-03-28]. ISSN: 00113891.
- BAKAR, M. O. H. A. M. A. D. -A. Z. A. M. A. K. M. A. L. A. B. U., ROVIE-RYAN, J. E. F. F. R. I. N. E. J. A. P. N. I. N. G., AMPENG, A. H. M. A. D., YAAKOP, S. A. L. M. A. H., NOR, S. H. U. K. O. R. M. D., MD-ZAIN, B. A. D. R. U. L. M. U. N. I. R. 2017.** OPTIMISATION OF POLYMERASE CHAIN REACTION CONDITIONS TO AMPLIFY D-LOOP REGION IN THE MALAYSIAN MOUSEDEER GENOMIC DNA. *Malaysian Applied Biology* [online]. 46 (4). 63-71. [cit. 2018-03-31]. ISSN: 01268643.
- Bartlett, J. M., Stirling, D. 2003.** A short history of the polymerase chain reaction. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.) [online]. 226. 3 - 6. [cit. 2018-04-09]. ISSN: 10643745.
- Bartlett, J. M., Stirling, D. 2003.** A short history of the polymerase chain reaction. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.) [online]. 226. 3 - 6. [cit. 2018-04-09]. ISSN: 10643745.
- Bartůňková, J., Paulík, M. 2005.** Vyšetřovací metody v imunologii. Grada. Praha. ISBN: 80-247-0691-1.
- Bellemain, E., Bonin, A., Pompanon, F. 2005.** Genotyping errors: Causes, consequences and solutions. *NATURE REVIEWS GENETICS* [online]. 6 (11). 847-859. [cit. 2018-03-28]. ISSN: 14710056.
- Beránek, M. 2016.** Molekulární genetika pro bioanalytiky. Karolinum. Praha. ISBN: 978-80-246-3224-7.
- Bouchalová, K., Hajdúch, M. 2016.** Prediktivní a prognostická onkologie. I. vydání. Univerzita Palackého v Olomouci. Olomouc. ISBN: 978-80-244-3188-8.
- Boyko, A. R., Degenhardt, J. D., Ding, Z. -L., Parker, H. G., Earl, D. A., Zhang, Y. -P., Greco, C., Musiani, M., Lohmueller, K. E., Bryc, K., Cargill, M., Spady, T. C., Shearman, J., Elkahloun, A., Reynolds, A., Geffen, E., Mosher, D. S., VonHoldt, B.**

- M., Jones, P. G., Wilton, A., Bustamante, C. D., Quignon, P., Brisbin, A., Wayne, R. K., Han, E., Huang, W., Qian, Z., Pilot, M., Randi, E., Ostrander, E. A., Knowles, J. C., Pollinger, J. P., Bannasch, D., Jedrzejewski, W., Auton, A., Novembre, J. 2010.** Genome-wide SNP and haplotype analyses reveal a rich history underlying dog domestication [online]. [cit. 2018-03-28].
- Butler, J. 2004.** Forensic DNA typing by capillary electrophoresis using the ABI Prism 310 and 3100 genetic analyzers for STR analysis. *ELECTROPHORESIS* [online]. 25 (10-11). 1397-1412. [cit. 2018-04-04]. ISSN: 01730835.
- Butler, J. M. 2007.** Short tandem repeat typing technologies used in human identity testing. *BioTechniques* [online]. 43 (4). ii - v. [cit. 2018-03-28]. ISSN: 07366205.
- Butler, J. M. 2010.** Fundamentals of forensic DNA typing. Elsevier. Amsterdam. ISBN: 978-0-12-374999-4.7
- Carles Vilà, author, Peter Savolainen, author, Jesús E. Maldonado, author, Isabel R. Amorim, author, John E. Rice, author, Rodney L. Honeycutt, author, Keith A. Crandall, author, Joakim Lundeberg, author, Robert K. Wayne, author. 1997.** Multiple and Ancient Origins of the Domestic Dog. *Science* [online]. 276 (5319). 1687-1689. [cit. 2018-03-28]. ISSN: 00368075.
- Castroviejo, J., Wayne, R. K., Petrucci-Fonseca, F., Leonard, J. A., Crandall, K. A., Vilà, C., Ellegren, H., Posada, D., Amorim, I. R. 1999.** Mitochondrial DNA phylogeography and population history of the grey wolf *Canis lupus* [online]. [cit. 2018-03-28]. DOI: 10.1046/j.1365-294X.1999.00825.x.
- Chatain, B., Leon, F. J. G. de, Canonne, M., Quillet, E., Bonhomme, F. 1998.** The application of microsatellite markers to breeding programmes in the sea bass, *Dicentrarchus labrax*. *Aquaculture (Netherlands)* [online]. 159 (3-4). 303-316. [cit. 2018-04-10]. ISSN: 00448486.
- Chistiakov, D. A., Hellemans, B., Volckaert, F. A. M. 2011.** Microsatellites and their genomic distribution, evolution, function and applications: A review with special reference to fish genetics [online]. [cit. 2018-03-28].
- Department of Bioresource Chemistry, O. U. of A. and V. medicine, American Bison Association (USA), Okumura N., Ishiguro N., Nakano M., Matsui A., Sahara M. 1996.** Intra- and interbreed genetic variations of mitochondrial DNA major non-coding regions in Japanese native dog breeds (*Canis familiaris*). *Animal Genetics* [online]. [cit. 2018-03-29]. ISSN: edsagr.

- Dovichi, N. J., Zhang, J. 2000.** How capillary electrophoresis sequenced the human genome. *Angewandte Chemie - International Edition* [online]. 39 (24). 4463 - 4468. [cit. 2018-04-04]. DOI: 10.1002/1521-3773(20001215)39:244463::AID-ANIE44633.0.CO;2-8. ISSN: 14337851.
- dropout and false allele error rates from microsatellite genotypes in the absence of reference data (software Pedant). *Genetics* 175 (2): 827-842.
- Fulton, B., Minx, P., López-Otín, C., Attenborough, R., Eichler, E. E., Wilson, R. K., Smith, S. M., Kheradpour, P., Warren, W. C., McMillan, D., Smith, C., Hallsworth-Pepin, K., Ordóñez, G. R., Ferguson-Smith, M., Markovic, C., Chen, L., Camilla M. Whittington, Taylor, J., Schmitz, J., Konkel, M. K., Chinwalla, A. T., Fulton, L., Jones, R. C., Nhan, M. N., Nelson, J., Mitreva, M., Stark, A., Vargas Jentzsch, I. M., Reinhardt, R., Puente, X. S., Kellis, M., Nicholas, K. R., Tsend-Ayush, E., Kube, M., Papenfuss, A. T., Hannon, G. J., Ponting, C. P., Nixon, B., Mardis, E. R., Batzer, M. A., Veyrunes, F., Miethke, P., Kremitzki, C., Locke, D. P., Churakov, G., Glasscock, J., Birney, E., Dacheux, J. -L., Miller, W., Hillier, L. D. W., Delehaunty, K., Hou, S., Walker, J. A., Zemann, A., Brosius, J., Olender, T., Alsop, A., Murchison, E. P., Webber, C., Wallis, J., Graves, T., Buschiazzi, E., Thompson, K., Flicek, P., Pringle, T. H., Heger, A., Deakin, J. E., Thiru, P., Lancet, D., Wylie, T., Sekita, Y., Merkel, A., Hardison, R., Renfree, M. B., Lefèvre, C. M., Belov, K., Feng, Y., Clarke, L., Kirby, P., Pask, A., Niwa, H., Chen, Y., Cheng, Z., Smit, A. F. A., Temple-Smith, P., Sharp, J. A., Ray, D. A., Wohldmann, P., Harris, R. S., Pohl, C. S., Gemmell, N. J., Waters, P. D., Grützner, F., Wong, E. S. W., Jennifer A. Marshall Graves, Huttley, G. A., Kriegs, J. O., Sachidanandam, R., Yang, S. -P., Huang, X., Rens, W., Wakefield, M. J. 2008.** Genome analysis of the platypus reveals unique signatures of evolution [online]. [cit. 2018-03-28].
- Gagneux, P., Boesch, C., Woodruff, D. S. 1997.** Microsatellite scoring errors associated with noninvasive genotyping based on nuclear DNA amplified from shed hair. *Molecular Ecology* [online]. 6 (9). 861 - 868. [cit. 2018-04-10]. ISSN: 09621083.
- Galibert, F., Quignon, P., Hitte, C., André, C. 2011.** Review/Revue: Toward understanding dog evolutionary and domestication history. *Comptes rendus - Biologies* [online]. 334 (3). 190-196. [cit. 2018-03-28]. DOI: 10.1016/j.crv.2010.12.011. ISSN: 16310691.
- Gaurav Solanki. 2014.** Polymerase chain reaction [online]. [cit. 2018-04-02]. DOI: 10.5167/uzh-104356.

- Germonpré, M., Sablin, M. V., Stevens, R. E., Hedges, R. E. M., Hofreiter, M., Stiller, M., Després, V. R. 2009.** Fossil dogs and wolves from Palaeolithic sites in Belgium, the Ukraine and Russia: osteometry, ancient DNA and stable isotopes. *Journal of Archaeological Science* [online]. 36 (2). 473 - 490. [cit. 2018-03-28]. DOI: 10.1016/j.jas.2008.09.033. ISSN: 10959238.
- Gibbs, R. [B. C. of M. 1990.** DNA amplification by the polymerase chain reaction [online]. [cit. 2018-04-02]. DOI: 10.1021/ac00212a004. ISSN: 00032700.
- Haber, J. E., Louis, E. J. 1998.** Minisatellite origins in yeast and humans. *Genomics (USA)* [online]. 48 (1). 132-135. [cit. 2018-03-28]. ISSN: 08887543.
- Heidi G. Parker, author, Lisa V. Kim, author, Nathan B. Sutter, author, Scott Carlson, author, Travis D. Lorentzen, author, Tiffany B. Malek, author, Gary S. Johnson, author, Hawkins B. DeFrance, author, Elaine A. Ostrander, author, Leonid Kruglyak, author. 2004.** Genetic Structure of the Purebred Domestic Dog. *Science* [online]. 304 (5674). 1160-1164. [cit. 2018-03-29]. ISSN: 00368075.
- Heiger, D. 2010.** A Primer on High Performance Capillary Electrophoresis Ed. Second completely revised edition by Henk H. Lauer and Gerard P. Rozing.
- Henry A. Erlich, author, David Gelfand, author, John J. Sninsky, author. 1991.** Recent Advances in the Polymerase Chain Reaction. *Science* [online]. 252 (5013). 1643-1651. [cit. 2018-04-04]. ISSN: 00368075.
- Heslop-Harrison, J. S. 2000.** The contribution of short repeats of low sequence complexity to large conifer genomes. *THEORETICAL AND APPLIED GENETICS* [online]. 101 (1-2). 7-14. [cit. 2018-03-28]. ISSN: 00405752.
- Hile, S. E., Chiaromonte, F., Eckert, K. A., Makova, K. D., Kelkar, Y. D., Strubczewski, N. 2010.** What Is a Microsatellite: A Computational and Experimental Definition Based upon Repeat Mutational Behavior at A/T and GT/AC Repeats [online]. [cit. 2018-03-28]. DOI: 10.1093/gbe/evq046.
- Hitte, C., Priat, C., Senger, F., Derrien, T., Evanno, G., Cadieu, E., Lourgant, K., Tacher, S., Dréano, S., Berkova, N., André, C., Galibert, F., Madeoy, J., Lorentzen, T. D., Ramirez, C., Pullar, B., Oza, V., Ostrander, E. A., Kirkness, E. F., Fraser, C., Thomas, D., Scott, C., Deloukas, P., Jaffe, D. B., Lindblad-Toh, K. 2005.** Facilitating genome navigation: Survey sequencing and dense radiation-hybrid gene mapping. *Nature Reviews Genetics* [online]. 6 (8). 643 - 648. [cit. 2018-03-28]. DOI: 10.1038/nrg1658. ISSN: 14710056.

- Jennifer A. Leonard, author, Robert K. Wayne, author, Jane Wheeler, author, Raúl Valadez, author, Sonia Guillén, author, Carles Vilà, author. 2002.** Ancient DNA Evidence for Old World Origin of New World Dogs. *Science* [online]. 298 (5598). 1613-1616. [cit. 2018-03-28]. ISSN: 00368075.
- Joshi, M., Deshpande, J.D. 2010.** Polymerase Chain Reaction: Methods, Pr. *International Journal of Biomedical Research*, 1: 81-97.
- Jouquand, S., Priat, C., Hitte, C., Lachaume, P., André, C., Galibert, F. 2000.** Identification and characterization of a set of 100 tri- and dinucleotide microsatellites in the canine genome. *Animal Genetics* [online]. 31 (4). 266-272. [cit. 2018-03-28]. ISSN: 02689146.
- Kanthaswamy, S., Premasuthan, A., Ng, J., Satkoski, J., Goyal, V. 2012.** Quantitative real-time PCR (qPCR) assay for human-dog-cat species identification and nuclear DNA quantification. *Forensic Science International: Genetics* [online]. 6 (2). 290 - 295. [cit. 2018-04-16]. DOI: 10.1016/j.fsigen.2011.06.005. ISSN: 18724973.
- Kanthaswamy, S., Premasuthan, A., Ng, J., Satkoski, J., Goyal, V. 2012.** Quantitative realtime PCR (qPCR) assay for human–dog–cat species identification and nuclear DNA quantification. *Forensic Science International: Genetics*. 6(2). 290-295.
- Katti, M. V., Ranjekar, P. K., Gupta, V. S. 2001.** Differential distribution of simple sequence repeats in eukaryotic genome sequences. *Molecular Biology and Evolution* [online]. 18 (7). 1161 - 1167. [cit. 2018-03-28]. DOI: 10.1093/oxfordjournals.molbev.a003903. ISSN: 07374038.
- Kemp, G. 2015.** Capillary electrophoresis: a versatile family of analytical techniques [online]. [cit. 2018-04-03]. ISSN: edsagr.
- Lange-Badré, B. 2009.** Les mammifères créodontes dans les Annales de Paléontologie: conceptions anciennes et idées récentes = The credont mammals in the Annales de Paléontologie [online]. [cit. 2018-04-07].
- Langella, O. 1999.** Populations v1.2.3.0 (software) dostupny z <http://bioinformatics.org/~tryphon/populations/>
- Lepais, O., Petit, R., Guichoux, E., Lagache, L., Wagner, S., Chaumeil, P., Leger, P., Lepais, O., Lepoittevin, C., Revardel, E., Salin, F., Petit, R. J., Malausa, T. 2011.** Current trends in microsatellite genotyping. *MOLECULAR ECOLOGY RESOURCES* [online]. 11 (4). 591-611. [cit. 2018-03-28]. ISSN: 1755098X.
- Li Jin, author, Claudia Macaubas, author, Joachim Hallmayer, author, Akinori Kimura, author, Emmanuel Mignot, author. 1996.** Mutation Rate Varies among Alleles at a Microsatellite Locus: Phylogenetic Evidence. *Proceedings of the National Academy of*

- Sciences of the United States of America [online]. 93 (26). 15285-15288. [cit. 2018-04-08]. ISSN: 00278424.
- 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. I. I., Zody, M. C. 2005.** Genome sequence, comparative analysis and haplotype structure of the domestic dog. *Nature* [online]. 438. [cit. 2018-03-28]. ISSN: 00280836.
- Lindquist, C. D., Wictum, E. J. 2016.** Less is More-Optimization of DNA Extraction from Canine Feces. *JOURNAL OF FORENSIC SCIENCES* [online]. 61 (1). 212-218. [cit. 2018-04-15]. ISSN: 00221198.
- Liu, X. -P., Liu, J. -H. 2011.** Characterization of Family IV UDG from *Aeropyrum pernix* and Its Application in Hot-Start PCR by Family B DNA Polymerase [online]. [cit. 2018-04-16]. DOI: 10.1371/journal.pone.0027248.
- Lorenz, T. C. 2012.** Polymerase chain reaction: Basic protocol plus troubleshooting and optimization strategies. *Journal of Visualized Experiments* [online]. (63). [cit. 2018-04-07]. DOI: 10.3791/3998. ISSN: 1940087X.
- Madsen, O., Scally, M., Douady, C. J., Kao, D. J., DeBry, R. W., Adkins, R., Amrine, H. M., Stanhope, M. J., de Jong, W. W., Springer, M. 2001.** Parallel adaptive radiations in two major clades of placental mammals. *Nature* [online]. 409 (6820). 611-615. [cit. 2018-03-29]. ISSN: 00280836.
- Morgante, M., Hanafey, M., Powell, W. 2002.** Microsatellites are preferentially associated with nonrepetitive DNA in plant genomes. *Nature Genetics* [online]. 30 (2). 194-200. [cit. 2018-03-29]. ISSN: 10614036.
- Morgante, M., Hanafey, M., Powell, W. 2002.** Microsatellites are preferentially associated with nonrepetitive DNA in plant genomes. *Nature Genetics* [online]. 30 (2). 194-200. [cit. 2018-03-28]. ISSN: 10614036.
- Murphy, W. J., Eizirik, E., Johnson, W. E., Zhang, Y. P., Ryder, O. A., O'Brien, S. J. 2001.** Molecular phylogenetics and the origins of placental mammals. *Nature* [online]. 409 (6820). 614-618. [cit. 2018-03-29]. ISSN: 00280836.
- Neff, M. W., Broman, K. W., Mellersh, C. S., Ray, K., Acland, G. M., Aquirre, G. D., Ziegler, J. S., Ostrander, E. A., Rine, J. 1999.** Second-generation genetic linkage map of the domestic dog, *Canis familiaris*. *Genetics* [online]. 151 (2). [cit. 2018-03-28]. ISSN: 00166731.
- Ostrander, E. A., Wayne, R. K. 2005.** The canine genome. *Genome research*. 15(12). 17061716.

- Parker, H. G., Shearin, A. L., Ostrander, E. A. 2010.** Man's Best Friend Becomes Biology's Best in Show: Genome Analyses in the Domestic Dog\* [online]. [cit. 2018-03-28].
- Paul C. D. Johnson & Daniel T. Haydon (2007).** Maximum likelihood estimation of allelic
- Pelt-Verkuil, E. van, Belkum, A. van., Hays, J. P. 2008.** Principles and technical aspects of PCR amplification. Springer. Dordrecht. ISBN: 9781402062414.
- Penka, M., Slavíčková, E. 2011.** Hematologie a transfuzní lékařství. Grada. Praha. ISBN: 978-80-247-3459-0.
- Peter Savolainen, author, Ya-ping Zhang, author, Jing Luo, author, Joakim Lundeberg, author, Thomas Leitner, author. 2002.** Genetic Evidence for an East Asian Origin of Domestic Dogs. Science [online]. 298 (5598). 1610-1613. [cit. 2018-03-28]. ISSN: 00368075.
- PRIMMER, C. R., ELLEGREN, H., MØLLER, A. P. 1995.** Resolving genetic relationships with microsatellite markers: a parentage testing system for the swallow *Hirundo rustica*. Molecular Ecology [online]. 4 (4). 493 - 498. [cit. 2018-04-10]. DOI: 10.1111/j.1365-294X.1995.tb00243.x. ISSN: 1365294X.
- Räber, H. 1995.** Plemena psů: encyklopedie : původ - předkové - cíle chovu - schopnosti a užití. Blesk. Ostrava. ISBN: 80-85606-79-8.
- Rak, R., Matyáš, V., Říha, Z. 2008.** Biometrie a identita člověka ve forenzních a komerčních aplikacích / Roman Rak, Václav Matyáš, Zdeněk Říha a kolektiv. ISBN: 9788024723655.
- Randall K. Saiki, author, David H. Gelfand, author, Susanne Stoffel, author, Stephen J. Scharf, author, Russell Higuchi, author, Glenn T. Horn, author, Kary B. Mullis, author, Henry A. Erlich, author. 1988.** Primer-Directed Enzymatic Amplification of DNA with a Thermostable DNA Polymerase. Science [online]. 239 (4839). 487-491. [cit. 2018-04-03]. ISSN: 00368075.
- Richard, G. F., Pâques, F. 2000.** Mini-and microsatellite expansions: the recombination connection. EMBO reports. 1(2). 122-126.
- Roztočil, A., Bartoš, P. 2011.** Moderní gynekologie. Grada. Praha. ISBN: 978-80-247-2832-2.
- Schaefer, E. M. 2005.** The Complete Dog Book: The American Kennel Club. Library Journal [online]. 130 (20). 168-168. [cit. 2018-03-28]. ISSN: 03630277.
- Serpell, J. 1995.** The domestic dog: its evolution, behaviour, and interactions with people [online]. [cit. 2018-03-28]. ISBN: 0521425379. ISSN: edsagr.

- SMITH, K. E. N. T., CZAPLEWSKI, N. I. C. H. O. L. A. S., CIFELLI, R. I. C. H. A. R. D. L. 2016.** Middle Miocene carnivorans from the Monarch Mill Formation, Nevada. *Palaeontologia Polonica* [online]. 61 (1). 231-252. [cit. 2018-04-07]. DOI: 10.4202/app.00111.2014. ISSN: 00788562.
- SMITH, K. E. N. T., CZAPLEWSKI, N. I. C. H. O. L. A. S., CIFELLI, R. I. C. H. A. R. D. L. 2016.** Middle Miocene carnivorans from the Monarch Mill Formation, Nevada. *Palaeontologia Polonica* [online]. 61 (1). 231-252. [cit. 2018-04-07]. DOI: 10.4202/app.00111.2014. ISSN: 00788562.
- Tarditi, C. R., Grahn, R. A., Kurushima, J. D., Lyons, L. A., Evans, J. J. 2011.** Mitochondrial DNA Sequencing of Cat Hair: An Informative Forensic Tool. *Journal of Forensic Sciences* [online]. 56 (SUPPL. 1). S36 - S46. [cit. 2018-03-29]. DOI: 10.1111/j.1556-4029.2010.01592.x. ISSN: 00221198.
- Taylor, B. E., Tedford, R. H., Wang, X.,** American Museum of Natural History Library. Phylogenetic systematics of the Borophaginae (Carnivora, Canidae). *Bulletin of the AMNH* ; no. 243. Phylogenetic systematics of the Borophaginae (Carnivora, Canidae). *Bulletin of the AMNH* ; no. 243 [online]. [cit. 2018-04-09]. ISSN: edsbhl.
- Taylor, D. 2008.** O psech: velká kniha. Vyd. 4., rozš., (V Euromedia Group 2.). přeložil Luděk J. DOBRORUKA, přeložil Eva HOROVÁ. Knižní klub. V Praze. ISBN: 978-80-242-2202-8.
- Taylor, J. S., Breden, F. 2000.** Slipped-strand mispairing at noncontiguous repeats in *Poecilia reticulata*: a model for minisatellite birth [online]. [cit. 2018-03-28].
- Tchernov, E., Valla, F. F. 1997.** Two New Dogs, and Other Natufian Dogs, from the Southern Levant. *Journal of Archaeological Science* [online]. 24 (1). 65 - 95. [cit. 2018-03-28]. DOI: 10.1006/jasc.1995.0096. ISSN: 03054403.
- TIBCO Software Inc. (2017).** Statistica (data analysis software system), version 13. <http://statistica.io>.
- van Asch, B., Alves, C., Gusmão, L., Pereira, V., Pereira, F., Amorim, A. 2009.** New autosomal STR nineplex for canine identification and parentage testing. *Electrophoresis* [online]. 30 (2). [cit. 2018-03-28]. DOI: 10.1002/elps.200800307. ISSN: 01730835.
- Vergnaud, G., Denoeud, F. 2000.** Minisatellites: Mutability and genome architecture. *Genome Research* [online]. 10 (7). 899 - 907. [cit. 2018-03-28]. DOI: 10.1101/gr.10.7.899. ISSN: 10889051.
- Vojáček, J., Kettner, J. 2017.** *Klinická kardiologie*. 3. vydání. Maxdorf. Praha. Jessenius. ISBN: 978-80-7345-549-1.



- Volkov, R. 2007.** Plant highly repeated satellite DNA: molecular evolution, distribution and use for identification of hybrids. *SYSTEMATICS AND BIODIVERSITY* [online]. 5 (3). 277-289. [cit. 2018-03-28]. ISSN: 14772000.
- Wattier, R., Engel, C. R., Saumitou-Laprade, P., Valero, M. 1998.** Short allele dominance as a source of heterozygote deficiency at microsatellite loci: experimental evidence at the dinucleotide locus Gv1CT in *Gracilaria gracilis* (Rhodophyta). *Molecular ecology* [online]. 7 (11). [cit. 2018-04-10]. ISSN: 09621083.
- Webster, M. T., Smith, N. G. C., Ellegren, H. 2002.** Microsatellite evolution inferred from human-chimpanzee genomic sequence alignments. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* [online]. 99 (13). 8748 - 8753. [cit. 2018-03-28]. DOI: 10.1073/pnas.122067599. ISSN: 00278424.
- Wictum, E., Kun, T., Lindquist, C., Malvick, J., Vankan, D., Sacks, B. 2013.** Developmental validation of DogFiler, a novel multiplex for canine DNA profiling in forensic casework. *Forensic Science International: Genetics* [online]. 7 (1). 82-91. [cit. 2018-03-29]. DOI: 10.1016/j.fsigen.2012.07.001. ISSN: 18724973.
- Wictum, E., Kun, T., Lindquist, C., Malvick, J., Vankan, D., Sacks, B. 2013.** Developmental validation of DogFiler, a novel multiplex for canine DNA profiling in forensic casework. *Forensic Science International: Genetics* [online]. 7 (1). 82-91. [cit. 2018-03-29]. DOI: 10.1016/j.fsigen.2012.07.001. ISSN: 18724973.
- Zhang, A. -B., Matsumura, S., Zou, X. -J., Zhang, Y. -P., Savolainen, P., Lundeberg, J., Pang, J. -feng, Ardalán, A., Sköllermo, A., Ekström, C., Leitner, T., Luo, L. -Y., Angleby, H., Kluetsch, C. 2009.** MtDNA Data Indicate a Single Origin for Dogs South of Yangtze River, Less Than 16,300 Years Ago, from Numerous Wolves [online]. [cit. 2018-03-28]. DOI: 10.1093/molbev/msp195.
- Zhivotovsky, L. A., Rosenberg, N. A., Feldman, M. W. 2003.** Features of Evolution and Expansion of Modern Humans, Inferred from Genomewide Microsatellite Markers [online]. [cit. 2018-04-07].
- Кийко, Е. 2011.** ПОЛИМЕРАЗНАЯ ЦЕПНАЯ РЕАКЦИЯ КАК МЕТОД ГЕННОЙ ДИАГНОСТИКИ В МОЛОЧНОМ СКОТОВОДСТВЕ [online]. [cit. 2018-04-02].
- Кондратенко, Е.И., Нетипанова, Н.В., Ломтева, Н.А., Касимова, С.К., Скворцова, И. А., Кузина, Т.В. 2015.** Цитогенетические и молекулярно-биологические методы анализа растений: Учебно-методическое пособие. *Scientific magazine "Kontser"*.
- Кузнецова, В.В., Романова, Г.А. 2012.** Молекулярно-генетические и биохимические методы в современной биологии растений. *Litres*. ISBN 9785996309788.

- Омельченко, А., Вергун, А., Гирнык, А., Осипов, Ф. 2018.** Клональное разнообразие и механизмы его формирования у однополых видов ящериц рода *Darevskia*. Litres. ISBN 5041070040, 9785041070045
- Стручкова, И.В., Кальясова Е.А. 2012.** ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ И ПРАКТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ПРОВЕДЕНИЯ ЭЛЕКТРОФОРЕЗА БЕЛКОВ В ПОЛИАКРИЛАМИДНОМ ГЕЛЕ.
- Сыч, В.Ф., Дрождина, Е.П., Санжапова, А.Ф. 2012.** Введение в нанобиологию и нанобиотехнологии.: Учебное пособие для учащихся 10-11 классов средних общеобразовательных учреждений. 2012.
- Юрген Бёккер. 2017.** Хроматография. Инструментальная аналитика: методы хроматографии и капиллярного электрофореза. Litres. ISBN 5457375099, 9785457375093

## 9 Seznam použitých zkratek

bp = base pair (pár bází)

C = koncentrace

CE = capillary electrophoresis (kapilární elektroforéza)

CDD = charge coupled device

CLU = hierarchická shluková analýza

CSV = Czechoslovakian Wolfdog (československý vlčák)

čsv = československý vlčák

DNA = deoxyribonucleic acid (dioxiribonukleová kyselina)

dNTP = deoxynucleotide-5'-triphosphate (deoxinukleotid-5'-trifosfát)

Fnull = nulová alela

NK= negativní kontrola

mtDNA= mitochondrial DNA (mitochondriální DNA)

PCR= Polymerase Chain Reaction (polymerázová řetězová reakce)

PK= pozitivní kontrola

SNP= Single Nucleoside Polymorphism (jednobodový polymorfismus)

SSR= Single Sequence Repeat (sekvenčně jednoduché repetice)

STR= Short Tandem Repeat (krátká tandemová repetice)

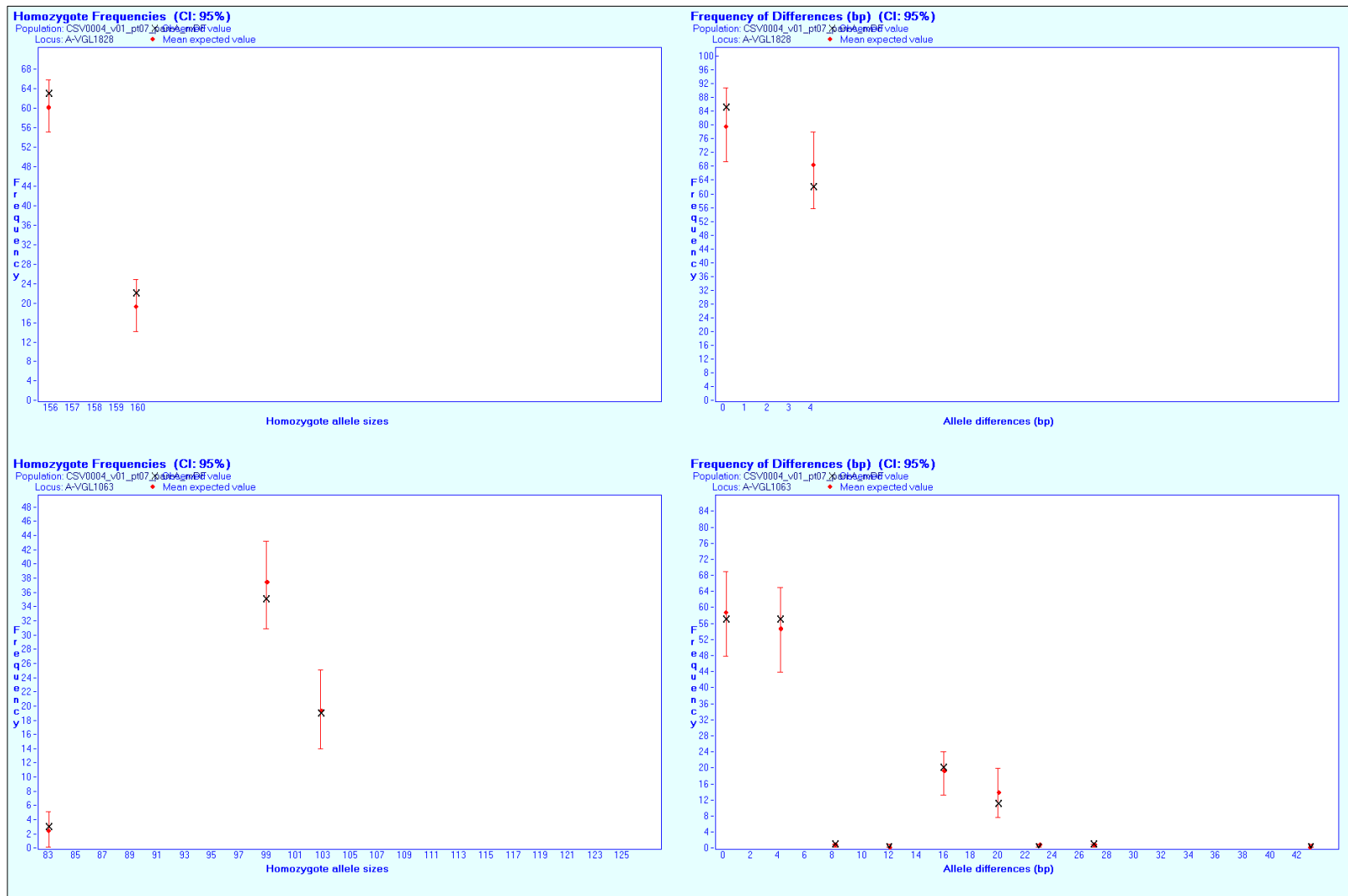
## 10 Přílohy

Tab. 11 Frekvence alel jednotlivých lokusů (panel A)

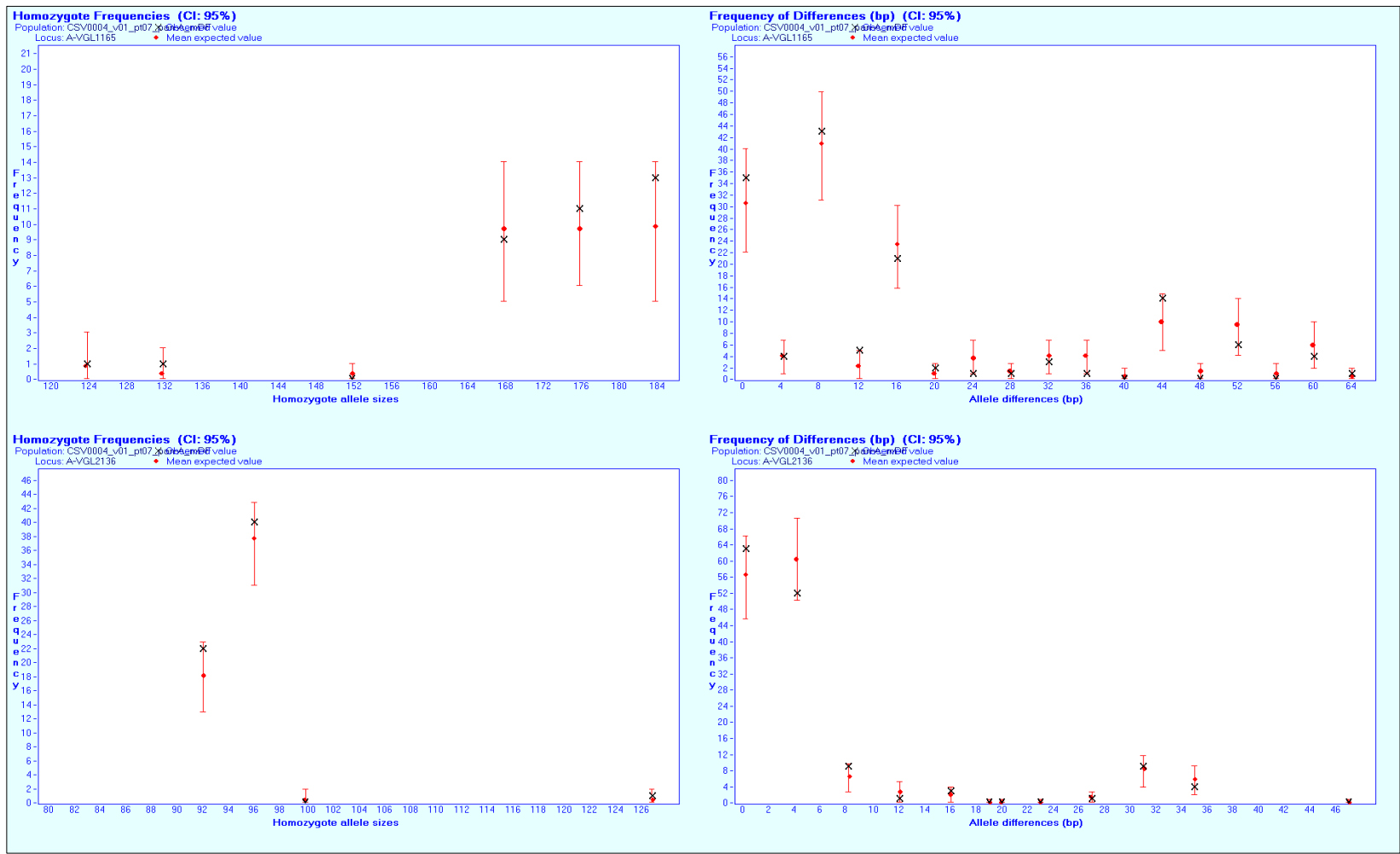
		CSV	CSV	VLK	VLK	CSV - VLK	CSV -VLK
Lokus	Panel	Alela	Frekvence	Alela	Frekvence	Alela	Frekvence
<b>VGL1063</b>	<b>A</b>	83	0,1259	83	0,9000	83	0,1513
		95	0,0034	99	0,1000	95	0,0033
		99	0,5034			99	0,4901
		103	0,3639			103	0,3520
		126	0,0034			126	0,0033
<b>VGL2136</b>	<b>A</b>	80	0,0106	84	0,6000	80	0,0102
		92	0,3592	92	0,3000	84	0,0204
		96	0,5141	100	0,1000	92	0,3571
		100	0,0493			96	0,4966
		104	0,0070			100	0,0510
		108	0,0035			104	0,0068
		123	0,035			108	0,0034
		137	0,0528			123	0,0034
						127	0,0510
<b>VGL1541</b>	<b>A</b>	150	0,4728	154	0,1000	150	0,4572
		154	0,0714	158	0,9000	154	0,0724
		158	0,0068			158	0,0362
		162	0,2381			162	0,2303
		166	0,2109			166	0,2039
<b>VGL1165</b>	<b>A</b>	120	0,0071	112	0,3000	112	0,0103
		124	0,0745	132	0,6000	120	0,0068
		132	0,0532	184	0,1000	124	0,0719
		136	0,0035			132	0,0719
		152	0,0461			136	0,0034
		168	0,2624			152	0,0445
		172	0,0106			168	0,2534
		176	0,2624			172	0,0103
		180	0,0142			176	0,2534
				180	0,0137		
				184	0,2603		
<b>VGL1828</b>	<b>A</b>	156	0,6395	148	0,2000	148	0,0066
		160	0,3605	160	0,2000	156	0,6184
				164	0,6000	160	0,3553
						164	0,0197
<b>VGL2409</b>	<b>A</b>	114	0,4286	114	0,9000	114	0,4441
		118	0,3231	118	0,1000	118	0,3158
		122	0,1259			122	0,1217
		126	0,1224			126	0,1184

Tab. 12 Frekvence alel jednotlivých lokusů (panel B)

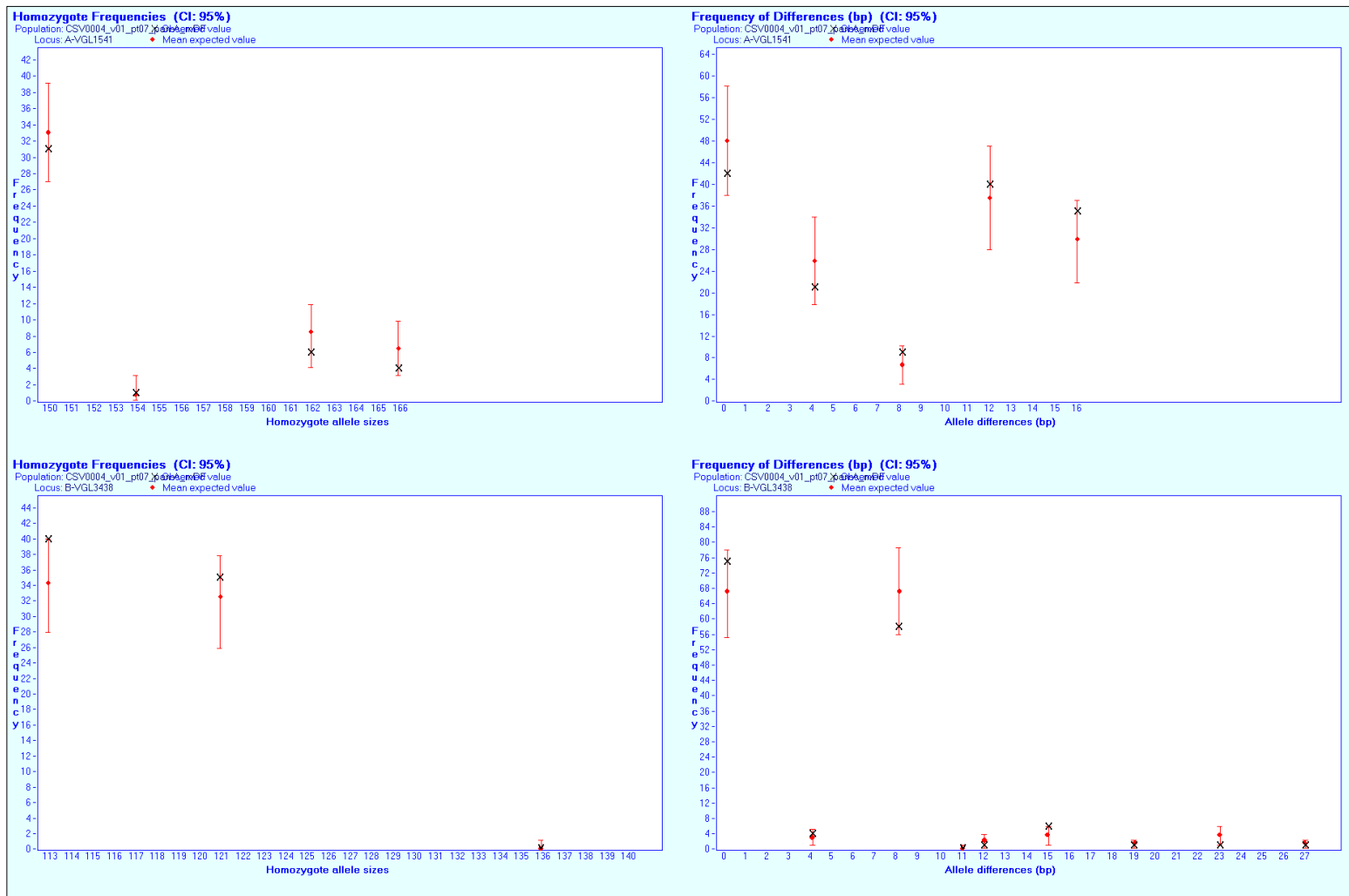
		CSV	CSV	VLK	VLK	CSV- VLK	CSV-VLK
Lokus	Panel	Alela	Frekvence	Alela	Frekvence	Alela	Frekvence
<b>VGL3008</b>	<b>B</b>	109	0,350	109	0,2000	109	0,3454
		125	0,1327	125	0,8000	125	0,1546
		129	0,2653			129	0,2566
		133	0,0102			133	0,0099
		137	0,1599			137	0,1546
		141	0,0034			141	0,0033
		145	0,0782			145	0,0757
		<b>VGL3438</b>	<b>B</b>	113	0,4830	105	0,3000
		117	0,0034	113	0,4000	113	0,4803
		121	0,4694	121	0,2000	117	0,0033
		125	0,0136	125	0,1000	121	0,4605
		136	0,0238			125	0,0164
		140	0,0068			136	0,0230
						140	0,0066
<b>VGL2009</b>	<b>B</b>	117	0,2226	117	0,3000	117	0,2252
		125	0,2329	125	0,5000	125	0,2417
		129	0,4178	129	0,1000	129	0,4073
		133	0,1267	133	0,1000	133	0,1258
<b>VGL3112</b>	<b>B</b>	161	0,1294	161	0,1667	161	0,1301
		165	0,1049	165	0,3333	165	0,1096
		169	0,2098	169	0,5000	169	0,2158
		173	0,0105			173	0,0103
		177	0,1399			177	0,1370
		181	0,2273			181	0,2226
		185	0,1748			185	0,1712
		189	0,0035			189	0,0034
<b>VGL1606</b>	<b>B</b>	127	0,0034	119	0,2000		
		131	0,1020	131	0,7000		
		135	0,7925	135	0,1000		
		139	0,0374				
		140	0,0034				
		143	0,0102				
		146	0,0136				
		150	0,0374				



Obr. 29 Porovnání odhadů frekvencí homozygotů se skutečnými pro lokusy VGL1828 a VGL1063

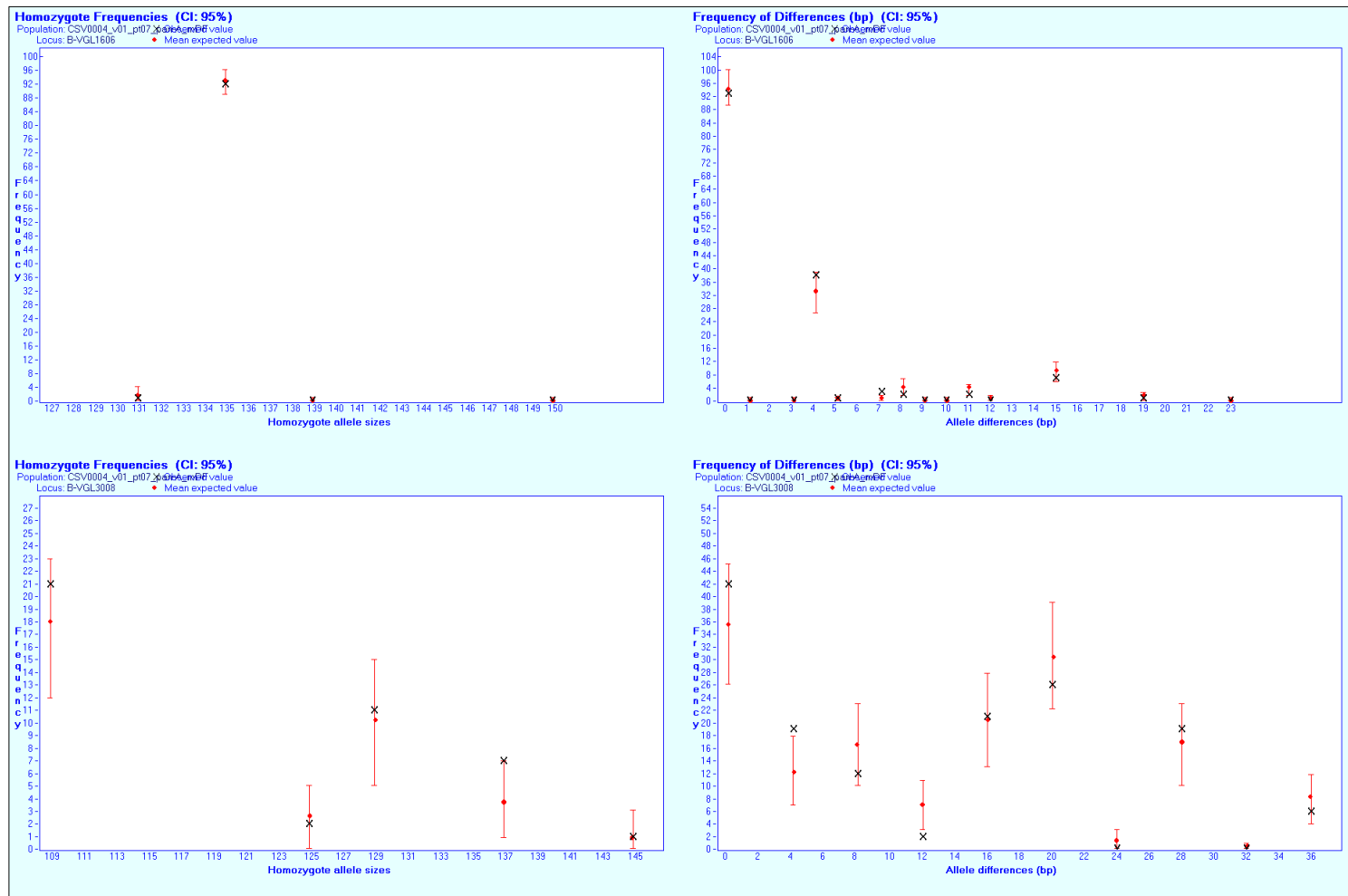


Obr. 30 Porovnání odhadů frekvencí homozygotů se skutečnými pro lokusy VGL1165 a VGL2136

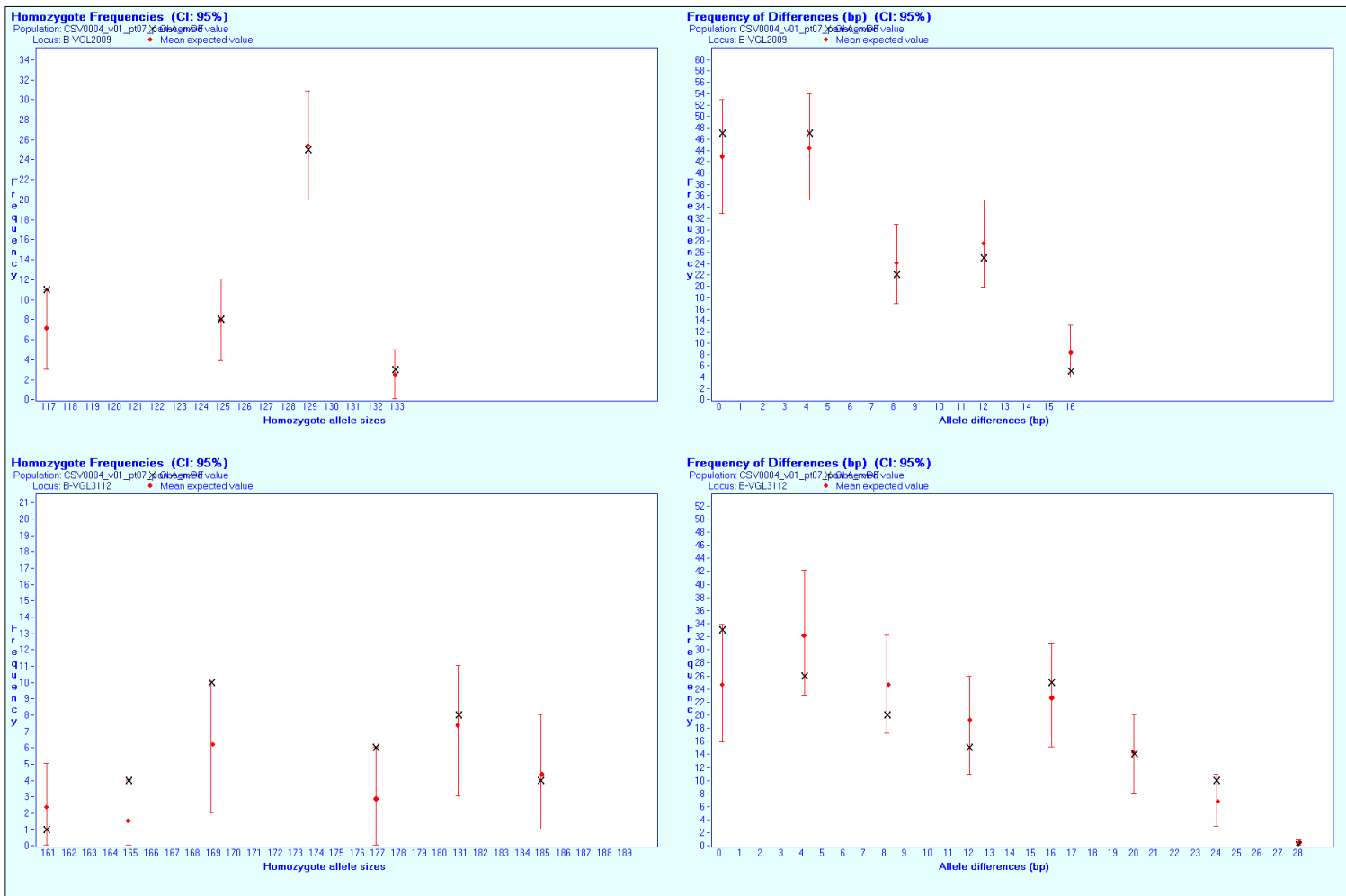


Obr. 31 Porovnání odhadů frekvencí homozygotů se skutečnými pro lokusy VGL1541 a VGL3438





Obr. 32 Porovnání odhadů frekvencí homozotů se skutečnými pro lokusy VGL1606 a VGL3008



Obr. 33 Porovnání odhadů frekvencí homozotů se skutečnými pro lokusy VGL2009 a VGL 3112

