

Česká zemědělská univerzita v Praze
Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů
Katedra obecné zootechniky a etologie



Fylogenetický původ a domestikace psa
Bakalářská práce

Autor práce: Jitka Jandová
Vedoucí práce: Šebková Naděžda, Dr. Ing.

© 2016 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou bakalářskou práci "Fylogenetický původ a domestikace psa" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího bakalářské 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 bakalářské práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušil autorská práva třetích osob.

V Praze dne 14. 4.2016

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala paní Dr. Ing. Naděždě Šebkové za metodické i odborné vedení mé bakalářské práce a poskytnutí odborné literatury. Dále děkuji Ing. Jaroslavu Jandovi za pomoc při překladu cizojazyčných zdrojů.

Souhrn

Hlavním cílem práce je prezentovat známá témata jako je fylogenie, domestikace, vznik moderních plemen na základě genetiky (genomiky) psa domácího.

V úvodu popisují evoluční historii psů a jejich příbuznost s ostatními masožravci, jak je vyvozují data molekulární genetiky. Výsledky analýzy mitochondriální DNA (mtDNA) a nukleární DNA ukázaly, že jediným předkem psa domácího je vlk šedý (*Canis lupus*) a datují dobu, kdy došlo k domestikaci asi před 14000 - 15000 lety. Poslední údaje však předpokládají, že domestikace vlka začala před více než 30 000 lety a je charakterizována několika nezávislými případy.

V části věnované domestikaci se zabývá přístup k identifikaci místa domestikace. Vědci dospěli k závěru, že domestikace psa proběhla z evropské větve vlka, tj. že proces domestikace nezačal ve východní Asii, jak se předpokládalo, ale kdekoli na euroasijském kontinentu, kde žili pohromadě lidé a vlci, a že psi z afrických vesnic jsou údajně potomky prvních domestikovaných psů, kteří se dostali do Afriky odkudkoli z Eurasie.

V obecné části práce uvozují do problematiky molekulárního výzkumu, seznamují s vlastnostmi nukleární DNA a mitochondriální DNA eukaryotických buněk, skladbou genomu. Poté navazuje popis principu sekvenování a popis nejvíce používané Sangerovy metody, která je modifikací polymerázové řetězové reakce.

V části zabývající se domestikáčními změnami popisují rozdíly mezi psem a vlkem, přibližují na svou dobu jedinečný domestikační pokus D. K. Beljajeva, který je v současné době předmětem molekulárních studií v rámci tripartitní spolupráce Univerzity v Cambridge a Utahu a Cornellskou univerzitou. Na závěr shrnují historii a vznik plemen psa, jejich genetickou strukturu a příbuznost. Vysoce strukturovaná organizace plemen má pro mapování jednoduché a komplexní znaky, velká odlišnost se nachází pouze mezi plemeny. Naopak uniformita v jednotlivých plemenech svědčí o tom, že rysy, jak morfologické tak patologické, mají malou heterogenitu a to vede k lepší schopnosti mapování. V poslední době bylo zveřejněno mnoho nových studií v projektu celogenomových asociačních studií GWAS, které úspěšně identifikovaly přidružené lokusy a často odhalily kauzativní mutace přispívající chorobě, morfologickým a behaviorálním poruchám. Po tisíciletí sloužili psi lidem různými způsoby, nyní se také stali modelovým systémem pro studium mnoha lidských genetických chorob.

Klíčová slova: pes, původ, fylogenie, předkové, domestikace.

Summary

The main objective of the thesis is to present the known topics such as phylogenesis, domestication, and origin of modern dog breeds based on genetics (genomics) of the domestic dogs.

The introduction describes the evolution history of dogs and their relation to other carnivores, as inferred from the molecular genetics data.

The results of modern analyses of mitochondrial DNA (mtDNA) and nuclear DNA showed that the only ancestor of domestic dogs is the gray wolf (*Canis lupus*) and dated the beginning of domestication period approximately to 14.000 to 15.000 years ago. However, the recent data suggest that the domestication of wolves began more than 30.000 ago and is characterised by several independent events.

The section focused on domestication deals with the approaches to identify the domestication area. The researchers came to the conclusion that the domestication of dogs took place in the European branch of wolves. It means that the domestication process did not start in Central Asia, as presumed, but somewhere in Eurasian continent, where humans and wolves lived together and that the dogs from African villages are supposedly the offspring of the early domesticated dogs, which came to Africa from Eurasia.

The thesis in its general part introduces to issues of molecular research, chemical properties of nuclear DNA and mitochondrial DNA of animal cells and genom composition. Then it continues with the description of the sequencing and description of the mostly used Sanger method, which is the modification of a polymerase chain reaction.

In the section dealing with the domestication changes I describe the differences between dogs and wolves and to that time unique domestication experiment of D. K. Belyaev, which is currently the subject of molecular studies in the frame of tripartite cooperation of the Cambridge, Utah and Cornell universities.

In the conclusion I summarize the history and development of dog breeds, their genetic structure and relation. Highly structured breed organization includes simple and complex mapping traits, high differences can be found between the breeds only. Contrarily, the uniformity of individual breeds suggests that the traits either morphological or pathological, have minor heterogeneity and this results in better mapping capability. Recently, many new studies in the project of genomwide association studies GWAS were released, which

successfully identify associated loci and often revealed causative mutation contributing to the disease, morphological and behavioural disorders.

For thousands of years the dogs have served to humans in different ways, now they began the model system for study of many human genetic diseases.

Keywords: dog, origin, fylogeny, ancestors, domestication.

Obsah

1 Úvod	8
2 Cíl práce	9
3 Literární rešerše.....	10
3.1 Původ psa.....	10
3.1.1 Předkové psa	10
3.1.2 Příbuzní psa.....	10
3.2 Domestikace psa	15
3.2.1 Domestikační změny	19
3.2.2 Odlišnosti mezi psem a vlkem	21
3.2.3 Podobnosti psa a vlka.....	22
3.3 Analýza DNA.....	22
3.3.1 Teorie o původu plemen psa a poslední analýzy DNA	27
4 Závěr.....	34
5 Seznam literatury.....	35

1 Úvod

Pes domácí (*Canis familiaris*) je fenotypově nejrozmanitější známý druh savce. Tato rozmanitost ve velikosti (např. čivava versus německá doga), tvaru, chování a dokonce i náchylnosti k chorobám se odráží v genetické variabilitě. Od Charlese Darwina po Konrada Lorenze první výzkumníci věřili, že tato rozmanitost odráží rozdílný původ, tj. vznikla křížením s více druhy psovitých, včetně šakalů.

Výsledky moderní analýzy mitochondriální DNA (mtDNA) a nukleární DNA místo toho ukázaly, že jediným předkem moderních psů byl vlk šedý (*Canis lupus*) a datují oddělení psa od vlka do doby asi před 14000 - 15000 lety.

Dostupnost nových genetických a genomických nástrojů včetně vícenásobných sekvencí úplného genomu psa a komerčně dostupné biočipy katapultovala studia psa a evoluci psa do věku genomiky. V posledních 10 letech genomika pokročila od raných stádií budování map až po dokončení asociačních studií rozsáhlých rodových linií a genomů.

Tento pokrok jak v genetice tak i genomice vedl k zavedení významných laboratorních metod, které spolu s dalším pokrokem v bioinformatice vyprodukovaly přemíru dat biologie savců a komparativní genetiky. Komparativní genomika je oblast biologického výzkumu, v němž se porovnávají genomové sekvence různých druhů – člověka, myši a široká paleta jiných organismů od bakterií po šimpanze. Porovnáním sekvencí genomů jiných živých forem mohou výzkumní pracovníci porozumět tomu, co navzájem odlišuje živé formy na molekulární úrovni. Komparativní genomika rovněž poskytuje mocný nástroj pro studium evolučních změn mezi organismy, což pomáhá identifikovat geny, které jsou konzervovány nebo jsou společné mezi druhy, stejně jako geny, které dávají každému organismu jedinečné charakteristiky. Byly identifikovány konkrétní mutace odpovědné za mnohé rysy, což na druhé straně dovolilo výběr těchto charakteristik ke studiu na genetické úrovni. Studium expresních profilů v mozku psa a celosvětová porovnání genomů umožňují pochopit domestikaci proces. V posledních několika letech také se zkoumala starověká DNA a v kombinaci s genomickými nástroji a archeologickým výzkumem nám umožní adresovat kde, kdy, jak a možná proč byli psi domestikováni.

2 Cíl práce

Cílem práce je sestavit kompletní a aktuální literární rešerši, která na základě dostupné zahraniční literatury shrnuje a porovnává výsledky z výzkumů molekulární biologie psa.

3 Literární rešerše

3.1 Původ psa

Moderní čeledi šelem vznikly asi před 60 miliony let (Flynn and Galiano, 1982, Eizirik et al., 2010). Pes domácí taxonomicky patří do čeledi psovitých (*Canidae*), která je klasifikována v rámci podřádu psotvárných (*Caniformia*) a řádu šelem (*Carnivora*). Proto tuleni, medvědi, lasice a mývalovité šelmy, které jsou také v podřádu *Caniformia*, jsou blíže zpřízněny s psovitými než kočky, hyeny a promyky, které tvoří podřád *Feloformia*. Čeď psovitých je fylogeneticky nejstarší linií v rámci podřádu *Caniformia*, která se odchýlila od ostatních šelem asi před 50 miliony lety (Wilson and Reeden, 2005).

3.1.1 Předkové psa

Rozlišují se tři podčeledi psovitých. Podčeď *Hesperocyoninae* zahrnuje nejstarší a nejprimitivnější členy čeledi (Wang, 1994). Tyto čeledi od oligocénu po miocén zahrnují malé až středně velké predátory a přežily více než 20 miliónů let. Ve středním miocénu byly *Hesperocyoninae* nahrazeny *Borophaginae*, velkými psy, kteří jsou často nejběžnějšími predátory v mladších třetihorních nalezištích, ale vyhynuli uprostřed pliocénu, asi před 4 milióny lety (Wang et al., 1999). Třetí podčeď psovitých *Canidae* zahrnuje všechny žijící představitele čeledi a objevili se nejdříve v oligocénu (Tedford et al., 1995, 2009).

3.1.2 Příbuzní psa

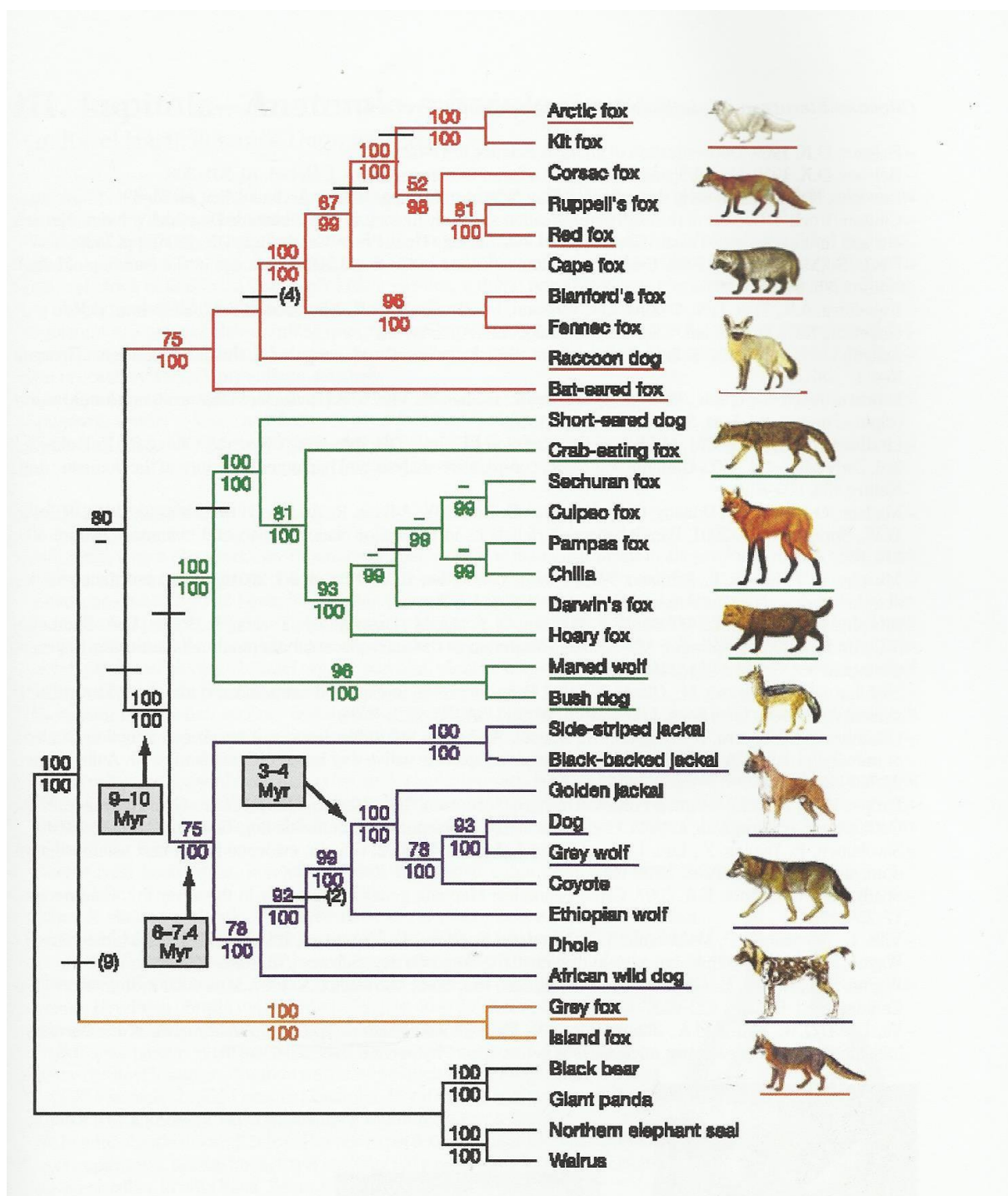
Ačkoliv psovití patří ke staré linii, je všech 36 dochovaných druhů (obr. 1) blízce příbuzných a oddělily se asi před 10 milióny lety, pravděpodobně v Severní Americe. Provedly se četné studie o evolučních vztazích mezi členy skupiny pomocí různých přístupů molekulární genetiky (např. Wayne and O'Brien, 1987; Wayne et al., 1997, Bardeleben et al., 2005, Lindblad Toth et al., 2005). Na základě asi 15 kb sekvence nukleární DNA lze mezi přežívajícími psovitými určit čtyři odlišné skupiny (obr. 2), které zahrnují severoamerické lišky šedé (nejodlišnější skupina, která obsahuje severní lišku šedou a lišku ostrovní), psovitě podobné lišce obecné (mimo jinými např. lišku obecnou, lišku velkouchou a lišku polární), jihoamerické lišky (např. liška šedá a pampová, pes pralesní, pes hřívnatý) a vlčí psovitě (pes domácí, vlk šedý, kojot, pes hyenovitý, dhoul, etiopský vlk a šakali (Lindblad-Toth et al., 2005).

Obr. 1: Existující druhy v čeledi psovitých na základě Wilsona Mittermeiera (2009) a obsahují psa domácího.

Taxon		Běžný název
Čeleď psovitých		
Podčeleď psovítí		
Genus:	Psovítí	
	<i>C. lupus</i>	Vlk šedý ^a
	<i>C. familiaris</i>	Pes domácí ^b
	<i>C. rufus</i>	Vlk rudohnědý ^c
	<i>C. latrans</i>	Kojot prériový
	<i>C. simensis</i>	Vlček etiopský
	<i>C. aureus</i>	Šakal obecný
	<i>C. adustus</i>	Šakal pruhovaný
	<i>C. mesomelas</i>	Šakal čabrákový
Genus:	<i>Cuon</i>	Dhoul
	<i>C. alpinus</i>	Dhoul sibiřský
Genus:	<i>Lycaon</i>	
	<i>L. pictus</i>	Pes hyenovitý
Genus:	<i>Chrysocion</i>	
	<i>C. brachyurus</i>	Pes hřívnatý
Genus:	<i>Speothos</i>	
	<i>S. venaticus</i>	Pes pralesní
Genus:	<i>Cerdocyon</i>	
	<i>C. thous</i>	Maikong
Genus:	<i>Atelocynus</i>	
	<i>A. Microtis</i>	Pes krátkouchý
Genus:	<i>Pseudalopex</i>	
	<i>P. culpaeus</i>	Pes horský
	<i>P. fulvipes</i>	Pes Darwinův
	<i>P. griseus</i>	Pes argentinský
	<i>P. gymnocercus</i>	Pes pampový

	<i>P. sechurae</i>	Pes sechura
	<i>P. vetulus</i>	Pes Azarův
Genus:	<i>Urocyon</i>	
	<i>U. cinereoargenteus</i>	Liška šedá
	<i>U. littoralis</i>	Liška ostrovní
Genus:	<i>Nyctereutes</i>	
	<i>N. procyonoides</i>	Psík mývalovitý
Genus:	<i>Otocyon</i>	
	<i>O. megalotis</i>	Pes ušatý
Genus:	<i>Alopex</i>	
	<i>lagopus</i>	Liška polární
Genus:	<i>Vulpes</i>	
	<i>V. velox</i>	Liška šedohnědá
	<i>V. macrotis</i>	Liška velkouchá
	<i>V. vulpes</i>	Liška obecná
	<i>V. corsac</i>	Liška korsak
	<i>V. ferrilata</i>	Liška horská
	<i>V. bengalensis</i>	Liška džunglová
	<i>V. pallida</i>	Liška písečná
	<i>V. rueppellii</i>	Liška pouštní
	<i>V. chama</i>	Liška chama
	<i>V. cana</i>	Liška kana
	<i>V. zerda</i>	fenek

Obr. 2: Fylogenetický strom psovitých založený na analýze asi 15 000 základních párů sekvence DNA exonu a intronu (převzato Lindblad-Toth et al. 2005). Rámečky ukazují hlavní klady (klady lišky obecné, severoamerického vlka a lišky šedé). Počty chromozomů jsou vyznačeny v závorkách pro druhy nebo seskupení psovitých (Wurster-Hill and Centerwall, 1982; Wayne et al., 1987).



O evolučních vztazích mezi psovíty svědčí také podobnost chromozomů. Počet a struktura chromozomů mezi psovíty druhy se značně liší, od 36 metacentrických chromozomů u lišky obecné do 78 akrocentrických chromozomů u vlků, kojotů a šakalů. Avšak vlku podobní psoví a jihoameričtí psoví mají vysoké počty diploidních chromozomů a akrocentrických chromozomů a jsou blízce příbuzní. Obdobně liškám podobní psoví mají malý počet chromozomů a metacentrických chromozomů a sdílejí společné předky. Tento vysoký stupeň variace kontrastuje s většinou jiných čeledí masožravců, v nichž počet a struktura chromozomů jsou dobře zachovány. Všichni vlkovití mají 78 chromozomů a mohou se křížit a tvořit plodné potomky (Gram, 1954). To jsou druhy, které se uvažovaly během historie jako možní předci psů domácích (obr.3): vlk obecný, kojot, následován šakalem obecným, vlčkem etiopským, asijským divokým psem (dhoul, vlk rudý) a africkým divokým psem (pes hyenový) (Wurster-Hill and Centerwall, 1982).

Obr. 3: Fylogeneticky nejbližší příbuzní psa (převzato z internetu : www.shiba-dog.de).



Vlk obecný (*Canis lupus*)



Kojot (*Canis latrans*)



Šakal obecný (*Canis aureus*)



Vlček etiopský (*Canis simensis*)



Asijský divoký pes (dhoul, vlk rudý) (*Cuon alpinus*)



Africký divoký pes (pes hyenový) (*Lycaon pictus*)

3.2 Domestikace psa

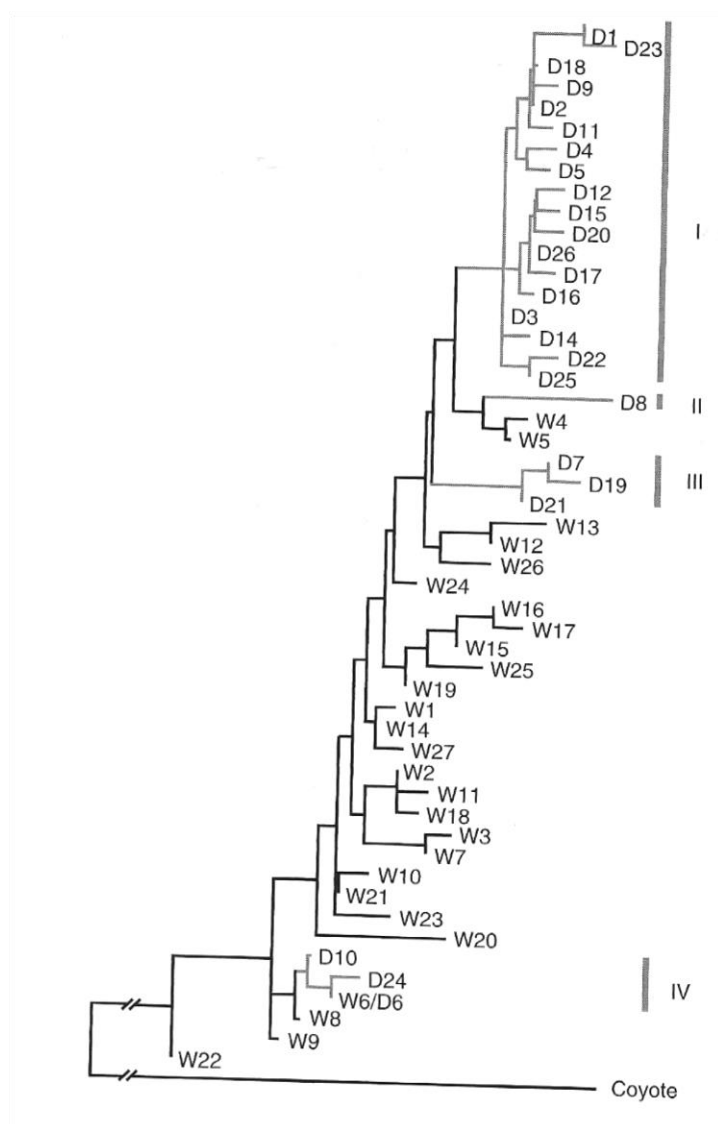
Domestikace je proces týkající se populace a trvá tisíce (spíše desítky tisíc let). Za tu dobu se zvířata chovaná člověkem odlišují morfologicky, fyziologicky i psychicky od svých divokých předků. Populace domácích zvířat se přizpůsobila podmínkám chovu v zajetí. Tyto změny jsou geneticky fixovány, rodiče je předávají potomkům. Obecně považujeme za domestikovaná zvířata ta, která se bez problémů v podmínkách běžného soužití s člověkem množí (Šebková, 2010).

Původ domestikovaných druhů je málokdy dobře dokumentován. Počet, čas a geografický původ zakládající události lze z nevyrovnaného archeologického záznamu obtížně určovat (Zeder et al., 2006). Tento problém se dobře ilustruje na psu, jelikož na archeologických nalezištích bylo nalezeno velmi málo pozůstatků psa domácího; pozůstatky jsou často úlomkovité a oddělení od vlčích kostí může být obtížné. Ani pro několik set zachovaných plemen psů, vyvinutých v posledních několika stech let nejsou často známy specifické křížovatky, které vedly k jejich zavedení (Dennis-Byan and Clutton-Brock, 1988). Jediným kritériem tradičně používaným k odlišení pozůstatků psa a vlka z archeologického naleziště byla kosterní morfologie. Většina moderních psů se morfologicky odlišuje od vlků i od šakalů (Olsen, 1985) a tyto odchylky se používaly k oddělení druhů na archeologických nalezištích (např. Sablin a Chlopačev, 2002). V důsledku toho se mohli rozeznat pouze morfologicky odlišní psi a počáteční stádia domestikace psů, když morfologické odlišení bylo malé, nemusela být rozeznána (Germonpré et al., 2009, Losey et al. 2011). Pro pochopení ohromné rormanitosti psů je zásadní genetická rozmanitost zakládajících populací. Heterogenní původ by svědčil o tom, že rozmanitost genů je rozhodující pro fenotypovou evoluci, zatímco omezená populace zakladatele by naznačovala, že odchylka vývoje a nové změny genomu jsou důležitější v rozdílnosti plemen (např. Wayne, 1986 a) b).

Až do nynějška pocházely nejstarší pozůstatky domestikovaných psů z archeologického záznamu ze středního Východu z doby asi před 12000 -14000 roky. Proto se toto místo a čas považovalo za místo a čas domestikace. (Olsen, 1985, Clutton-Brock, 1995, 1999). Další archeologický výzkum však ukázal existenci pozůstatků stejného stáří nebo o trochu starších v Evropě (Nobis, 1979, Sablin a Chlopačev, 2002). Nicméně první výskyt fosilního záznamu domestikovaných psů, jak indikuje jejich morfologická rozdílnost od vlků, může být zavádějící. První psi mohli být morfologicky po dlouhou dobu podobní vlkům (Vila et al., 1997 a), b) a vzhled odlišně vypadajících psů v archeologickém záznamu může být způsoben

změnou režimu výběru. Možnost podstatně staršího data pro domestikaci psů byla poprvé silně podpořena genetickým srovnáním sekvencí mitochondriální DNA vlka a psa (Vila et al., 1997a). Genetickým vyhodnocením domestikace psa na základě dat sekvencí kontrolní oblasti byly nalezeny čtyři divergentní sekvence kladů (obr.4).

Obr. 4: Příbuzenský strom vlka (W) a psa (D) sekvencí kontrolního režimu (metoda neighbour-joining) mitochondriální DNA (Vila et al. 1997a). Haplotypy psa jsou seskupeny do čtyř kladů, I ž IV.



Nejvíce odlišné z těchto kladů obsahovaly sekvence, které se liší až o 1% v sekvenci DNA. Po aplikaci molekulárních hodin došli výzkumníci k závěru, že vznik těchto kladů mohl nastat

asi před 135 000 roky. Ačkoliv to byl velmi hrubý odhad a neposkytoval konfidenční intervaly, molekulární výsledky ukazovaly na starobylý původ psů domácích z vlka dlouho před jinými zvířaty a rostlinami a byly v rozporu s předchozím archeologickým výzkumem. S podobnými mitochondriálními daty se provedly i některé další následující studie, ale tyto studie předpokládaly, že klad I má polyfiletický původ a jeden z těchto dílčích kladů podporoval dobu indikovanou archeologickými nálezy, tj. asi před 14000 roky (Savolainen et al., 2002; Pang et al., 2009). Avšak poslední nálezy pozůstatků psa ve střední Evropě posunuje toto datum do doby před více než 30000 roky (Germonpré et al., 2009) potvrzuje představu velmi staré domestikace. Výsledky matematických simulací založených na vazebné nerovnováze pozorovaného v genomu psa po porovnání více plemen svědčí o tom, že nalezený vzorec zapadá do modelu zahrnujícího původ psa v době asi před 27 000 lety (Lindblad-Toth et al., 2005).

Výše uvedené analýzy sekvencí mitochondriální DNA ukazovaly na to, že v původu psů jsou zahrnuty nejméně čtyři případy vzniku nebo inbreedingu, protože sekvence psů se nalézají ve čtyřech oddělených skupinách neboli kladech, každé s jedinečnou linií vlčích předků (Vila et al., 1997a). Základní struktura sekvenčního stromu byla potvrzena nezávisle mnoha dalšími výzkumníky s tím, že všechny sekvence psů se shlukují do čtyř ze šesti kladů (Okumura et al., 1997; Randi et al., 2000; Savolainen et al., 2002).

Prvním přístupem k identifikaci toho, kde byli psi domestikováni, by mohlo být srovnání sekvencí psa s těmi, které byly nalezeny v různých populacích vlků, s předpokladem, že sekvence psů by měla být nejpodobnější sekvencím vlka z míst, kde došlo k domestikaci. U mnoha druhů schémata variace sekvencí DNA jasně ukazují asociaci s geografii v tom, že specifické sekvence se zdají být těsněji asociovány s určitými geografickými oblastmi. Bohužel, mitochondriální rozdílnost u vlků není jasně rozdělena a mnoho podobných sekvencí se nachází ve velmi rozdílných populacích (Vila et al., 1999). I když fylogeografická schémata u vlků nejsou konečně definována, je možné použít tuto metodu k vyloučení indického subkontinentu a Severní Ameriky jako místa populace s předchůdci k psům domácím, protože vlci v těchto místech mají dobře rozlišené mitochondrické sekvence. Afriku lze vyloučit, protože se zdá, že vlci šedí na tomto kontinentu nikdy nežili; vlčí mitochondriální linie byla v poslední době pozorována v severní Africe (Rueness et al., 2011), ale ta se velmi odlišuje od sekvencí nalezených u psů. Tato pozorování poukazují na možné místo domestikace většinu Eurasie (Vila et al., 1999).

Druhým přístupem by mohlo být zkoumání rozdílnosti mitochondriální DNA u přežívajících populací psů. Mohlo by se očekávat, že tato rozdílnost bude vyšší a bude zahrnovat více divergentních haplotypů v místech, kde se domestikace uskutečnila, protože populace psů v těchto oblastech by měla delší čas k vývoji a diverzifikaci. Tento přístup použil Savolainen et al. (2002) a Pang et al., (2009), aby ukázali, že domestikace se odehrála ve východní Asii. e Jelikož analyzovaný vzorek byl ovlivněný směrem k čistokrevným psům v jiných oblastech světa a ty pravděpodobně představují pouze malou část původní rozdílnosti (Irion et al., 2006, Lindblad-Toth et al., 2005), je možné, že odhady rozdílnosti byly také ovlivněny. Navíc, genetické složení přežívající populace psů se může velmi lišit od jejich minulého složení. Například složení populace psa v Amerikách byly velkou měrou ovlivněny příchodem Evropanů a jejich psů. Proto porovnání sekvencí mitochondriální DNA nalezené u „prvních“ psů odhalilo přítomnost kladů sekvencí nepozorovaných u moderních zvířat (Leonard et al., 2002; Castrovielo-Fisher et al., 2011).

Protože mitochondriální DNA je z matčiny strany zděděná, nabízí použití tohoto markeru samotného k posouzení centra domestikace zkreslený pohled. Vila et al. (2005) ukázali, že extrémní rozdílnost přítomná v komplexu histokompatibility (MHC) by mohla ukazovat, že k původu moderních psů přispívalo mnohem více vlků, než se soudilo z malého počtu mitochondriálních linií. To by mohlo indikovat důležitý příspěvek vlčích samců k současné rozdílnosti u psů, který prošel ve studiích založených na genetických markerech vrozených z matčiny strany bez povšimnutí. Z tohoto důvodu genomové přístupy pravděpodobně odrážejí původ domácích psů lépe. V tomto smyslu von Holdt et al. (2010) studoval 48000 jednotlivých nukleotických polymorfismů (SNPs) v genomu psů a vlků a ukázal, že vlci ze Středního Východu byli rozhodujícím zdrojem rozdílnosti genomů pro psy, i když inbreeding mezi populacemi mezi psy a místními vlky byl v rané historii psů také důležitý. Spolu s tím Gray et al. (2010) ukázal, že haplotyp malých psů s IGF1 (gen inzulínu podobného růstového faktoru 1) je více spřízněn s geny vlků Středního východu.

3.2.1 Domestikační změny

Co mohlo být hlavní evoluční silou, bylo po dlouhou dobu diskutovaný problém.

Jak se mohli současní domácí psi, dnes tak velmi rozdílní, vyvinout z uniformního divokého předka (Herre, 1959; Beljajev, 1969, 1979; Hemmer-1990; Clutton Brock, 1997; Coppinger a Schneider, 1997; Wayne a Ostrander, 1999; Diamond, 2002)? Je dobře známo, že určitá plemena psů se liší velikostí a proporcemi těla mnohem více než druhy nebo dokonce rody. Jinak řečeno, domestikace vedla u psů ke vzniku drastických morfologických a fyziologických změn rychlostí výrazně převyšující to, co se obvykle pozoruje u přírodních populací. Klasický názor, že mutace jsou řídkými a náhodnými změnami jednotlivých genů, vrhá vážné pochyby na myšlenku, že změny, ke kterým došlo během domestikace psa po krátké časové rozpětí, byly pouze mutační povahy (Coppinger and Schneider, 1997).

Ve skutečnosti je evolučním důsledkem domestikace psa zásadní reorganizace reprodukční funkce, což je důležité pro evoluční přežití. Psi splňovali primární biologický úkol – reprodukovat se – odlišně od svých divokých protějšků. Ztratili monoestricitu a získali diestricitu až triestricitu (malá plemena). Nejen psi, ale i jiná domácí zvířata ztratila svou rozmnožovací sezónnost. Tato paralela morfologické a fyziologické variability vzorců není zřetelná nikde jinde než v domácích podmínkách. Je nepravděpodobné, že tato variabilita byla způsobena homologickými mutacemi v homologických genech u domácích druhů. Je více přímých důkazů, že mutace se neakumulovaly v domestikačních podmínkách rychle. Studie proteinových produktů z více než 50 lokusů například ukázaly, že psi a vlci sdílejí alely společně (Wayne a O'Brien, 1987).

Na základě studií mitochondriální DNA (mtDNA) se tvrdilo, že původně existovaly malé zakládající skupiny a že ty se úzce příbuzensky plemenily a byly opakovaně ovlivňovány genetickým driftem (Vila et al., 1997; Savolainen et al., 2002). Naproti tomu různost alel hlavního histokompatibilního komplexu (MHC) ukázala existenci několika set zakladatelů, jakož i neustálého zpětného křížení těchto zakladatelů s divokými předky během "protodomestikace" (Vila et al., 2005). Je také důležité zdůraznit, že domestikace nebyla izolovaná událost, která se odehrála v několika vzdálených lokalitách. Byl to běžný jev a začal na různých místech a v různou dobu (Dobney a Larson, 2006; Galibert et al., 2011). Případ příbuzenské plemenitby nebyl nejběžnější u prvních zakladatelů domácího psa, ale u zakladatelů plemene. Stadium formování plemen bylo to, které procházelo úzkým hrdlem. Nedávno se ukázalo pomocí rozsahu vazebné nerovnováhy (LD) jako indikátoru efektivní velikosti populace, že nejvážnější zúžení v efektivní populaci se objevovala přesně v tomto

stadiu a že jako výsledek pokračující vnitropříbuzenské plemenitby 35% nukleotidové rozdílnosti se v této periodě ztratilo. V porovnání ztráta různorodosti v raných stádiích domestikace se odhadovala pouze na 5% (Gray et al., 2009).

Ruský genetik D.K. Beljajev zvažoval povahu a původ změn způsobených domestikací přes regulační mechanismy vývoje u těchto změn (Beljajev, 1969, 1979). Věřil, že regulační mechanismy byly pravděpodobně vystaveny nejsilnější selekci, když se podmínky staly extrémně náročné a vyžadovaly velké napětí obecných adaptivních systémů, funguje genom jako specifický odezvový systém a vyvíjí se směrem k rostoucí genetické variabilitě (Beljajev 1969). To ho přimělo k myšlence reprodukce dokumentárního scénáře rané domestikace. Experimenty domestikace se uskutečnily po 50 let v Institutu kynologie a genetiky Sibiřského oddělení Ruské akademie věd. Druh pro domestikaci byla liška stříbrná (*Vulpes vulpes*), taxonomicky blízká příbuzná psa. Úkolem experimentu bylo reprodukovat hlavní faktor (jak se zpočátku navrhovalo) v prvních krocích domestikace intenzivní výběrový tlak na chování. Všechna zvířata od samého počátku domestikace měla před sebou stejné evoluční situace tlaku výběru na specifické behaviorální znaky upřednostňující adaptaci na nový sociální faktor lidí. Experiment s domestikací lišky ukázal, že akumulace mutací nové šance a jejich homozygotizace z příbuzenské plemenitby nehrají velkou roli. Nejpravděpodobněji fenotypové změny, které vznikly v průběhu domestikace, byly způsobeny změnami v několika genech. Tyto geny však ovlivnily celý vývoj psa a tudíž mohly mít systematický efekt. Jejich funkcí (misí) bylo integrovat celý vývoj jako celek a z toho důvodu zabíraly nejvyšší úroveň v hierarchické struktuře regulace exprese genomu. I malé genetické změny v regulátorech na této vysoké úrovni mohly vyvolat kaskádu změn v aktivitě genu a jako důsledek rychlé a extenzivní změny ve fenotypu. Mnoho změn ve fenotypu lišek v podmínkách jejich experimentální domestikace byly důsledkem posunu v rychlostech, při kterých příslušné vývojové procesy pokračovaly. Vývojové procesy u ochočených lišek měly, tak jako u psů, pedomorfické rysy: tendenci k urychlení pohlavní zralosti na pozadí opožděného vývoje somatických charakterů. Opožděným vývojem vznikali dospělí vykazující znaky zadržené ve stadiu vývoje (neotonie). Role přímého výběru pro urychlenou pohlavní zralost jako evolučního mechanismu vzniku neotonie se často zkoumala. Data ukazují, že v tomto případě je mechanismem výběr pro ochočení, což ovlivňuje genetický systém a funkci regulátorů rychlosti vývoje na úrovni celého mechanismu. Co se týká urychlení pohlavní zralosti u lišek, je to také korelovaná odezva na takovýto výběr. Všechna kritéria ukazují, že shodné behaviorální, morfologické a fyziologické transformace u lišek a u psů, stejně jako

podobné změny v jejich vývoji, mohou být výsledkem stejných genetických změn a jsou vyvolány adresným směrovým výběrem. Experiment s domestikací lišky jasně ukázal, jak ohromný evoluční potenciál může být uvolněn výběrem vektorizovaným pro chování. Některé důležité milníky evoluční cesty psů při domestikaci byly reprodukovatelné po krátkodobé rozpětí 50 let nejsilnějším výběrem pro genetické systémy kontrolující specifické behaviorální rysy ochočitelnosti. Výsledky posledních studií molekulárních determinantů chování při ochočení lišek mohou sloužit jako další argument podporující toto hledisko. Je pozoruhodné, že u lokusu, který byl identifikován na chromozomu lišky 12 (VVU12), který je blízce spojen s chováním při ochočení, se objevila syntenie oblasti, která byla nalezena na chromozomu psa 5 (CFAS5), u něhož byla nedávno prokázána účast u původu psa jako výsledek domestikace vlka. Tento výběr může být považován za klíč a univerzální mechanismus evoluční transformace zvířat během jejich domestikace (Kukekova,2011).

3.2.2 Odlišnosti mezi psem a vlkem

- Pes má oproti stejně velkému vlku až o 30 % menší hmotnost mozku. Snížení hmotnosti nesouvisí a nemá vliv na inteligenci psa, ale je zapříčiněno dlouhodobým soužitím s člověkem. Změna hmotnosti nastala v důsledku závislosti psa na člověku a zhoršování jeho samostatnosti. U psa tak došlo ke zmenšování smyslových center. Pes je oproti vlkovi všežravec. Vlk je pouze masožravec, takže jeho trávicí trakt je kratší než u psa. Vlk má velký žaludek a dovede sežrat najednou až 8 kg masa. Většina plemen psů má skus nůžkový a většina vlků má skus klešťový. Pes má vyšší plodnost v porovnání s vlkem. Fena hárá obvykle dvakrát do roka a má větší počet štěňat v jednom vrhu. U velkých plemen není výjimkou 12 štěňat. Vlčice hárá jedenkrát ročně a rodí menší počet mláďat. Psi nemají ocasní pachovou žlázu. Hlasový projev psa jako dorozumivací prostředek s lidmi je štěkání. Vlci neštěkají, pouze kňučí a vyjí. Pes nosí většinou ocas zdvižený, často také zakroucený, vlk nosí ocas svěšený volně dolů. Pes má na rozdíl od vlka různou strukturu a délku srsti u jednotlivých plemen (krátkosrstí, dlouhosrstí, hrubosrstí, naháči...). Čenich většiny psů je kratší než čenich vlků. Pes má na rozdíl od vlka jiný způsob pohybu, je těžkopádnější. Stopa vlka je delší a užší, než stopa stejně velkého psa. Typické pro některá plemena psů jsou svislé ušní boltce. Psi nemají tak kompletní repertoár vizuálních signálů jako vlci. Na rozdíl od vlků používají častěji hlasové signály. Spolupráci při lovu velké kořisti lze pozorovat jen u vlků. Na rozdíl od psů se vlci společně podílí na péči o mláďata (Šebková 2010).

3.2.3 Podobnosti psa a vlka

Podobnosti jsou také v chování při komunikaci psů a vlků. Podobně jako vlci umí identifikovat jednotlivce a tvořit pevné vztahy. Spolu s jedinci téhož druhu tvoří smečky, sdílí s nimi potravu a místo pro odpočinek. Hierarchie ve smečce a soutěž o zdroje jako je potrava, místa pro odpočinek. Možnosti rozmnožování představují klíčové stránky sociálního chování (Šebková 2010).

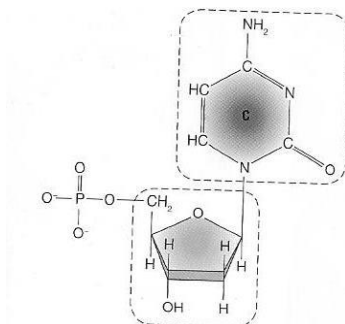
Data molekulární genetiky důsledně podporují původ psů z vlků šedých. Psi mají s vlky společně alely allozymu (Ferrell et al. 1978, Wayne a O'Brien, 1987), sdílejí vysoce polymorfni mikrosatelitní alely (Garcia-Moreno et al., 1996; Muñoz-Fuentes et al., 2010) a mají sekvence mitochondriální a nukleární DNA podobné nebo identické jako ty, které se našly u šedých vlků (Wayne et al., 1992; Gottelli et al., 1994, Vila et al., 1997a; Barbeleben et al., 2005). Extenzivní prohlídka několika set stovek šedých vlků a psů zjistila, že dva druhy mají pouze slabě divergentní sekvence kontrolní oblasti mitochondriální DNA (Vila et al., 1997 a) Například průměrná odchylka mezi psy a vlky pro tuto velmi proměnlivou oblast byla asi 2 % ve srovnání se 7,5 % mezi psy a kojoty, jejich dalšími nejbližšími příbuznými. Průměrná rozdílnost mezi psy a vlky je uvnitř rozmezí genetické variability pozorované u divokých vlků (Vila et al., 1997a, 1999). Porovnání téměř 15 000 základních párů sekvencí DNA v intronech a exonech distribuovaných po genomech představuje lepší odhad odklonu sekvence genomu mezi druhy a potvrdilo, že vlk šedý a pes domácí jsou nejbližší příbuzní s odchylkou sekvence 0,04 % a 0,21 % v nukleárních sekvencích exonu resp. intronu (Lindblad-Toh et al., 2005). Kojot, šakal obecný a etiopský vlk vykazují menší podobnost, i když tyto druhy se se psy v divoké přírodě příležitostně kříží. V poslední době odhalila analýza desítek tisíc genetických znaků rozváděných po celém genomu psa, že byly u psů a vlků polymorfni a tudíž potvrdily jejich celkovou podobnost a ukázaly, že další druhy psovitých byly déle příbuzní (von Holdt et al., 2010).

3.3 Analýza DNA

Deoxyribonukleová kyselina (DNA) je uložena v jádře každé eukaryotické buňky a má klíčový význam pro přenos základní genetické informace (obr. 6).

Základní stavební jednotkou molekuly DNA je nukleotid – částice tvořená deoxyribózou, jednou purinovou bází – adeninem(A), guaninem(G) nebo jednou pyrimidinovou bází – cytosinem(C), thyminem(T) a fosfátovou skupinou (obr. 5).

Obr. 5 : Strukturní vzorec nukleotidu.

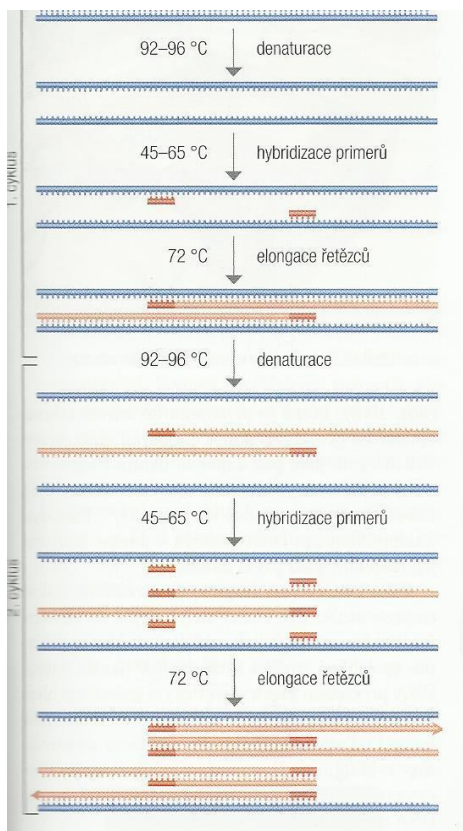


Obr. 6 : Dvoušroubovice DNA – schematické znázornění s uvedením komplementárních párů bází (převzato z práce Kočárek, 2008).



Nukleotidy rozlišujeme podle bází, které obsahují. Sekvence nukleotidů v DNA tvoří geny. Metody, které se používají v genomice k mapování genomu, se souborně označují “sekvenční analýzy DNA”. Sekvenování je založeno na principu polymerázové řetězové reakce neboli PCR (z anglického „Polymerase Chain Reaction”), slouží ke zmnožení specifických úseků DNA a skládá se z procesů: denaturace, hybridizace a elongace nukleotidových řetězců (obr. 7).

Obr. 7 Schéma polymerázové řetězové reakce (převzato z Kočárek 2008).

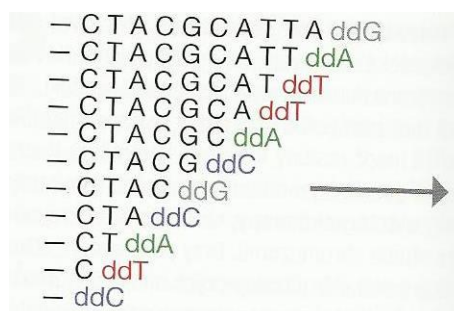


Denaturace probíhá působením zvýšené teploty (92 - 96 °C). Hybridizace primerů, což jsou úseky o známé sekvenci, které jsou komplementární ke koncovým oblastem úseku vyšetřovaného genomu a důležité je, aby se nevyskytovaly na jiných místech genomu, probíhá při teplotě 45 – 65 °C. Elogance probíhá působením DNA-polymerázy při teplotě 72 °C a deoxyribonukleotidtrifosfátu.(dNTP). Na 3'-OH-konce navázaných primerů nasedá DNA-polymeráza, která která k primerům připojuje nové nukleotidy a tím prodlužuje řetězec ve směru 5' --> 3'. Tak se vytváří základ budoucího fragmentu DNA. Tento cyklus se opakuje 20 – 40x v cyklu a tím se vytvoří až miliarda kopií. Jedna z nejpoužívanějších současných metod je modifikací polymerázové řetězové reakce (PCR) - **Sangerova** metoda, která využívá speciální vlastnosti speciálních nukleotidů - 2', 3' dideoxyribonukleotidtrifosfátů. Tyto nukleotidy (ddATP, ddCTP, ddGTP a ddTTP) nemají na 3' uhlíku ribosy OH skupinu, z čehož plyne, že na tento konec již nemůže být žádný další nukleotid navázán. V reakční směsi je namnožena jednovláknová DNA (jejíž sekvenci chceme znát), DNA - polymerasa, příslušné primery (aby DNA - polymerasa mohla začít pracovat), dostatek deoxyribonukleotidtrifosfátů (dATP, dCTP, dGTP a dTTP) pro syntézu a

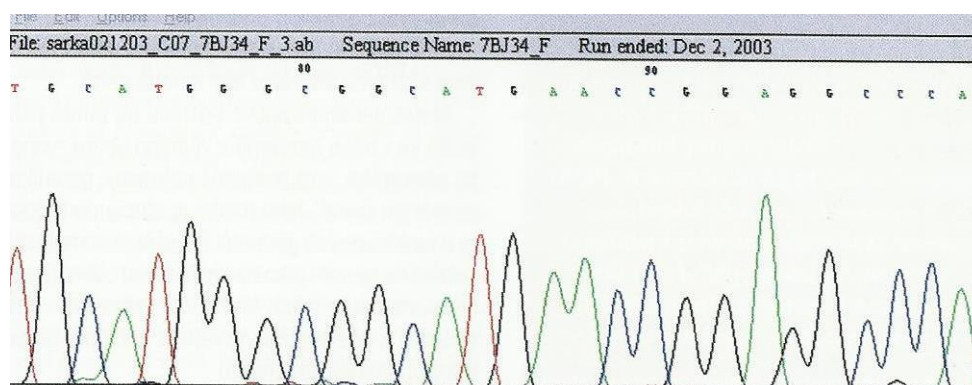
ještě určité množství jednoho typu dideoxyribonukleotidtrifosfátu – např. ddATP. Polymerasa začne od nasednuvších primerů doplňovat sekvenci druhého vlákna. Pokaždé, když polymerasa doplňuje dATP do řetězce, je určitá pravděpodobnost, že namísto dATP použije ddATP. Pokud je zařazen ddATP, potom polymerace na tomto místě končí. Necháme-li tedy takovouto reakci proběhnout, získáme velké množství různě dlouhých oligonukleotidů, které budou všechny končit adeninem (dojde k zastavení polymerace u ddATP). Pokud necháme proběhnout stejnou reakci, tentokrát s ddCTP, ddGTP a nakonec i ddTTP, dostaneme 4 směsi oligonukleotidů, přičemž v každé směsi budou oligonukleotidy končit příslušnou bází (obr. 8).

Obr. 8: Princip sekvenování DNA – úseky DNA o různé délce vzniklé začleněním fluorescenčně značených ddNTP (a), výsledek počítačového zpracování, který přímo udává sekvenci zkoumaného úseku DNA (b), jednotlivé vrcholy grafu odpovídají příslušným nukleotidům (převzato Kočárek, 2008).

a)



b)



Klasická metoda vyhodnocení spočívá v provedení elektroforézy, přičemž jsou v gelu vytvořeny 4 dráhy, každá pro jinou oligonukleotidovou směs. Díky rozdílné délce vzniklých oligonukleotidů, doputuje každý z nich rozdílně daleko. V současné době existují moderní

přístroje - sekvenátory - ve kterých se využívá dideoxyribonukleotidů, které jsou značeny různými fluorescenčními barvivy (pro každou bázi je jiná barva). Výslednou sekvenci pak přístroj určuje na základě tohoto barevného značení. Existují genové mapy, které jsou vytvořeny na základě výpočtů, vycházejících ze zákonů genové vazby (vzdálenosti v centiMorganech - cM). Existují také fyzické mapy, založené na přesné pozici genu v sekvenci DNA (vzdálenosti v párech bází - pb). Znalost kompletní sekvence genomu je nesmírně užitečná, sama však pro přesnou lokalizaci všech genů nestačí. Velké množství genů (přesněji jejich mutovaných forem) bylo objeveno až jako původci různých dědičných onemocnění. I obecně platí, že nejlépe funkci genu poznáme, když mutací tento gen vyřadíme z funkce. Vzhledem k tomu, že z etických důvodů nelze provádět cílenou mutagenézi a některé další pokusy na člověku, jsou pro další výzkum lidského genomu nedocenitelné výsledky získané u jiných organismů, které jsou potom porovnávány s dosavadními výsledky výzkumu u člověka (komparativní genomika). DNA mají i některé další části buňky - tzv. buněčné organely. Patří mezi ně především mitochondrie, které jsou zodpovědné za látkovou výměnu buňky. Jedná se o tzv. mitochondriální DNA (mDNA), která se na rozdíl od DNA v jádře dědí výhradně v mateřské linii. To lze také pro studium původu různých živočišných druhů (Kočárek, 2008).

Nedávno se spojilo mnoho vědců z celého světa při badatelském projektu jménem "Dog Genome Sequencing Consortium". Vědci si vzali za úkol dešifrovat genom domácího psa sekvenční analýzou DNA. Vědci Broad projektu spolupracují s American Kennel Club (AKC) a mnohými jinými chovatelskými sdruženími. Jednou z důležitých otázek bylo, které zástupce více než 400 plemen do výzkumu zvolit. Muselo se nalézt plemeno, u kterého se předpokládalo, že jeho genetická struktura je obzvláště homogenní a vykazuje pokud možno málo mutací. To mohlo být poměrně "moderní" plemeno, ve vysoké míře vzniklé úzkou příbuzenskou plemenitbou. Po analýze 60 různých plemen padla volba konečně na fenku boxera, jménem Tasha (obr. 9). Ke kontrole bylo navíc vzato víc než 30 dalších plemen, jeden kojot a čtyři různé populace vlků. Dohromady muselo být přečteno 2,41 miliard jednotlivých sekvencí (asi 20000 genů), porovnáno prostřednictvím zvláštního programového vybavení počítače a seřazeno do správného pořadí. Tento projekt byl řízen renomovaným Broad Institute of MIT and Harvard (krátce zvaný "Broad") v Cambridge,

Massachusetts (USA). Počátkem prosince 2005 v časopise “Nature” bylo publikováno první úplné dekódování DNA psa.

Obr. 9: Tasha (převzato z internetu : <http://www.nature.com>).



3. 3. 1 Teorie o původu plemen psa a poslední analýzy DNA

U mnoha psích plemen se usuzuje, že existovala jako taková po velmi dlouhou dobu; tj. po tisíce let (American Kennel Club, 1997). Tento názor pravděpodobně pochází z podobnosti mezi starobylými popisy nebo uměleckými zpodobněními a moderními plemeny. Římané byli pravděpodobně první, kdo vyvíjeli plemena psů, která se dramaticky lišila vzhledem a velikostí, ačkoliv někteří morfologicky divergentní psi byli popsáni již starými Egypťany a v západní Asii před 4000 roky (Clutton-Brock, 1999). Mezi těmito psy byli mastifové a chrti, i když mnoho průzkumů neprokázalo konkrétně u těchto plemen nižší rozdílnost (Morera et al., 2003 Zajc a Sampson, 1999, Iron et al., 2003, Parker et al. , 2004). Podobně, psi, kteří by mohli být spojováni s určitým moderními plemeny, jsou zpodobněni v malbách Petera Paula Rubense nebo Diego Velazqueze během první poloviny 17. století, ale nezdá se, že by byli v rozdílnosti inbredně podporováni nebo omezováni, což svědčí o tom, že asi nebyli od svého vzniku od sebe izolováni. Většina plemen se pravděpodobně nestala od sebe reprodukčně izolovaná do uzavření svých plemenných knih počínaje v polovině 19. století.

Možnou výjimkou k této poslední izolaci plemen však může být několik linií, které mohly být po velmi dlouhou dobu geograficky izolovány. Psi dingo a zpívající psi byli zavedeni do Austrálie a Nové Guiney starověkými cestovateli už před 6000 roky (Corbett 1996) a toto dlouhé období izolace a malé zakládající populace se převedla do omezené genetické diference (Wilton et al., 1999). Podobně, genetická analýza pozůstatků psa z Nového Světa, která se datovala od doby před příchodem Evropanů, potvrdila, že tito psi měli původ

ve Starém Světě, ale vyvíjeli se v izolaci po mnoho tisícilet (Leonard et al., 2002). Důkladné prozkoumání moderních amerických psů odhalilo, že tyto linie byly prakticky vymazány - bez toho, aby zanechaly následnickou populaci (Leonard et al., 2002; Castroviejo-Fisher et al., 2011).

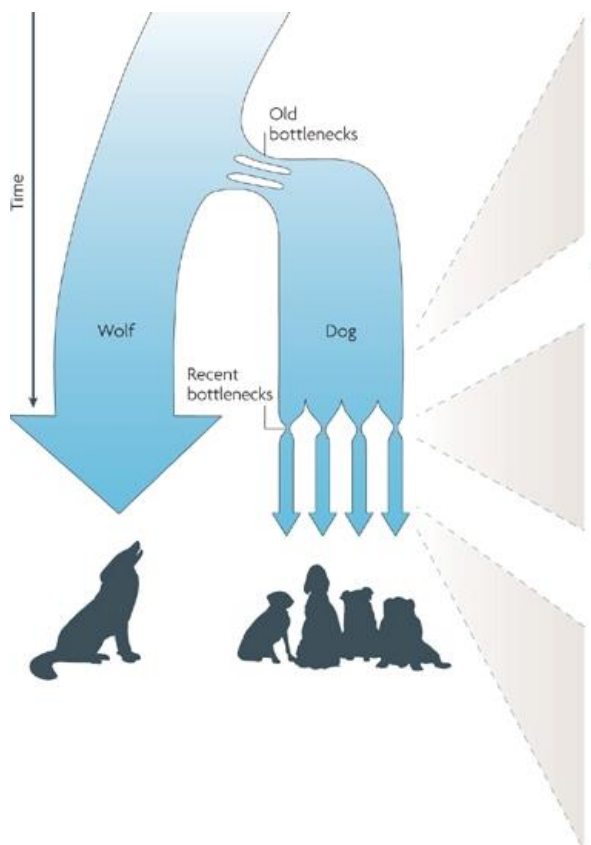
Navzdory jejich současné izolaci vykazují moderní plemena psů sníženou inbridni genetickou rozdílnost a pozoruhodnou diferenciaci navzájem, většinou díky rozdílům alelických frekvencí (např. Pihkanen et al., 1996; Zajc a Sampson, 1999, Iron et al., 2003; Parker et al. 2004). To je v kontrastu s výsledky získanými, když mateřské (mitochondriální DNA) a otcovské (chromozom Y) linie jsou zkoumány u stejných plemen: haplotypy se sdílejí mezi velmi odlišnými plemeny, u nichž se nezdá, že by měly mít mnoho společného (Sundqvist et al., 2006). Tyto výsledky odrážejí nedávný původ mnoha plemen z různých původů zakladatelů, z nichž bylo založení zvoleno (nezávisle na svých mateřských a otcovských liniích, přimíchaných během tisíců let) následovaných dlouhou dobou izolace. Během doby v izolaci vedly vlivy zakladatele, výběr, úzká příbuzenská plemenitba a náhodný genetický drift k uniformizaci plemene a k progresivní diferenciaci od ostatních plemen. Tato uniformita v rámci plemene učinila ze psa velmi cenný modelový organizmus v biomedicině (Sutter a Ostrander, 2004), i když rostoucí selektivní tlaky preferencí chovatelů a majitelů vedou u některých k další fragmentaci (Bjornefeldt et al., 2008).

Porovnání rozdílnosti zjištěné u plemen pro mitochondriální DNA a pro chromozom Y s tou, která byla nalezena u populací divokého vlka, odhaluje také zajímavý vzorec (Sundquist et al., 2006). Existuje silná redukce v rozdílnosti na chromozomu Y u psích plemen v porovnání s populacemi vlka. Protože se očekávalo, že se u populace vlka účastní podobné počty samců a samic, jsou výsledky kompatibilní se silnějším výběrem samců psa a existencí populárních otců. Výběr specifických rysů může být účinnější u samců než u samic, protože jeden samec může být použit jako otec velkého počtu štěňat každý rok. To ukazuje, že utváření plemen představuje hluboký rušivý efekt vzorců páření pozorovaný u populací vlka. Studie také ukázala, že plemena patřící ke stejné funkční skupině, jak je uznává World Canine Organization (Federation Cynologique Internationale), se do tvorby nového plemene zahrnuly pravděpodobněji. Studium expresních profilů v mozku psa (Saetre et al., 2004; Lindberg et al., 2005) a celosvětová porovnání genomů (Cruz et al., 2008) nabízejí okno k pochopení domestikačního procesu. Tyto nástroje v nich umožňují výzkum původu psa a jeho

Pravidlo čistoty chovu (Breed Barrier Rule) hrálo určující roli při stanovení struktury populace moderních psů. Díky tomuto požadavku nemůže žádný pes legitimně „imigrovat“ do čistého plemene a tok genů mezi plemeny je proto téměř zcela ochráněn. Podle tohoto pravidla může každé plemeno pouze udržovat úroveň genetické odlišnosti přenesenou do plemene zvířaty, která ji založila, pouze získáním nové odlišnosti velmi pomalou akumulací mutací v rámci plemene. Se stanovením standardů plemene přichází silný výběr k vytvoření zvířat uniformního vzhledu, která se projevují stejným vzorcem chování. Všichni členové rasy jsou posuzováni shodou se standardem a reprodukční úspěch každého jednotlivého čistokrevného psa je téměř výhradně určen tímto hodnocením. To často vede k nadměrnému užívání „populárních otců“ v rámci plemene; typicky jsou to psi, kteří si vedli velmi dobře v předváděcím kruhu, jsou pak opakovaně vybíráni pro páření. U mnoha plemen dnes je běžná praxe skladovat sperma těchto psů a plodit vrhy i dlouho po smrti těchto psů. Takové zvíře tedy hraje dominantní roli při určování genetické rozmanitosti a frekvencí alel v následných generacích v tomto plemeni. Kromě výše uvedeného mnoho plemen zažilo úpadek nebo změny popularity, což ovlivnilo výslednou strukturu populace. Zkombinujte tyto faktory se světovými událostmi, které změnilly velikost popularity nebo zavedly nová plemena do předchozích neobydlených oblastí, a můžete snadno pochopit mocné síly působící v plemenech změny frekvence alel. Tyto síly vedly k distorzím alel v rámci každého plemene, čímž umožnily, aby genetický drift změnil novou mutaci nebo dříve vzácnou alelu na v tomto plemeni běžnou (Parker et al., 2004).

Studie Broad vědců dále dokazuje, že došlo v průběhu dějin vývoje psa dvakrát k poklesu populace, tzv. "bottleneck" ("hrdlo od láhve"). Jedna taková situace nastala v rané fázi domestikace před asi 9000 generacemi a podruhé při vzniku různých moderních plemen před 50-100 generacemi, tj. asi v 18./19. století. V obou případech bylo k dispozici ještě málo jedinců, takže při rozmnožování muselo často dojít k úzké příbuzenské plemenitbě (obr. 11).

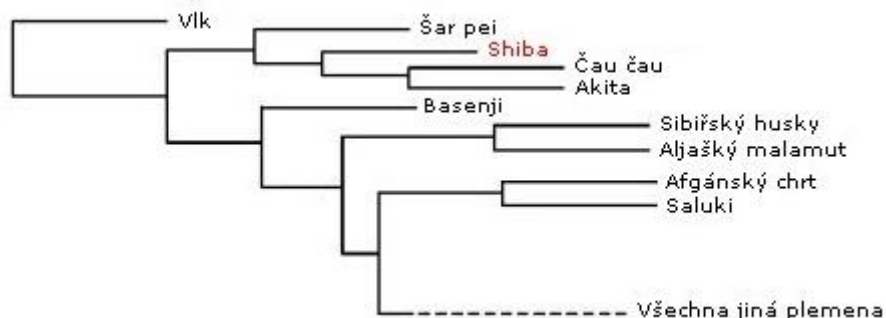
Obr. 11: Schéma vzniku psa z vlka. Jsou vyznačeny bottlenecky na počátku domestikace a při vzniku plemen (převzato z práce Lindblad-Toh et. al. 2005).



Současně s Broad projektem byla provedena další šetření, na kterých spolupracovali též vědci tohoto projektu. V této studii bylo zkoumáno 414 psů z 85 plemen, aby se zjistila genetická příbuznost mezi plemeny a genetická blízkost k vlkovi obecnému (Breen et al., 2004). Vědci zjistili, že se plemena dají rozdělit do čtyř skupin ("clusters"), třech "moderních" a jedné skupiny "starého" plemene. Jen tato "stará" skupina se vyznačuje jasně znatelnou blízkostí k vlku, zatímco všechna plemena "moderních" skupin nehrají v tomto směru žádnou roli.

"Stará" skupina zahrnuje jen 9 plemen. Nejbližší genetickou blízkost k vlku prokazuje v této skupině šarpei, basenji a shiba inu. Na následujícím zobrazení jsou všechny souvislosti graficky znázorněny (obr. 12).

Obr. 12: Fylogenetický strom znázorňující nejstarší plemena “staré” skupiny (převzato z internetu : <http://www.shiba-dog.de>).



Kromě Broad projektu existuje na univerzitě v Cambridge v Anglii projekt jménem IDID (Inherited Diseases In Dogs), ve kterém jsou zaznamenány všechny známé dědičné nemoci včetně odborné literatury (Guyon et al., 2003). Tento projekt je na internetu každému přístupný, podle jmen nemocí nebo plemen se dají cíleně hledat informace.

Další studie používaly podobé sady markerů k adresování příbuznosti plemen. Koskinen (2003) změřil filogenetické vzdálenosti mezi pěti plemeny a zjistil, že byly mnohem větší než srovnatelné vzdálenosti mezi lidskými subpopulacemi. Ve stejné studii byly frekvence mikrosatelitních alel použity ke správnému přiřazení jednotlivých psů jejich patřičnému plemeni, ukazující, že pro každé z pěti plemen existovaly charakteristické vzorce genetických variací. Ačkoliv počet studovaných plemen byl v tomto případě velmi malý, tato data podporovala očekávání, že je značně méně variací v plemenech než mezi nimi. Navíc asi genetická diference mezi plemeny, pokud je měřena s dostatečným rozlišením, by se mohla použít k identifikaci téměř každého člena psích plemen. Tato myšlenka byla testována ve dvojici studií (studie PhyDo), ve kterých bylo porovnáno a klasifikováno molekulárními prostředky až 132 plemen. Tato data se pak použila k přiřazení každého psa do jeho původního plemene. Pomocí analýzy leave-one-out implementované do počítačového programu Doh (Brzustowski, 2002) mohly být psi z těchto 85 plemen korektně přiřazeni své původní populaci v 99 % času. Ve skutečnosti obrovské množství variací pozorovaných u psa spočívá v rozdílech, které plemena oddělují: 27- 30% genetické variance, která existuje u psů, se nachází mezi různými plemeny (Parker, et al., 2004; von Holdt et al., 2010).

V roce 2007 se vyvinula spolupráce k budování databáze genotypů SNP z velkého počtu psů, aby se zhodnotilo složení genomu, vlastnosti map, a dal usoudit původ domestikace a dale vylepšit naše chápání vzájemných vztahů plemen (Parker et al., 2009; Boyko et al., 2010; von Holdt et al., 2010). Více než 900 psů bylo genotypováno při 48000 SNP ze všech 38 autosomů a chromozom X pomocí čipu Alfymetrix v.2 Canine SNP. Aby se zodnotila struktura plemene založená na tomto souboru dat, byly SNP analyzovány jak jednotlivě tak i ve skupinách 5 - 15 SNP, každý pokrývající přibližně 500 kb. Alelám z každého SNP ve skupině byl přiřazen chromozom zdroje a dva výsledné haplotypy porovnané přes plemena a v plemenech k určení stupně sdílení a tím úroveň příbuznosti (von Hodt et al., 2010). Fylogenetická analýza sdílení haplotypů a sdílení alel přes 80 plemen s >80 nepříbuzných jednotlivců na plemeno podporovala původní čtyři shluky plemen, shluky “Starobyli”, “Mastifové”, “Chrti” a “Moderní”.

Poslední a nejnovější studie stojí na porovnání mitochondriální DNA 49 dnešních vlků a 60 psů 14 různých plemen (ze Severní Ameriky, Asie a Evropy) s 18 vzorky fosilních nálezů. Čili vědci přečetli geny fosílií a porovnali je s genomem dnešních vlků a psů. Následně vytvořili rodokmen, který zmapoval jejich vzájemný vztah. Vědci dále rozdělili exempláře s blízkými znaky do čtyř skupin a zjistili, že (tři z nich) jsou více příbuzné s již vymřelými evropskými psovitými šelmami než s vlky z Číny a Východní Asie. Rodokmen tedy přesvědčivě určil Evropu jako stěžejní oblast domestikace psa. A navíc na základě tohoto zjištění a rozdělení se přišlo také na to, že jedna z největších větví sdílela posledního společného předka před 18000 lety a posledního společného vlčího předka před 32000 lety.

V genomu psa jsou další markery, které se mohou rovněž ukázat jako užitečné pro studia populace psa. Pravděpodobně kombinace analýz ze škály typů markerů (mikrosatelity, SNP, CNV a SINE) nakonec poskytnou největší rozlišení pro rozeznání vzájemných vztahů psích plemen. Každý typ markeru má svou vlastní míru mutací a řídí se jiným časovým rámcem mutace a tím nabízí obrázek příbuznosti mezi plemeny v různých časech.

4 Závěr

Psi jsou atraktivní pro genetický výzkum z mnoha důvodů. Žádný další druh savce nevykazuje tak enormní rozsah fenotypových variací jako pes (až 400 plemen na světě). Ačkoliv většina plemen existovala po méně než dvě století, úroveň rozmanitosti u psů je asi dvojnásobná, než se nachází u lidí.

Psi spolužijí se svými majiteli ve stejném prostředí a proto jsou vystaveni stejným environmentálním rizikovým faktorům. Je známo několik set nemocí, které se vyskytují současně u člověka i psa. Výzkum a identifikace genových defektů, které mají člověk a pes společné, byli a jsou vlastním cílem více projektů. Již teď existuje řada tzv. genových map, ve kterých jsou zaznamenány a rozříděny známé geny způsobující u psů onemocnění. K nejčastějším společným onemocněním patří rakovina, epilepsie, alergie, nemoci selhání imunního systému, slepota, hluchota, šedý zákal (katarakt) a srdeční onemocnění. Vedle těchto dědičných nemocí existují také nemoci vyskytující se zřídka a pouze u jednotlivých plemen. Jasná plemenná predispozice je často vidět, což svědčí o tom, že genetické rizikové faktory předurčují určitá plemena k určitým chorobám (např. onemocnění kůže sebaceous adenitis, objevující se nově u akity, dědičná rakovina ledvin jen u německého ovčáka, smrtelná porucha ukládání metabolického produktu gangliosidóza je doposud kromě shiby známa jen u dalších 7 plemen).

Rozšíření dědičných nemocí u psa také napomohla regulace chovu ("standardy"). Cena za množství moderních plemen, které vznikly selektivním chovem, je uchování určitých dědičných vloh, kterými byly dále předány také negativní vlohly a mutace. V extrémním případě se dokonce dědičná chyba povýšila na normu, jako např. Bezsrstnost u naháčů. Výzkum na podkladě dešifrované DNA jistě brzy zveřejní další studie s novými poznatky. Tím udělá diagnóza a terapie velký pokrok a mohly by tak být vypracovány nové chovné programy.

5 Seznam literatury

Anderson, T.M., vonHoldt, B.M., Candille, S.J., Musiani, M., Greco, C., Stahler, D.R., Smith, D.W., Padhukasahasram, B., Randi, E., Leonard, J.A., Bustamante, C.D., Ostrander, E.A., Tang H., Wayne R.K. and Barsh, G.S., 2009. Molecular and evolutionary history of melanism in North American gray wolves. *Science* 323, 1339-1343, DOI 10.1007/s11692/009-9059-6

Bardeleben, C., Moore, R.L. and Wayne, R.K. 2005. A molecular phylogeny of the Canidae based on six nuclear loci. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 37, 815-831. DOI 10.1016/j.ympev.2005.01.019

Björnerfeldt, S., Webster, M.T., Vilà, C. 2006: Relaxation of selective constraint on dog mitochondrial DNA following domestication. *Genome Res* , 16:990–994. DOI 10.1101/gr.5117706

Boyko, A., Boyko, R.H., Boyko, C.M., Parker, H.G., Castelhamo, M., Corey, L., Degenhardt, J.D., Auton, A., Hedimbi, M., Kityo, R., Ostrander, E.A., Schoenebeck, J., Todhunter, R.J., Jones, P., Bustamante, C.D. 2009. Complex population structure in African village dogs and its implications for inferring dog domestication history. *Proc Natl Acad Sci USA*, 106:13903–13908, DOI 10.1073/pnas.0902120206

Castroviejo-Fisher S. Skoglund P., Valadez R., Vila C. and Leonard J.A. (2011) Vanishing native American dog lineages. *BMC Evolutionary Biology* 8, 28. ISBN: 9781845939403

Clutton-Brock J (1999) *A Natural History of Domesticated Mammals*, 2nd edn. Cambridge University Press, Cambridge. ISBN: 9780521634953

Clutton-Brock J: (1995) Origins of the dog: domestication and early history. In: Serpell, J. (ed.) *The Domestic Dog, its Evolution, Behaviour and Interactions with People*. Cambridge University Press, Cambridge, pp 7-20. ISBN: 0521425379

Coppinger, R. and Schneider, R., 1995 *Evolution of working dogs*: In: Serpell *The Domestic Dog; its Evolution, Behaviour and Interactions with People* Cambridge University Press, Cambridge, p. 21-47. ISBN: 9780521425377

Eizirik, E., Murphy, W.J., Koepfli, K-P., Johnson, W.E., Dragoo, J.W., Wayne, R.K. and O'Brien, S.J. 2010. Pattern and timing of diversification of the mammalian order Carnivora

inferred from multiple nuclear gene sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 56, 49-63, DOI 10.1016/j.ympev.2010.01.33

Ferrell, R.E., Morizot, D.C., Horn, J. and Carley, C.J. 1978. Biochemical markers in species endangered by introgression: the red wolf. *Biochemical Genetics* 18, 39-49, DOI 10.1007/bf00504358

Flynn, J.M. and Galiano, H., 1982. Phylogeny of early Tertiary Carnivora, with a description of a new species of Proticits from the middle Eocene of northwestern Wyoming. *American Museum Novitates* 2632, 1-16. ISSN 0003-0082

Garcia-Moreno, J., Matocq, M.D., Roy, M.S., Geffen, E. and Wayne, R.K., 1996. Relationship and genetic purity of the endangered Mexican wolf based on analysis of microsatellite loci. *Conservation Biology* 10, 376-389, DOI 10.1046/j.1523.1739.1996.100203.76x

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. *J Archaeol Sci*, 36:473–490, DOI 10.1016/j.jas.2008.09.033

Gottelli, D., Silero-Zubiri C., Applebaum, G.D., Roy, M.S., Girman D.J., Garcia-Moreno J, Ostrander EA and Wayne RK 1994 Molecular genetics of the most endangered canid: the Ethiopian wolf, *Canis simensis*. *Molecular Ecology* 3, 301-312. DOI 10.1111/y.1365.294x.1994.tb00070.x

Gray, M.M., Sutter, N.B., Ostrander, E.A, Wayne, R.K. *BMC Biol* 2010, The IGF1small dog haplotype is derived from Middle Eastern grey wolves 8:16, DOI: 10.1186/1741-7007-8-16

Gray. A.P. 1954. *Mammalian Hybrids: A Check-list with Bibliography*, Commonwealth Agricultural Bureaux, Farnham Royal, UK, ISBN 9780851961703

Irion, D.N., Schaffer, A.L., Famula, T.R., Eggleston, M.L., Hughes, S.S., and Pedersen, N.C. 2003. Analysis of genetic variation in 28 dog breed populations with 100 microsatellite markers. *Journal of Heredity*, 94, 81-87. DOI 10.1093/jhered/esg004

Lindblad-Toh, K., Wade, C.M., Mikkelsen, T.S., Karlsson, E.K., Jaffe, D.B., Kamal, M., Chang J.L., Kulbokas, E.J., Zody, M.C., Mauceli, E., Xie, X., Breen, M., Wayne, R.K., Ostrander, E.A., Ponting, C.P., Galibert, F., Smith, Dr, De Jong. P.J., Kirkness, E., Alvarez, P., Biagi, T., Brockman, W., Butler, J0 , Cook 7A, Daly MJ, De Caprio D, Gnerre S et al. 2005. Genom sequence, comparative analysis and haplotype structure of the domestic dog, *Nature* 438: 803-819.

Kočárek Eduard, *Genetika*, 2. vydání, Praha: Scientia, 2004. 211s. ISBN 80-7183-326-6

Leonard, J.A., Wayne, R.K. Wheeler, J., Valadez, R., Guillen, S., and Vila, C. (2002). Ancient DNA evidence for Old World origin of New World Dogs. *Science*, 298,1613-1616. DOI 10.1125/science.1076980.

Lindberg J., Bjornerfeldt S., Saetre P., Svartberg K., Seehuus B., Bakken M., Vila C. and Jazin E. (2005) Selection for tameness has changed brain gene expression in silver foxes *Current biology* 15, R915-R916, DOI 10.1186/1744-9081-3-18

Losey, R.J., Bazaliiskii, V.I., Garvie-Lok, S., Germonpre, M., Leonard, J.A., Allen, A.L., Katzenberg, M.A., and Sablin, M.V., (2011) Canids as persons: Early Neolithic dog and wolf burials, Cis-Baikal, Siberia, *Journal of Anthropological Archaeology* 30, 174-189, DOI 10.1016/j.jaa2011.01.001

Morera, L., Barba, C.J., Garrido, J.J., Barbancho, M. and de Andres, D.F. (1999) Genetic variation detected by microsatellites in five Spanish breeds *Journal of Heredity* 90, 654-656, DOI 10.1093/jhered/90.6.654

Muñoz-Fuentes, V., Darimont, C.T., Paquet, P.C. and Leonard, J.A: 2010. The genetic legacy of extirpation and recolonization in Vancouver Island wolves. *Conservation Genetics* 11, 547-656. DOI 10.1007/s10592-009-9974-1

Nobis, G. 1979. Der älteste Haushund lebte vor 14,000 Jahren. *Umschau* 19, 610.

Okumura, N., Ishiguro, N., Nakano, M., Matsui, A. and Sahara, M. 1997. Intra- and interbreed genetic variations of mitochondrial DNA major non-coding regions in Japanese native dog breeds (*Canis familiaris*) *Animal Genetics* 27, 397-405. DOI 10.1111/j1365-2052.1996tb00506.x

- Olsen, S.J. 1985 Origin of Domestic Dogs, University of Arizona Press, Tucson, Arizona 118 pp, ISBN 9780816509096
- Pang, J.F., Kluetsch, C., Zou, X.J., Zhang, A.B., Luo, L.Y., Angleby, H., Ardalan, A., Ekström, C., Sköllermo, A., Lundeberg, J., Matsumura, S., Leitner, T., Zhang, Y.P., Savolainen, P.:mtDNA data indicate a single origin for dogs south of the Yangtze River, less than 16,300 years ago, from numerous wolves. *Mol Biol Evol* 2009, 26:2849–2864. DOI 10.1093/molbev/msp195
- Parker, HG., Kim, L.V., Sutter, NB., Carlsson, S., Lorentzen, T.D., Malek, T.B.C., Johnson, G.S., DeFrance, H.B., Ostrander, E.A., Kruglyak, L. 2004 Genetic structure of the purebred domestic dog . *Science* 304: 1160-1164. DOI 10.1126/science.1074806
- Pihkanen, S., Vainola, R. and Varvio, S. (1996) Characterizing dog breed differentiation with microsatellite markers *Animal Genetics* 27, 343-346.
- Randi., E., Lucchini, V., Christensen, M.F., Mucci, N., Funk, S.M., Dolf, G. and Loeschcke, V. 2000. Mitochondrial DNA variability in Italian and East European wolves detecting the consequences of small population size and hybridization *Conservation Biology* 14, 464-473. DOI 10.1066.1523.17.39.2000.982808
- Rueness, E.K., Asmyhr, M.G., Sillero-Zubiri C., Macdonald. Dw.W., Bekele, A., Atickem, A. and Stenseth, N.C. 2011 The cryptic African wolf: *Canis Aureus lupaster* is not a golden jackal and is not endemic to Egypt., *PloS ONE* 6, e 16385
- Sablin, M.V. and Khlopachev, A.A. 2002. The earliest Ice Age dogs: evidence from Eliseevichi I, *AKT anthropol*,43:795-799. DOI 10.1086/344372.
- Saetre, P., Lindberg, J., Leonard, J.A. 2004. From wild to domestic dog: gene expression changes in the brain. wolf *Molecular Brain Research*, 126,198-206. DOI: 10.1155/2013/841734
- Savolainen, P., Zhang, Y-p., Luo, J., Lundeberg, J. Litner, T. 2002: Genetic evidence for an east Asian origin of domestic dogs. *Science*, 298, 1610-1613 *Science* 298:1610-1613. Doi 10.1120/science.1073906

Šebková, N., I.kapitola-Fylogenetický původ psa, předkové a příbuzní. Fauna [online]. 2010 [cit. 2010-07-08]. Dostupné z <<http://www.ifauna.cz/psi/clanky/r/detail/5355>>.

Sundqvist, A.K., Björnerfeldt, S., Leonard, J.A. 2006. Unequal contribution of sexes in the origin of dog breeds. *Genetics*, 172, 1121-1128.

Sutter, N.B., Eberle, M.A., Parker, H.G., Pullar, B.J., Kirkness, E.F., Kruglyak, L., Ostrander, E.A.: Extensive and breed-specific linkage disequilibrium in *Canis familiaris*. *Genome Res* 2004, 14:2388–2396. DOI 10.1101/gr.3147604

Tedford, R.H., Wang, X. and Taylor, B.E. 2009. Phylogenetic systematics of the North American fossil Caninae (Carnivora: Canidae). *Bulletin of American Museum of Natural History* 325, 1-218. ISBN 9781845939410.

Vila, C. and Wayne, R.K. 1999 Wolf-dog hybridization. *Conservation Biology* 13, 195-198.

Vila, C., Maldonado, J., Amorim, I.R., Wayne, R.K., Crandall, K.A. and Honeycutt, R.I. 1997b) Man and his dog – Reply. *Science* 27.8, 206-207. C, Savolainen P, Maldonado JE, Amorim IR, Rice JE, Honeycutt RL, Crandall KA, Lundeberg J and Wayne RK (1997a) Multiple and ancient origins of the domestic dog *Science*, 276:1687-1689, DOI 10.1126/science.276.5319.1687

vonHoldt, B.M., Pollinger, J.P., Lohmueller, K.E., Han, E., Parker, H.G., Quignon, P., Degenhardt, J.D., Boyko, A.R., Earl, D.A., Auton, A., Reynolds, A., Bryc, K., Brisbin, A., Knowles, J.C., Mosher, D.S., Spady, T.C., Elkahoulou, A., Geffen, E., Pilot, M., Jedrzejewski, W., Greco, C., Randi, E., Bannasch, D., Wilton, A., Shearman, J., Musiani, M., Cargill, M., Jones, P.G., Qian, Z., Huang, W.: Genome-wide SNP and haplotype analyses reveal a rich history underlying dog domestication. *Nature* 2010, 464:898–902. DOI 10.1038/nature08837

Wang, X. 1994. Phylogenetic systematics of the Hesperocyoninae (Carnivora: Canidae). *Bulletin of the American Museum. of Natural History*, 221,1-207.

Wang, X., Tedford, R.H. and Taylor, B.E. 1999, Phylogenetic systematics of the Borophaginae (Carnivora: Canidae). *Bulletin of the American Museum of Natural History*, 243, 1-391. ISSN 0003-0090.

- Wayne, R.K., Geffen, E., Ginnan, D.J., Koepfli, K.P., Lau, L.M. and Marshall, C. 1997. Molecular systematics of Canidae. *Systematic Biology* 4, 622-653. DOI 10.1093/sysbio/4616622.
- Wayne, R.K., Lehman, N., Allard, M.W. and Honeycutt, R.L. 1992. Mitochondrial DNA variability of the gray wolf: genetic consequences of population decline and habitat fragmentation. *Conservation Biology* 6, 559-569. DOI 10.1046/j.1523.1719.1992.0640559.x
- Wayne, R.K. 1986a Cranial morphology of domestic and wild canids: the influence of development on morphological change. *Evolution*. 4, 243-261. DOI: 10.2307/2408805.
- Wayne, R.K. and O'Brien, S.J., 1987 Allozyme divergence within the Canidae. *Systematic Zoology*. 36, 339-355. DOI 10.2307/2413399.
- Wilson, Don E. and DeeAnn Reeder, M. *Species of the World: A Taxonomic and Geographic Reference*: The Johns Hopkins University Press, 2005. ISBN 0-8018-8221-4
- Wilson, D.E. and Mittermeier, R.A. 2009. *Handbook of the Mammals of the World. Carnivores*. Lynx Editionss, Barcelona, Spain. ISBN: 9788496553491
- Wilton, A.N., Steward, D.J. and Zafiris, K. 1999) Microsatellite variation in the Australian dingo. *Journal of Heredity* 90, 108-111. DOI 10.1093/jhered/90.1.108.
- Wurster-Hill, D.H. and Centerwall, W.R. 1982 The interrelationships of chromosome banding patterns in canids, mustelids, hyena and felids. *Cytogenetics and Cell Genetics* 34, 178-192. ISSN: 1424-8581, DOI 10.1159.000131-806.
- Zajc, L. and Sampson, J. 1999 Utility of canine microsatellites in revealing the relationships of pure bred dogs. *Journal of Heredity*. 90, 104-107. DOI 10.1093/jhered/90.1.104.
- Zeder, M.E., Emshwiller, E., Smith, B. and Bradley, D.G. (2006) Documenting domestication: the intersection of genetics and archaeology. *Trends in Genetics* 22, 139-155. DOI 10.1016/j.bg.2006.01.007.