

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra genetiky a šlechtění



Genetická variabilita psích plemen odvozených od vlka

Diplomová práce

Autor práce: Bc. Radka Štikarová

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

© 2016 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 10.4.2016

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala řadě lidí, kteří se různou měrou podíleli na vypracování této práce. 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 rady při zpracování mnoha molekulárních analýz a korektorskou činnost. Dále bych chtěla poděkovat dalším členům Katedry genetiky a šlechtění České zemědělské univerzity v Praze za pomoc a rady při zpracování této práce.

Také bych chtěla poděkovat všem chovatelům, kteří mi poskytli genetický materiál a dodatečné informace o svých psech, které byly použity pro analýzy.

Dále bych chtěla poděkovat vedoucím, chovatelům a ošetřovatelům zvířat ze Zoologických zahrad v Brně, Chomutově, Hluboké nad Vltavou, Olomouci a Bydgoszczi díky kterým bylo možné získat vzorky pro izolaci genetického materiálu od vlků. A v neposlední řadě Dr. Enikő Kubinyi z Eötvös Loránd University v Budapešti za poskytnutí vzorků od vlků, bez kterých by tato práce nemohla být uskutečněná.

Genetická variabilita psích plemen odvozených od vlka

Souhrn

Pes domácí je nedílnou součástí životů mnoha lidí, díky člověku byl rozšířen po celém světě a změněn do podoby více než 300 odlišných plemen, což svědčí o ohromné genetické variabilitě psa. Díky tomu, že lze poměrně snadno a rychle změnit fenotyp psa, je na základě pozorování velmi těžké uvěřit jeho vzniku ze společného vlčího předka u tak odlišných plemen jako je čivava, anglický buldog nebo irský vlkodav.

Tuto genetickou variabilitu jsem zkoumala pomocí mikrosatelitních markerů u 192 vzorků vybraných plemen psů a vlků, z čehož patřilo 96 jedinců k plemeni československý vlčák, 30 k plemeni saarloosův vlčák, 36 k plemeni německý ovčák a jako kontrolní skupina bylo zařazeno 30 vzorků vlka euroasijského.

Mikrosatelity jsou využívány jako klasické genetické markery sestávající z 10 - 100 bází tvořených opakujícím se motivem o délce 1-6 bází. Vybrané genotypy byly testovány prostřednictvím multiplex PCR s využitím devíti mikrosatelitních markerů (FH3210, FH3241, FH2004, FH2658, FH4012, REN241L11, FH2020, FH2361, C38) dle Asch et al. (2009).

Prostřednictvím kapilární elektroforézy bylo identifikováno 108 alel, z toho se u 56 alel podařilo pomocí sekvenování získat informace o struktuře motivu a celkové délce tandemové repetice. Statistická analýza STR markerů ukázala, že mezi 3 vybranými psími plemeny a vlky není statisticky významný rozdíl v počtu alel na lokus či genetické diversitě vyjádřené v podobě heterozygotnosti a polymorfního informačního indexu. Rovněž bylo zjištěno, že mezi vlky a psími plemeny je středně velká míra genetické diferenciaci způsobené genetickým driftem ($F_{ST} = 0,169$, $p = 0,000$). Pomocí vícerozměrných statistických metod a metod založených na bayesovské analýze se podařilo identifikovat 4 výrazně odlišné skupiny, které odpovídají jednotlivým psím plemenům, a zároveň se podařilo rozdělit vlky dle lokalit původu.

Zjištěné poznatky ukazují na překvapivě vysokou rozlišovací sílu tohoto mikrosatelitního systému, což bylo potvrzeno nejen schopností zařadit prakticky každého jedince do správné skupiny skoro se 100% spolehlivostí, ale rovněž identifikací kříženců F1 a F2 generace mezi německým ovčákem a kanadským vlkem.

Klíčová slova: *Canis lupus*, *Canis familiaris*, STR, hybridizace, populační analýza

Genetic variability of wolf's like dog breeds

Summary

The domestic dog (*Canis lupus familiaris*) is an integral part of the lives of many people. Because of man, dogs were spread throughout the world and changed into more than 300 distinct breeds, which demonstrates their enormous genetic variability. Thanks to relatively easy and quick change of dog's phenotype, based solely on the observation, it is hard to believe that such different breeds as Chihuahua, English Bulldog and Irish Wolfhound have a common ancestor, the wolf.

This genetic variability was studied by microsatellite markers in 192 samples of selected breeds of dogs and wolves. Samples belonged to 96 Czechoslovakian wolfdog individuals, 30 to Saarloos wolfdog, 36 to German shepherd and as a control group 30 samples Eurasian wolf were used.

Microsatellites are used as classical genetic markers. They are consisting of 10-100 bases and/or of the repeating motif length of 1-6 bases. Selected genotypes were tested via multiplex PCR using nine microsatellite markers (FH3210, FH3241, FH2004, FH2658, FH4012, REN241L11, FH2020, FH2361, C38) according to Asch et al. (2009).

By capillary electrophoresis 108 alleles were identified. Information about the structure of the motif and the overall length of a tandem repeat were obtained from 56 of them using sequencing. Statistical analysis of STRs markers showed that there are no statistically significant differences among three selected dog breeds and wolves in the number of alleles per locus, genetic diversity expressed in the form of heterozygosity and polymorphic information index. It was also found that between wolves and dog breeds is a medium degree of genetic differentiation due to genetic drift ($F_{ST} = 0.169$, $p = 0.000$). Using multivariate statistical methods and methods based on Bayesian analysis, four distinctly different groups that correspond to each dog breeds were identified. Also wolves were split into groups in accordance to with sites of origin.

These findings indicate a surprisingly high resolving power of this microsatellite system. It was confirmed not only by the ability to assign all individual into the right group with almost 100% reliability, but also by the identification of F1 and F2 hybrids between a German Shepherd and a Canadian wolf.

Keywords: *Canis lupus*, *Canis familiaris*, STR, hybridisation, population analysis

Obsah

1	Úvod.....	11
2	Cíle práce.....	12
2.1	Vědecká hypotéza	12
2.2	Cíle práce	12
3	Literární rešerše	13
3.1	<i>Canidae (psovití)</i>	13
3.1.1	Taxonomické zařazení psa domácího	13
3.1.2	Obecná charakteristika psovitých	15
3.2	<i>Struktura a organizace psího genomu</i>	16
3.2.1	Cytologická charakteristika.....	16
3.2.2	Mapování psího genomu.....	17
3.3	<i>Mikrosatelity</i>	19
3.3.1	Klasifikace a zařazení satelitní DNA	19
3.4	<i>Mikrosatelitní DNA</i>	20
3.4.1	Rozdělení mikrosatelitní DNA.....	21
3.4.2	Mutační mechanismy mikrosatelitů.....	22
3.5	<i>Molekulárně-genetické metody</i>	23
3.5.1	Polymerázová řetězová reakce (PCR).....	23
3.5.1.1	Multiplex PCR	28
3.5.2	Elektroforéza	29
3.5.2.1	Kapilární elektroforéza	30
3.5.3	Chyby ovlivňující PCR a genotypování.....	31
3.5.3.1	Inhibitory PCR.....	31
3.5.3.2	Nulová alela	31
3.5.3.3	Netemplátové přidání nukleotidů a koxtavé produkty	32
4	Metodika.....	33
4.1	<i>Bioinformatická analýza dat</i>	33
4.1.1	Mikrosatelitní markery	33
4.1.2	Nové primery	33
4.2	<i>Vzorky a izolace</i>	34
4.3	<i>Polymerázová řetězová reakce (PCR)</i>	36
4.3.1	Multiplex PCR	36
4.3.2	Optimalizace primerů.....	36
4.4	<i>Elektroforéza</i>	36
4.4.1	Agarozová elektroforéza	36
4.4.2	Polyakrylamidová elektroforéza	37
4.4.3	Kapilární elektroforéza	37
4.5	<i>Sekvenování</i>	38
4.5.1	Příprava a purifikace před sekvenací	39

4.6	<i>Statistická analýza</i>	40
5	Výsledky	42
5.1	<i>Optimalizace genotypovacího procesu</i>	42
5.1.1	Sekvenační primery	42
5.1.2	Agarózová elektroforéza	42
5.1.3	Kapilární elektroforéza	43
5.2	<i>Sekvenování</i>	44
5.2.1.1	Lokus FH3210	44
5.2.1.2	Lokus FH3241	46
5.2.1.3	Lokus FH2004	47
5.2.1.4	Lokus FH2658	47
5.2.1.5	Lokus FH4012	48
5.2.1.6	Lokus REN214L11	48
5.2.1.7	Lokus FH2010	49
5.2.1.8	Lokus FH2361	50
5.2.1.9	Lokus C38	51
5.3	<i>Charakterizace psích plemen a vlků populačními deskriptory</i>	52
5.3.1	Intrapopulační variabilita	52
5.3.2	Interpopulační variabilita	59
5.4	<i>Studium populační struktury vybraných psích plemen a vlků</i>	60
6	Diskuze	65
6.1	<i>Optimalizace SSR markerů</i>	65
6.2	<i>Sekvenování SSR alel</i>	66
6.3	<i>Hodnocení genetické diverzity</i>	67
6.4	<i>Populační struktura</i>	68
6.5	<i>Využitelnost mikrosatelitního systému dle Asch et al. (2009)</i>	69
7	Literatura	72
8	Seznam použitých zkratk	81
9	Přílohy	83
9.1	<i>Výsledky sekvenace exportované z programu VariantReporter (pro všechny lokusy)</i>	83

Seznam obrázků

Obr. 1	Fylogenetický strom psovitých.	14
Obr. 2	Anatomické specifity psovitých.	16
Obr. 3	Karyotyp psa domácího.	17
Obr. 4	Struktura opakujících se elementů DNA.	20
Obr. 5	Replikační sklouznutí.....	23
Obr. 6	Proces amplifikace pomocí polymerázové řetězové reakce.....	24
Obr. 7	Teplotní profil PCR.....	25
Obr. 8	Termocycler C1000 (Bio-Rad).....	26
Obr. 9	Amplifikace multiplex PCR lokusů.	28
Obr. 10	Agarosová elektroforéza.....	29
Obr. 11	Schematický popis kapilární elektroforézy.....	30
Obr. 12	Koktavé produkty	32
Obr. 13	Navrhování primeru v Primer-BLAST.....	34
Obr. 14	Kapilární elektroforéza.	38
Obr. 15	Agarózová elektroforéza	43
Obr. 16	Záznam alel a jejich intenzit signálu v multiplexu.	43
Obr. 17	Ukázka binovacího systému.....	44
Obr. 18	Krabicové grafy doplněné o výsledek analýzy Kruskal-Wallisovy ANOVy	58
Obr. 19	Odhad počtu genetických skupin K na základě průměrné hodnoty $\ln(P)D$ (a) a síly strukturního signálu dle ΔK (b) pro $K = 1-6$	62
Obr. 20	Graf komponentního skóre (PCA): a) projekce PC3-PC2, b) projekce PC2-PC1, c) projekce PC3-PC1, d) 3D projekce komponent (PC1-3)	63
Obr. 21	Výsledky CLU analýzy v podobě dendrogramu (a) doplněné o strukturní sloupcový graf programu STRUCTURE (b)	64
Obr. 22	Lokus: FH3210	83
Obr. 23	Lokus: FH3241	84
Obr. 24	Lokus: FH2004 a FH2658	85
Obr. 25	Lokus: FH4012, REN214L11, FH2010	86
Obr. 26	Lokus: FH2361	87
Obr. 27	Lokus: C38	88

Seznam tabulek

Tab. 1 Porovnání velikostí chromozomů.	18
Tab. 2 Charakteristika využitých STR markerů.....	33
Tab. 3 Genotypy použité pro testování	35
Tab. 4 Primery navržené pro sekvenování.....	42
Tab. 5 Lokus FH3210	45
Tab. 6 Lokus FH3241	46
Tab. 7 Lokus FH2004	47
Tab. 8 Lokus FH2658	47
Tab. 9 Lokus FH4012	48
Tab. 10 Lokus REN214L11	48
Tab. 11 Lokus FH2010	49
Tab. 12 Lokus FH2361	50
Tab. 13 Lokus C38	51
Tab. 14 Souhrné výsledky pro vybrané populační parametry.....	52
Tab. 15 Vybrané výsledky pro československé vlčáky.....	53
Tab. 16 Vybrané výsledky pro německé ovčáky	54
Tab. 17 Vybrané výsledky pro Saarloosovy vlčáky.....	55
Tab. 18 Vybrané výsledky výsledků pro vlky	56
Tab. 19 Výsledné hodnoty F_{ST} na základě párového srovnání	59
Tab. 20 Hodnoty CC a delta pro vybrané CLU metody	61

1 Úvod

Pes je jedním z prvních domestikovaných zvířat a doprovází člověka již od počátku vzniku lidských společenstev. V průběhu času byl pes člověkem využíván k mnoha činnostem, jako je lov nebo ochrana majetku a lidí. Stále více se stával nepostradatelnou součástí lidských životů a postupem času si jej člověk začal přetvářet „k obrazu svému“. To mělo za následek nejen změnu jejich vzhledu, ale například i vliv na zdravotní stav psů. S rozvojem moderních molekulárně genetických metod se pes díky své fyziologii podobné fyziologii lidí stal hojně využívaným modelem v mnoha oblastech biologického výzkumu např. v genetice chorob, při studiu procesů domestikace nebo hledání genů ovlivňující anatomicko-morfologické znaky. Zároveň s tím rostl zájem o prozkoumání evolučního vývoje psa a studium genetické diversity psích plemen sloužící například k zařazení daného jedince k příslušnému plemeni čistě na základě DNA analýzy.

Jedním z typů markerů využívaných pro tyto a další účely, jako je například studium genomu či určení paternity, jsou mikrosatelity. S ohledem na biologickou podstatu mikrosatelitů a jejich vysokou variabilitu, jsou rovněž velmi vhodným markerem pro populační studie.

Pro studium genetické variability psů odvozených od vlka pomocí mikrosatelitní DNA byla vybrána taková plemena, která byla vytvořena křížením psů plemene německého ovčáka a vlků. Takováto plemena skýtají příležitost výzkumu introgrese, změn v expresi rozličných genů vlivem hybridizace či řešení problematiky identifikace hybridů v přírodních populacích, což má význam například z ekologického hlediska.

2 Cíle práce

2.1 Vědecká hypotéza

Během procesu tvorby nového psího plemene dochází k výrazné redukci počtu jedinců, kteří tvoří zakladatelskou populaci. Důvodem je upevnění požadovaných charakteristických znaků pro dané plemeno. V důsledku toho prochází takováto populace „hrdlem lahve“ (bottleneck), což se projeví razantním snížením genetické variability a zesílením efektu genetického driftu. Výsledkem je fixace celé řady alel, které jsou pak unikátní pro příslušné plemeno. Proto byla stanovena hypotéza, že populace různých psích plemen by se měly odlišovat ve frekvencích a typech detekovaných alel vybraných lokusů.

2.2 Cíle práce

K ověření výše uvedené vědecké hypotézy byly stanoveny dílčí cíle práce, které jsou uvedeny v následujících bodech:

- 1) Vybrat a optimalizovat vhodné molekulární markery pro analýzu genomu psích plemen a vlka.
- 2) Provést sekvenaci nalezených alel, která umožní porovnání výsledků různých laboratoří.
- 3) Charakterizovat vybraná psí plemena a kontrolní skupinu vlků pomocí základních populačních deskriptorů jakými je genetická diverzita v podobě heterozygotnosti očekávané a pozorované, polymorfní informační index nebo inbrední koeficienty.
- 4) Provést analýzu populační struktury psích plemen a vlků.

3 Literární rešerše

3.1 *Canidae* (psovití)

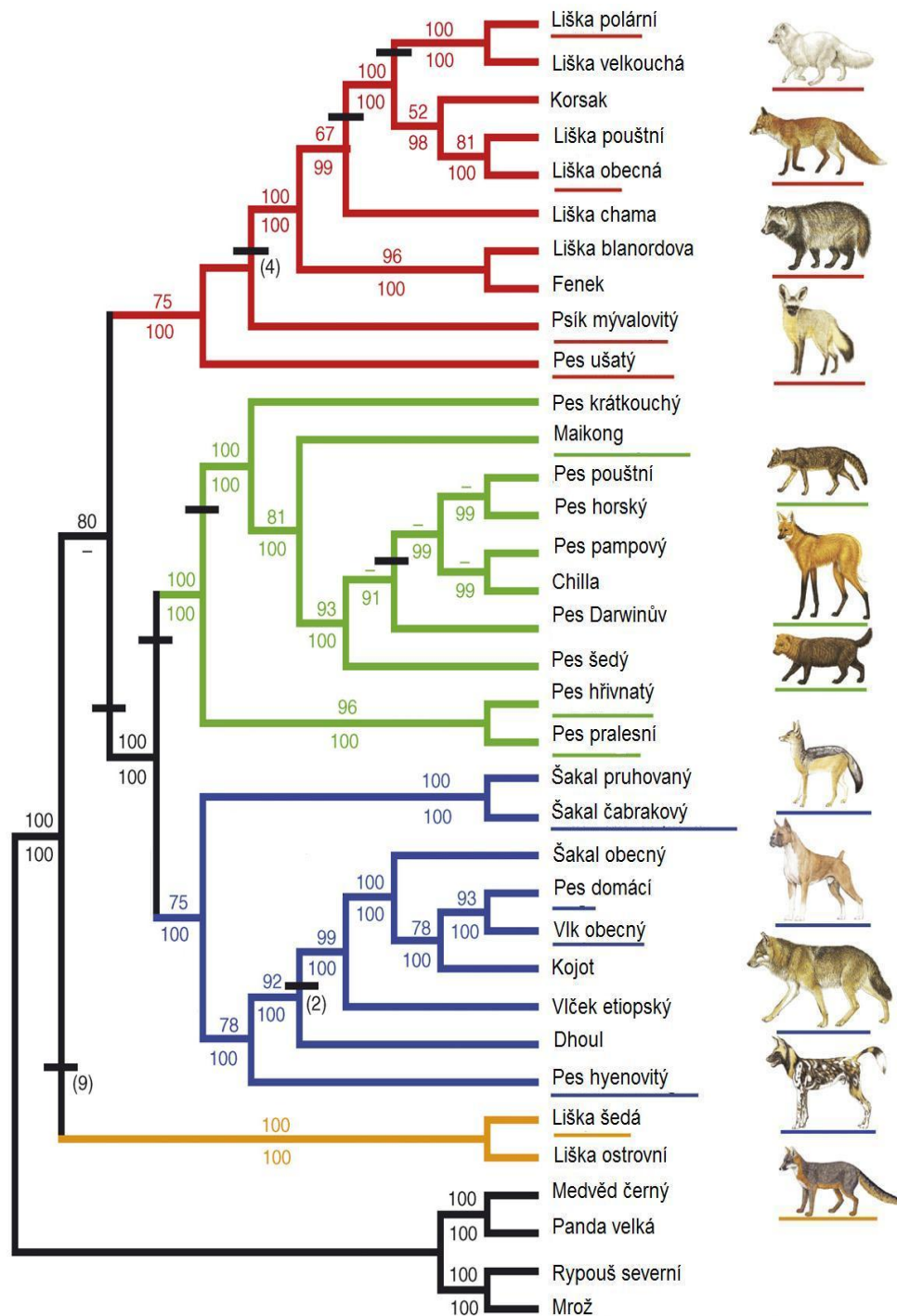
3.1.1 Taxonomické zařazení psa domácího

Wayne et al. (1999) prokázal, že pes domácí se vyvinul z vlka obecného. Jeho poznatky potvrzují i další studie (Wayne a Ostrander, 2007; Wang et al., 2004), nicméně nepanuje shoda v období, kdy se pes a vlk evolučně rozdělili, a v jaké geografické oblasti k domestikaci psa došlo.

Dle fosilních nálezů Freedman et al. (2014) určili období domestikace na 12 000 - 33 000 let před naším letopočtem, přičemž místo těchto nálezů se nachází na území Euroasie. Tyto poznatky podporuje i Germonpré et al. (2009), který studoval fosilní nálezy domestikovaných psů na území Západní Evropy a Sibiře a datoval je do období před 15 000 - 36 000 lety.

Pomocí studií mitochondriální DNA (mtDNA) Leonard et al. (2002) určili období domestikace před 15 000 lety na území Euroasie. Toto časové rozmezí je v souladu s výsledky studie Vilá et al. (1997), kteří analyzovali mtDNA 162 vlků a 140 domestikovaných psů. Výsledky této studie určují období rozdělení vývoje psů a vlků na rozmezí 10 000 - 15 000 let před naším letopočtem.

Fylogenetický vývoj psovitých šelem je spojen s nejstarším známým předkem *Hesperocynoinae*, který žil před 40 miliony let v Severní Americe (Tredford et al., 2009) a vyhynul před 15 miliony lety. Z něho se vyvinuly podčeledi *Borophaginae* a *Caninae* na začátku oligocénu před 25 miliony let. Wilson et al. (2000) uvádí, že *Borophaginae* žili v období od 28 miliony let do 2 milionu let, kdy vymřeli. Za své dlouhé existence byla tato skupina dominantní nad *Caninae*. Po jejím zániku se stali *Caninae* jedinými zástupci psovitých šelem a ti se poté dělili do mnoha fylogenetických skupin (obr. 1) (Wayne a Ostrander, 2007).



Obr. 1 Fylogenetický strom psovitých.

Molekulární fylogenetický strom byl vytvořen na základě sekvenace 12 exonů a 4 intronů o celkové délce 14 948 bp DNA. Jednotlivé barevné větve ukazují rozdělení psovitých na linie. Hlavními fylogenetickými liniemi jsou liškovití (červeně), jihoameričtí (zeleně) a vlčí (modře). Černé značky naznačují výskyt tzv. indels (inzerce a delece), ke kterým se vztahují hodnoty v závorkách uvádějící jejich množství. Podtržení zástupci jsou pro ukázkou obrazově znázorněni. Pro procentuální odhad posteriorní pravděpodobnosti větvení fylogenetického stromu byly využity dva modely. Jejich výsledky jsou zaznamenány na linii větve. Hodnota pomocí Bootstrap pravděpodobnosti je umístěna nad linií a Bayesovská pod linií (převzato Wayne a Ostrander, 2007).

První doklady o *Caninae* byly nalezeny na území Severní Ameriky datované do období oligocénu. Pro vývoj a diverzitu psovitých bylo důležitých několik migračních vln. V první migrační vlně na konci miocénu, jak uvádí Wang a Tareford (2007), *Caninae* ze Severní Ameriky přešli do Asie a pokračovali do Evropy. Na starém kontinentu se tyto psovité vyvinuly do podoby již připomínající dnešní vlky. Jedinci ze skupiny, která nemigrovala, dali základ pro vývoj kojota prérijního (*Canis latrans*). Toto potvrdili Vilá et al. (1997), kteří analyzovali mtDNA vlka obecného a kojota.

K druhé velké migrační vlně došlo v pleistocénu (Wilson et al., 2000). V tomto období začali být psovité dominantními predátory. V průběhu této migrace se rozšířili do Afriky, Jižní Asie, zpět do Severní Ameriky a dále přes Střední Ameriku do Jižní Ameriky. To podpořilo diferenciaci všech rodů a někteří jejich zástupci uskutečnili poslední migraci přibližně před 100 000 lety za polární kruh (Jensen, 2007). Takto se psovité dokázali rozšířit takřka na všechny kontinenty a na zbylé se rozšířili později při společné migraci s lidmi (Leonard et al., 2002).

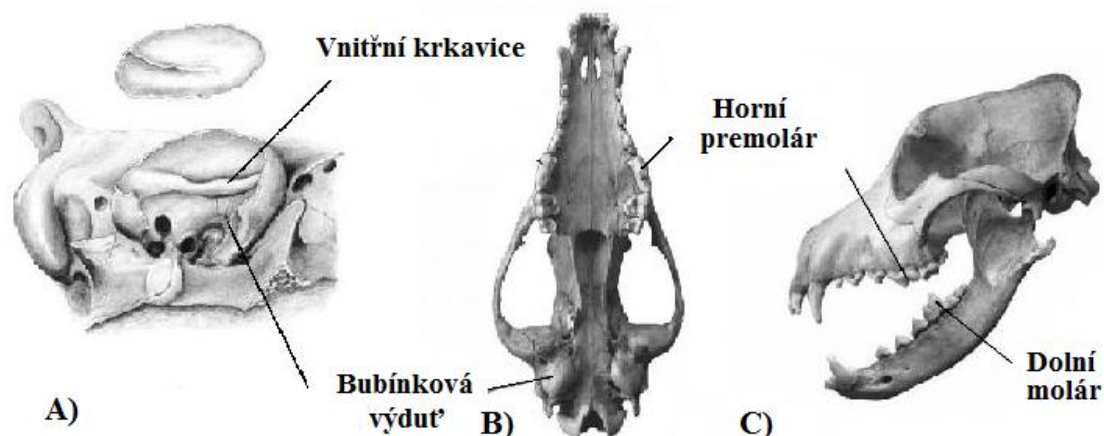
3.1.2 Obecná charakteristika psovitých

Jak už bylo výše uvedeno, psovité šelmy mají společný vývoj, což potvrzují nejen genetické analýzy, ale i shodné anatomické znaky. Wang et al. (2010) popisují společné znaky psovitých šelem jako je uspořádání zubů, změny anatomie středního ucha a postavení končetin.

Evoluční adaptací společnou pro všechny psovité šelmy jsou změny ve středním uchu. Tím je plně osifikovaná bubínková výduť, ve které je uložena vnitřní krkavice (Wang et al., 2004). Na obrázcích 2A a 2B je vyznačeno umístění těchto změn na nákresech lebky.

Hlavním z těchto znaků je uspořádání zubů v čelisti psovitých šelem. Horní čtvrtý premolár a dolní molár vytvářejí takzvaný „trhákový komplex“ (obr. 2C), který je využíván pro odšťihávání masa od kostí. V průběhu vývoje šelem ztratil u některých druhů význam vzhledem k potravní specializaci od striktních masožravců k býložravcům.

Posledním významným znakem společným pro psovité je postavení končetin. Všichni jsou prstochodci (digitigrární) tj. při pohybu došlapují na záprstí a prsty (Corrano, 1997).



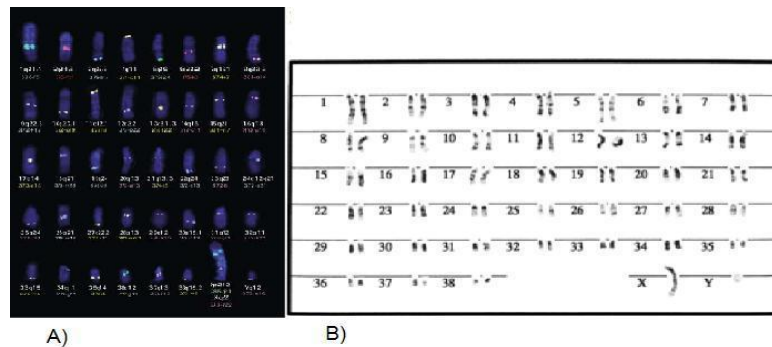
Obr. 2 Anatomické specifity psovitých.

V obrázku je naznačeno uložení vnitřní krkavice v bubínkové výduť (A), umístění bubínkové výduť a horního premoláru na lebce (B) a umístění „trhákového komplexu“ v dutině ústní (C) (převzato Wang et al., 2010; Wang et al., 2004).

3.2 Struktura a organizace psiho genomu

3.2.1 Cytologická charakteristika

Začátky cytologické charakteristiky chromozomů savců a i psů začaly již před 100 lety. Ale výsledky studií byly nejednoznačné, pohybovaly se od 50 do 78 diploidních chromozomů. Až s nástupem nových technologií jako je například G- pruhování, kterou jako první využili Selder et al. (1975), se podařilo identifikovat 76 autozomů a 2 pohlavní chromozomy (obr. 3). Největším chromozomem je X pohlavní chromozom, který má délku 137 Mb a nejmenším Y chromozom o velikosti 27 Mb (Langford et al., 1996; Reimann et al., 1999). Dále byly vytvořeny ideogramy pro chromozomy barvené různými technikami jako Q-, C-, a N-pruhování (Reimann et al., 1999). Tyto metody byly následně kombinovány s dalšími. Thomas et al. (2003) využili ke zkoumání karyotypu psa především fluorescenční *in situ* hybridizaci (FISH) (obr. 3). Tato metoda pomáhá zviditelnit každý chromozom pomocí hybridizace DNA sondy většinou do oblasti centromér (Breen et al., 1999). Wayne a Ostrander (1999) využili i další metody k označení chromozomů. Jednou z nich bylo barvení pomocí DAPI (4',6-diamidin-2-fenylindol).



Obr. 3 Karyotyp psa domácího.

Karyotyp psa domácího znázorněn pomocí vizualizace A) navázáním sondy prostřednictvím fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH), B) identifikace chromozomů pomocí G- proužkování (dle Thomaset al. (2003) a Reimann et al. (1999)).

Pro identifikaci a standardizaci psího karyotypu byl vytvořen Výbor pro standardizaci karyotypu psa domácího (Committee for the Standardization of the Karyotype of the Domestic Dog) pod záštitou „DogMap Workshop“, do něhož bylo zapojeno mnoho světových laboratoří a který v červenci 2000 schválil navrhovaný systém číslování všech chromozomů na konferenci Mezinárodní společnosti pro genetiku zvířat (International Society for Animal Genetics - ISAG) (Breen, 2008).

3.2.2 Mapování psího genomu

V 90. letech byly vytvořeny první vazbové a radiačně hybridní (RH) mapy, které daly základ pro další analýzy psího genomu. Mellersh et al. (1997) vytvořili první vazebnou mapu genomu psa obsahující 150 mikrosatelitů aplikovaných na 163 psů tvořících 17 třígeneračních rodokmenů. Následně Priat et al. (1998) vytvořili RH mapu vycházející z předchozí vazebné mapy. Obě tyto mapy využili Mellersh et al. (2000) k vytvoření vazebno-radiační mapy, která obsahovala 600 markerů z RH mapy a 341 markerů z vazebné mapy. Breen et al. (2001) vytvořili další vazebno-radiační mapu z 1800 markerů, která pokryla přibližně 90 % genomu psa. Jako první, kdo se pokusil osekvenovat celý genom psa, byli Kirkness et al. (2003). Osekvenovali 6,22 milionu sekvencí a identifikovali geny odpovídající lidským a myším ortologům. Nakonec to však byli Lindblad-Toh et al. (2005), kteří osekvenovali genom psa u fený boxera pomocí tzv. Whole Genome Shotgun (WGS) přístupu. Takto bylo osekvenováno 99 % euchromatinové oblasti genomu psa s celkovou délkou 2,38 Gb v rozsahu 31,5 milionů sekvencí, které byly v průměru přečteny 7,5x. Při porovnání s lidským genomem (velikost 2,9 Gb) je psí o 18 % menší a o 6 % menší než myší, který má 2,5 Gb (Ostrander a Wayne, 2005).

Části, které se prozatím nepodařilo osekvenovat, jsou z pravidla vysoce repetitivní oblasti zaujímající zhruba 1 % sekvenovaného genomu. Takovéto repetice zabírají 34 % celkového genomu psa (Lindblad-Toh et al., 2005). V tabulce 1 převzaté z Breen (2008), jsou uvedeny chromozomy a jejich velikosti získané dvěma metodami.

Tab. 1 Porovnání velikostí chromozomů.

Chromosom	FACS^o (Mb)	Sekvenace (Mb)	Chromosom	FACS^o (Mb)	Sekvenace (Mb)
CFA 01	135	125	CFA 22	72	64
CFA 02	100	88	CFA 23	63	55
CFA 03	104	94	CFA 24	55	50
CFA 04	102	91	CFA 25	60	54
CFA 05	99	91	CFA 26	48	42
CFA 06	88	80	CFA 27	57	48
CFA 07	95	83	CFA 28	55	44
CFA 08	87	77	CFA 29	51	44
CFA 09	79	64	CFA 30	47	43
CFA 10	81	72	CFA 31	50	42
CFA 11	87	77	CFA 32	51	41
CFA 12	86	75	CFA 33	41	34
CFA 13	76	66	CFA 34	50	45
CFA 14	73	63	CFA 35	38	29
CFA 15	76	67	CFA 36	41	33
CFA 16	74	62	CFA 37	40	33
CFA 17	81	67	CFA 38	38	26
CFA 18	67	58	CFA X	137	126
CFA 19	67	56	CFA Y	27	–
CFA 20	68	61	Celkem*	2,782	2,424
CFA 21	63	54	*Celková velikost samičího haploidního genomu psa		

Porovnání velikostí chromozomů prováděné dvěma technikami. Odhad velikosti v Mb získaný Průtokovou cytometrií (FACS^o) dle Langford et al. (1996) a odhad velikostí v Mb získaný sekvenací chromozomů Lindblad-Toh et al. (2005) (převzato z Breen (2008)).

Z informací, získaných po osekvenování psího genomu, vychází většina dnešních analýz. Příkladem je studie Akey et al. (2009), kteří využili pro analýzy psího genomu 21 000 SNP (single-nucleotide polymorphism). K analýze těchto SNP využili CanineSNP20 BeadChip aplikovaný na 275 vzorků psů 10 různých plemen a identifikovali 155 regionů, které mají vliv

na fenotypové znaky odlišující psí plemena. Obdobně Hayward et al. (2015) pomocí 180 000 SNP na 4 200 vzorcích psů provedli mapování lokusů souvisejících s různými dědičnými chorobami, jako jsou dysplazie kyčlí a ramen, idiopatická epilepsie a některá nádorová onemocnění.

Pro další analýzy psího genomu byly využity i jiné repetitivní sekvence například SINE (Short Interspersed Nuclear Elements), LINE (Long Interspersed Nuclear Elements) nebo satelitní DNA (Wang a Kirkness, 2005; Lindblad-Toh et al., 2005; Boyko, 2011).

3.3 *Mikrosatelity*

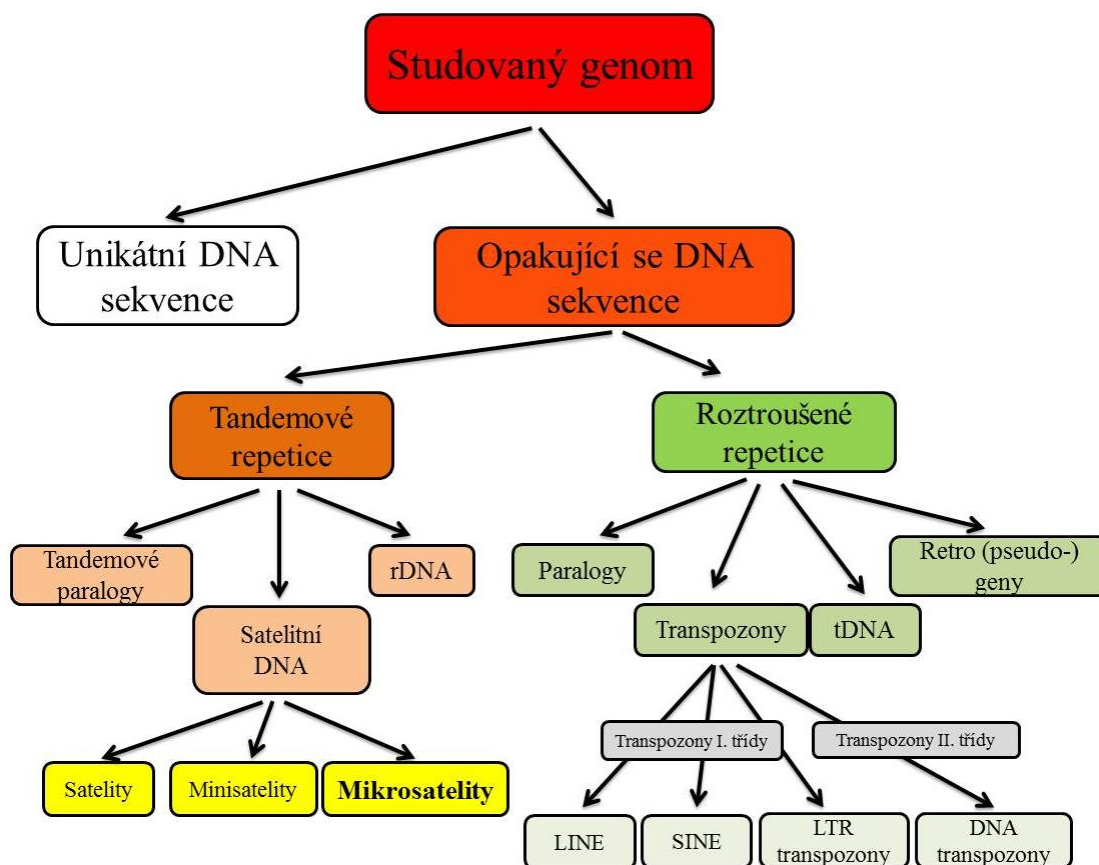
3.3.1 *Klasifikace a zařazení satelitní DNA*

Repetitivní úseky DNA často tvoří většinu genomu eukaryotních organismů (Snustad a Simmons, 2009). Dle Richard et al. (2008) se dělí na dvě hlavní skupiny tzv. „roztroušené repetice“ a „tandemové repetice“, ty se dále člení do několika podskupin. Tandemové repetice se dělí na satelitní, minisatelitní a mikrosatelitní DNA (Jurka, 2003). Richard et al. (2008) klasifikují satelitní DNA na základě délky opakujícího se motivu a celkové délky sekvence (obr. 4).

Satelitní DNA má délku opakujícího motivu od 5 přes 100 nukleotidů a o celkové délce sekvence více než 10^4 bází. Maximální délka satelitní DNA není známa, jelikož prozatím není osekvenováno dostatečné množství velkých genomů (Richard et al., 2008).

Minisatelity jsou obvykle krátké repetice. Vergnaud a Denoeud (2009) uvádí velikost opakujícího se motivu mezi 6 až 100 bází o celkové délce sekvence od 0,5 kb do několika kilobází.

Mikrosatelity se vyznačují délkou motivu od 1 do 8 nukleotidů o celkové délce sekvence do 100 bází (Richards et al., 2008). Li (2002) uvádí charakteristickou délku opakujícího motivu od 1 do 6 bází nukleotidů, stejně jako Buschiazzo a Gemmell (2006)



Obr. 4 Struktura opakujících se elementů DNA.

Převzato z Vašek (2011).

3.4 Mikrosatelitní DNA

Mikrosatelity jsou známy i pod jinými názvy. V literatuře se používají například „krátké tandemové repetice“ (Short Tandem Repeat; STR), „jednoduché opakující se sekvence“ (Single Sequence Repeat; SSR) a „variabilní počet tandemových repetic“ (Variability Number of Tandem Repeats; VNTR) (Buschiazzo a Gemmell, 2006; Kalia et al., 2011; Richard et al., 2008).

Mikrosatelity, jak bylo uvedeno i v předchozí kapitole, jsou krátké repetice s opakujícím se motivem 1 až 6 bází o celkové délce sekvence od 10 do 100 nukleotidů. Jsou obsaženy jak v kódujících, tak nekódujících regionech genomu (Buschiazzo a Gemmell, 2006).

Mikrosatelitní DNA se využívá jako důležitý genetický marker v mnoha odvětvích molekulární biologie. Hlavní z výhod, která vychází z biologické podstaty mikrosatelitů, je jejich četnost a vysoká variabilita v genomu (Buschiazzo a Gemmell, 2006). Jedná se o tzv. kodominantní markery, pomocí nichž můžeme od sebe odlišit homozygoty od heterozygotů. Další důvod, proč jsou mikrosatelity často využívány jako genetické markery, je, že se též

vyznačují vysokou specifičností a reprodukovatelností, díky nimž se výsledky dají poměrně snadno porovnat mezi laboratořemi (Powell et al., 1996). Nevýhody stejně jako výhody vycházejí z podstaty mikrosatelitů, což je vysoká frekvence mutací. Též velikostní homoplazie ovlivňuje vyhodnocení, jelikož takovéto fragmenty se jeví jako stejné, ale jejich původ je odlišný. Další problémy souvisejí s analýzou pomocí polymerázové řetězcové reakce (PCR), jsou jimi výskyt nulové alely či koktavé produkty, které znesnadňují a zkreslují vyhodnocení mikrosatelitních dat (Kalia et al., 2011).

3.4.1 Rozdělení mikrosatelitní DNA

Mikrosatelitní DNA můžeme klasifikovat dle různých hledisek, a sice v závislosti na velikosti, typu a délce opakujícího se motivu (Powell et al., 1996). V závislosti na počtu nukleotidů v opakujícím se motivu rozlišujeme mikrosatelity na mono-, di-, tri-, tetra-, penta- nebo hexa- nukleotidové (Kalia et al., 2011).

U mononukleotidových mikrosatelitů se vyskytuje nejčastěji motiv opakující se repetice A/T, u kterých je problém s vyhodnocením (Christiakov et al., 2006).

Nejčastější dinukleotidovou repeticí u zvířat je kombinace CA nukleotidů a u rostlin to jsou TA nebo GA báze. Hustota výskytu dinukleotidové repetice v genomu se u organismů velmi liší, přičemž průměrná vzdálenost mezi lokusy se pohybuje mezi 30 až 50 kilobázemi (Jarne et al., 1996).

Trinukleotidové repetice jsou do značné míry studovány v souvislosti s lidskými vrozenými nemocemi (Kalia et al., 2011). Mezi takové patří například Huntingtonova choroba nebo myotonická dystrofie (Sutherland a Richards, 1995).

Tetranukleotidové repetice jsou vysoce polymorfní a často se vyskytují jako složené nebo jako mikrosatelity s přerušením. U vyšších organismů se často vyskytuje repetice GATA a GACA. U člověka se tetranukleotidy sdružují v blízkosti centromér (Jarne, 1996).

Kalia et al. (2011) dělí mikrosatelity dle lokalizace v genomu na jaderné (nuclear, nuSSR), chloroplastové (chloroplastic, cpSSR) a mitochondriální (mtSSR).

Dalším kritériem pro dělení mikrosatelitů je uspořádání kompozice opakujícího se motivu. Dle toho se dělí na dokonalé (pure, perfect nebo simple perfect), nedokonalé (simple imperfect), složené (compound nebo simple compound) a přerušené (interrupted, imperfect nebo compound imperfect) (Oliveira et al., 2006; Kalia et al., 2011).

Dokonalé jsou mikrosatelity, pokud mají jednotný motiv úseku repetice (Oliveira et al., 2006). Jednoduchým příkladem takovéto repetice je TATATATATATATA.

Nedokonalé mikrosatelity mají v opakujícím se motivu sekvenci o jiném motivu, po tomto přerušení původní motiv pokračuje dál (Oliveira et al., 2006). Příkladem nedokonalé repetice je TATATATACTTATATA.

Složená mikrosatelitní repetice se skládá ze dvou i více typů tandemových repetic, které na sebe navazují bez jiného přerušení (Oliveira et al., 2006). Složená tandemová repetice by mohla například vypadat takto TATATATATAGTGTGTGTGTGT.

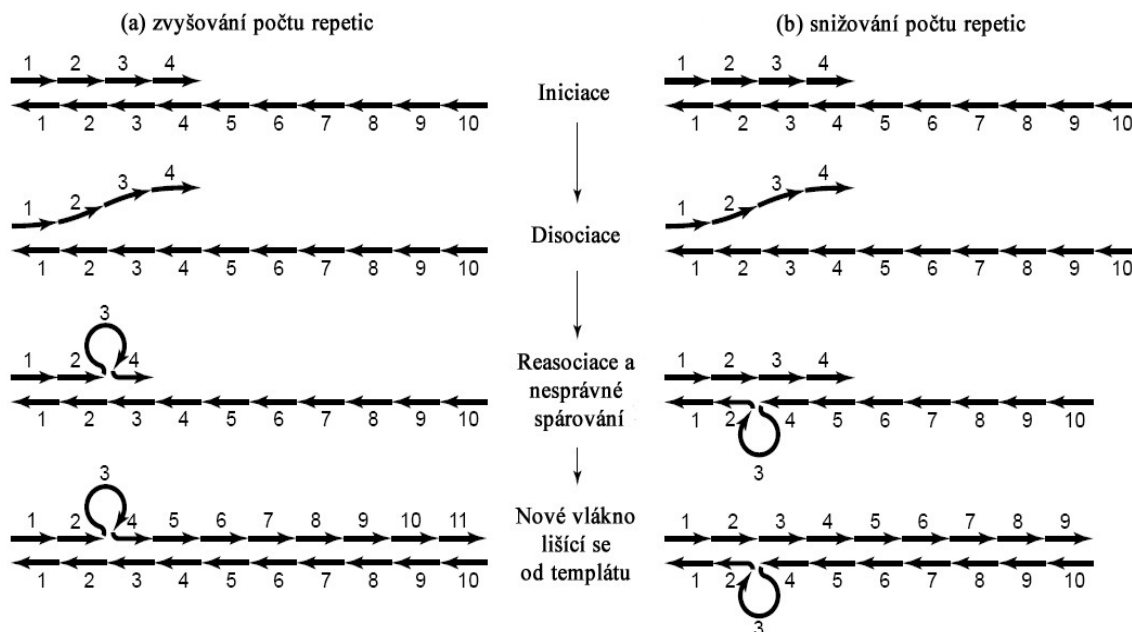
Přerušené jsou mikrosatelity, které jsou složené z několika motivů a zároveň přerušené několika bázemi nukleotidů (Oliveira et al., 2006). Příkladem takovéto repetice je TATATACTCTCTTGTGTGTGTG .

3.4.2 *Mutační mechanismy mikrosatelitů*

Důvodem pro využití STR jako molekulárních markerů je jejich vysoká mutabilita a tím i jejich hypervariabilita v populaci daného druhu. Mikrosatelity mutují rychlostí 10^{-2} až 10^{-6} na lokus na generaci, což je o několik řádů vyšší frekvence, než u běžných nerekpetitivních struktur DNA (Chistiakov et al., 2006; Schlötterer a Tautz, 2000). Mutační rychlost je zvláště důležitá, protože je významným faktorem ovlivňujícím úroveň variability udržované v populaci (Kalia et al., 2011).

Je známo několik mutačních mechanismů, které zvyšují variabilitu mikrosatelitu. Patří mezi ně replikační sklouznutí, rekombinace a retrotranspozony (Richard a Pâques, 2000). Hlavní z těchto mechanismů je replikační sklouznutí (obr. 5), při kterém se replikované vlákno prodlouží nebo zkrátí. Mohou tak být vloženy nebo vymazány opakující se jednotky. Jen malé procento chyb vede k mutaci mikrosatelitu a mnoho těchto mutací je korigováno opravným systémem tzv. Mismatch Repair System (MMR) (Ellegren, 2004). Ke sklouznutí dochází při amplifikaci komplementárního vlákna, kdy dojde z neznámého důvodu k zastavení polymerázy. V tento moment se konec komplementárního vlákna s navázanou polymerázou oddálí od templátu. Při prodloužení motivu se na amplifikujícím se vlákně vytvoří smyčka, jejíž konec se následně napojí na jiném replikačním místě, než měla před oddálením vláken.

Po navázání polymerázy na templátový úsek DNA pokračuje v syntetizaci komplementárního vlákna. Podobným způsobem dochází ke zkrácení amplifikovaného mikrosatelitu s tím rozdílem, že se smyčka vytvoří na templátovém vlákně (Schlötterer, 1992; Hile a Eckert, 2004).



Obr. 5 Replikační sklouznutí.

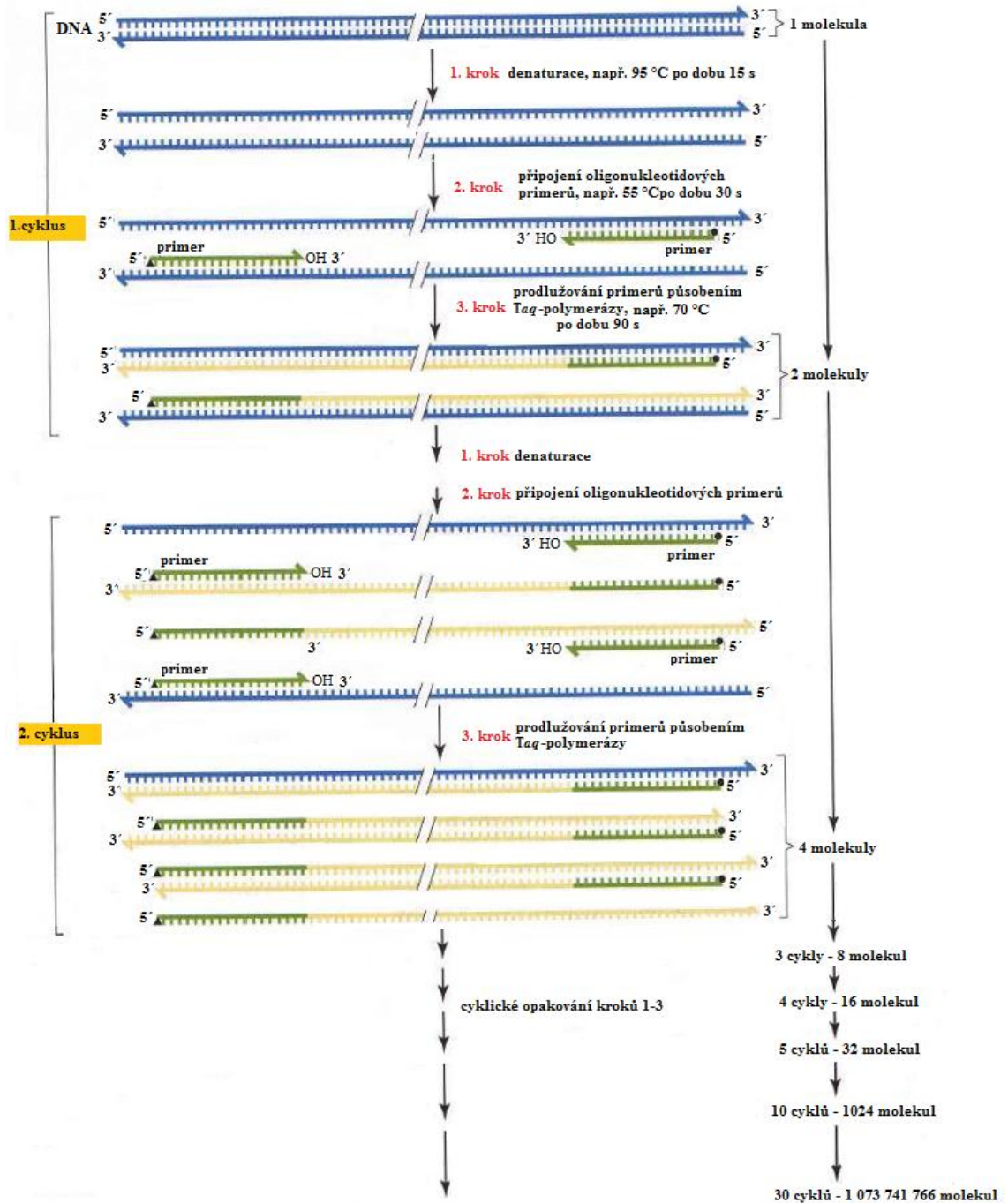
Zde jsou vyobrazeny fáze replikačního sklouznutí, pomocí nichž je komplementární vlákno prodlouženo nebo zkráceno. Hlavním bodem, během kterého se změní počet repetic, je „reasociace a nesprávné spárování“, čímž dojde ke spojení vláken nesprávných repetic. V tomto případě došlo k napojení třetí a čtvrté repetice (převzato z Vašek (2011)).

3.5 Molekulárně-genetické metody

3.5.1 Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Objev polymerázové řetězové reakce byl revoluční pro molekulární biologii a v roce 1993 za něj byla udělena Kary B. Mullisovi Nobelova cena za chemii. Bez ní by nebylo možné provádět mnoho metod a analýz (Butler, 2012).

PCR je enzymatický cyklický proces, při kterém je specifický úsek DNA replikován nepřetržitě v mnoha kopiích (obr. 6). Tato reakce zahrnuje ohřívání a chlazení vzorků v přesně daných intervalech. Těchto cyklů obvykle bývá více než třicet a během každého se generují molekuly DNA požadované sekvence, které se v následujících cyklech stávají předlohou pro další molekuly (Butler, 2012).



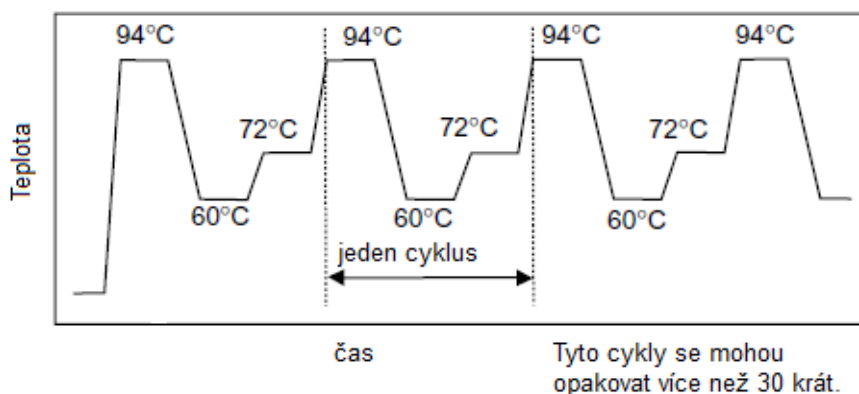
Obr. 6 Proces amplifikace pomocí polymerázové řetězové reakce.

Obrázek zobrazuje tři kroky PCR procesu: denaturace, annealing a extenzi. Během PCR cyklu dochází k vytvoření 1. kopie molekuly DNA a její následné využití pro následující cyklus. Takto narůstá počet kopií DNA geometrickou řadou dle počtů cyklů (Snustad a Simmons, 2009)

Hranice amplifikovaného produktu vymezují oligonukleotidové primery, které jsou komplementární k 3' konci hledané sekvence. V ideálním případě se po 32 cyklech při 100% účinnosti PCR vytvoří miliarda kopií požadované sekvence výchozího templátu (Butler, 2012).

Proces PCR zahrnuje cyklické opakování tří základních kroků. Prvním z nich je denaturace, během níž se rozvolní vlákna DNA. Druhým krokem je nasedání primeru na kompatibilní vlákno templátu (annealing) a v třetím kroku se prodlužuje primer komplementárně k templátu (extenze) (Erich, 1989).

Při typické PCR reakci se nejprve dvouřetězová DNA rozvolní při krátkém zvýšení teploty na 90-95 °C, následně mohou primery nasedat na komplementární úsek při rychlém zchlazení na 60-65 °C. Posledním krokem je nasedání *Taq* polymerázy na primer při teplotě 70-75 °C a syntéza komplementárního vlákna DNA (Erich, 1989) (obr. 7).



Obr. 7 Teplotní profil PCR.

Převzato z Butler (2012).

V minulosti se k změně teplot vzorků využívaly vodní lázně, ale nyní se tento proces automatizoval pomocí termocyklerů (Erich, 1989). Termocyklery (Obr. 8) jsou přístroje, které podle zadaného programu ohřívají a zchlazují vzorky ve zkumavkách.



Obr. 8 Termocykler C1000 (Bio-Rad).

Nejdůležitějším parametrem odlišujícím od sebe termocykly je jejich schopnost s jakou rychlostí dokáží měnit teplotu. Průměrně jsou přístroje schopny změnit teplotu o 1 °C během vteřiny, ty nejlepší dokáží změnit teplotu až o 4 °C za vteřinu (Butler, 2012).

Do termocyklerů se využívají jednotlivé nebo spojené zkumavky o objemu 0,2 ml. Spojené mohou být jako „stripy“ o 8-12 spojených kusech, nebo „destičky“ o 96 až 384 zkumavkách, které se využívají ve velkých laboratořích (Butler, 2012).

Množství vytvořených kopií požadované sekvence závisí na optimalizaci amplifikačního procesu PCR (Innis et al., 1990). Správný průběh PCR ovlivňují například inhibitory polymerázy nebo špatně navržené primery s nevhodnou schopností navázat se na komplementární sekvenci (Erlich, 1989; Butler, 2012).

Butler (2012) uvádí dva hlavní účely, ke kterým se PCR využívá. Prvním z nich je amplifikace velkého množství molekul dle specifických primerů, druhým pak zviditelnění amplifikovaných produktů pomocí fluorescenčních barviv.

Objem vzorků, se kterým je PCR schopná pracovat, je od 5 µl až po 100 µl. Nejčastěji se pracuje s objemem kolem 20 až 50 µl, protože velmi malé nebo příliš velké objemy bývají problematické. Například u nízkých objemů (kolem 5 µl na reakci) je obtížná příprava. Zde se klade velký důraz na přesné pipetování všech součástí směsi. Problémem je i odpařování vzorku během reakce v termocykleru (Butler, 2012).

Pro správný průběh PCR reakce je důležitá optimalizace koncentrací všech komponent v reakci, kterými jsou templátová DNA, pufr, $MgCl_2$, dNTP, specifické primery, BSA, *Taq* polymeráza a deionizovaná H_2O (Innis et al., 1990).

Koncentrace polymerázy se obvykle pohybuje od 1-2,5 U na 100 μ l reakční směsi. Je ale velmi variabilní v závislosti na templátové DNA a primeru. Pokud je koncentrace polymerázy příliš vysoká vytváří se mnoho nespecifických produktů, naopak nízká koncentrace vede k tvorbě malého množství produktů (Innis et al., 1990).

Optimální koncentrace dNTP v reakční směsi je typicky 20 μ M, i když se může pohybovat v rozmezí od 20 do 200 μ M. Při nízkých extenzních teplotách a vysoké koncentraci dNTP dochází k jejich nesprávnému začleňování při vytváření komplementárního vlákna (Erlich, 1989).

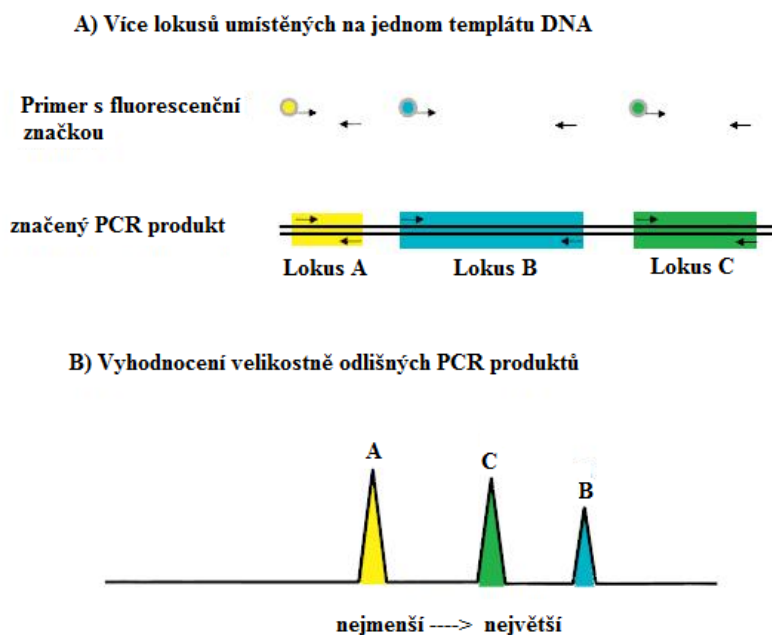
Hořčík má velký vliv na průběh PCR, jelikož je využit *Taq* polymerázou při nasedání primeru na templát a inkorporaci dNTP. Jeho koncentrace ve směsi se pohybuje mezi 0,5 až 2,5 mM (Innis et al. 1990).

Další součástí reakční směsi je pufr, jenž udržuje vhodné pH, a bovinní sérový albumin (BSA) stabilizující enzymy (Innis et al., 1990).

Do připravené směsi se dodává templátová DNA, podle které se pomocí vybraných primerů amplifikují námi určené úseky. Primery mívají délku kolem 20 až 30 bází, ale dle potřeby se používají i delší. Obecně platí, že koncentrace v rozmezí od 0,05 do 0,5 μ M každého oligonukleotidu v reakci by měla být dostatečná (Erlich, 1989). V případě potřeby je používána deionizovaná voda k doplnění na požadovaný objem reakční směsi (Butler, 2012).

3.5.1.1 Multiplex PCR

Tzv. multiplex PCR dovoluje amplifikovat více jak jednu oblast templátového řetězce. Toho je docíleno přítomností více primerů v jedné reakční směsi (obr. 9) (Henegariu et al., 1997). Jednotlivé amplikony v reakci pak lze identifikovat pomocí primerů s kovalentně navázanou fluorescenční značkou (Butler, 2012).



Obr. 9 Amplifikace multiplex PCR lokusů.

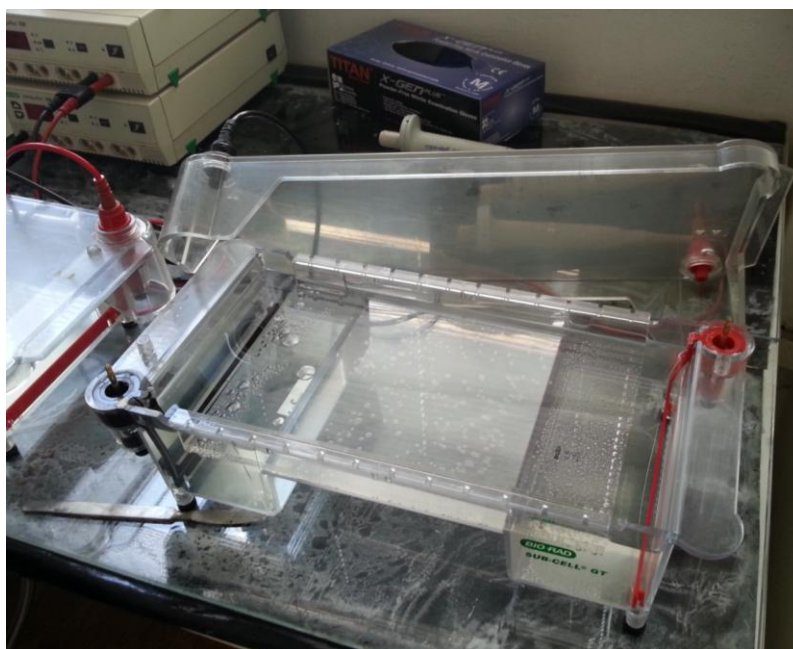
Amplifikace tří lokusů na jednom templátu pomocí značených primerů (A). Jejich amplikony byly navrženy, aby byly různé velikosti a dali se lépe rozeznat pomocí separačních metod (kapilární elektroforéza) (B) (Butler, 2012).

3.5.2 Elektroforéza

Základním principem gelových elektroforetických metod je pohyblivost analytu, v tomto případě nukleových kyselin (nukleotidů), v mediu s elektrickým polem (obr. 10). Hlavním důvodem pohybu nukleotidů v poli je negativně nabitá fosfátová skupina (Koontz, 2013).

Prostupnost nukleotidů gelem závisí na jejich hmotnosti. U polyakrylamidového gelu je využito denaturační činidlo, které odstraňuje sekundární a terciální strukturu. Mezi tato činidla patří například formaldehyd, formamid nebo močovina (McMaster a Carmichael, 1977). Kratší elementy v gelu postupují rychleji než větší fragmenty. Pro přesnější separaci je nutné vybrat vhodnou koncentraci gelu (Smith, 1996).

Pro detekci nukleových kyselin se využívá barvení například ethidium bromidem nebo stříbrem (McMaster a Carmichael, 1977).

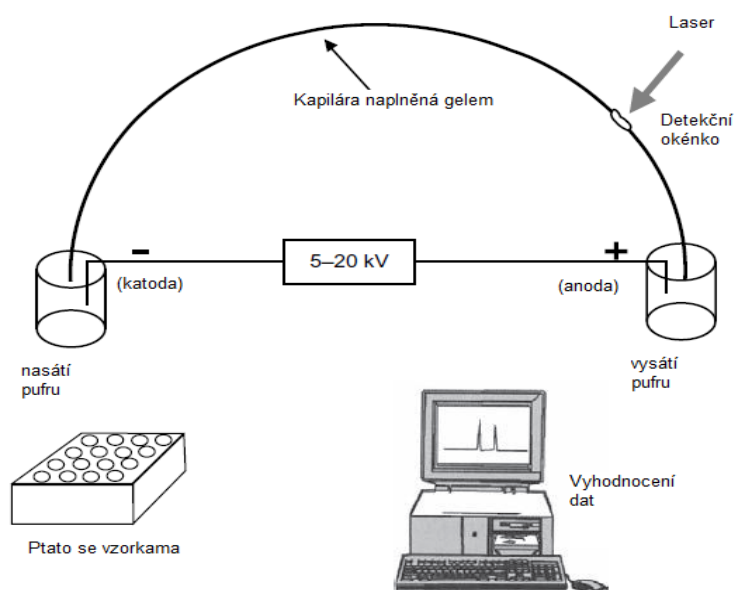


Obr. 10 Agarosová elektroforéza.

Horizontální separační cela Sub Cell (Bio- Rad)

3.5.2.1 Kapilární elektroforéza

Základními prvky kapilární elektroforézy je skleněná kapilára zanořená do dvou lahviček a propojena dvěma elektrodami, kterými prochází vysoké napětí (Altria, 1996). Tento systém též zahrnuje laser, fluorescenční detektor, automatický podavač zkumavek a počítač, pomocí kterého je řízeno jednotlivé nasávání vzorků a zaznamenání jejich detekce (Butler, 2012), jak je názorně ukázáno na obr. 11.



Obr. 11 Schematický popis kapilární elektroforézy.

Převzato z Butler (2012).

Kapiláry jsou vyrobené ze skla o průměru 50 μm , což je hodnota odpovídající průměru lidského vlasu. Celková délka je různá, obvykle 36 až 50 cm od místa nasátí vzorku po detekční místo. Používají se i kapiláry o délce 80 cm s vyšší rozlišovací schopností při čtení DNA sekvencí. Uvnitř kapiláry se nachází gel, kterým procházejí fragmenty molekul DNA. Ten je vytvořen z viskózního polymeru sloužícího jako rozdělovací médium. Před každým vzorkem je nasán nový gel (Butler, 2012; Grosman a Colburn, 2012).

Nasátí fragmentu DNA je umožněno díky elektrokinetickým vlastnostem negativně nabitě molekuly DNA. Tyto molekuly jsou rozptýleny v neutrálním prostředí a v elektrickém poli se pohybují k pozitivně nabitě elektrodě kapiláry (Avila a Whiteside, 1993). Takto je jedna kapilára schopna detekovat pouze jeden vzorek, ale je možné najednou analyzovat směs fragmentů se standardem (Butler, 2012).

Na kapiláře je umístěno detekční okénko, kterým prosvěcuje laser, kde se odečítají fragmenty DNA fluorescenčním detektorem (Butler, 2012).

3.5.3 Chyby ovlivňující PCR a genotypování

3.5.3.1 Inhibitory PCR

Inhibitory jsou látky, které negativně ovlivňují probíhající reakce (Vodrážka, 1999). V tomto případě mohou zasahovat do lýzy buněk nutné pro extrakci DNA, ovlivňovat degradaci nebo zachycení nukleových kyselin, popř. inhibovat aktivitu polymerázy, čímž se zabrání enzymatické amplifikaci DNA. Inhibitory, jako je melanin či hemoglobin, se zřejmě váží na aktivní místo *Taq* polymerázy a tím zabraňují správnému fungování při amplifikaci pomocí PCR. Pro snížení inhibice se do PCR reakce často přidává BSA (Butler, 2012).

3.5.3.2 Nulová alela

Nulová alela představuje situaci, kdy nedojde z nějakého důvodu k pomnožení jedné z alel.

Jedním z jevů, u kterých k tomuto stavu dochází při amplifikaci STR pomocí PCR, je takzvaný alelický drop-out. Pokud dojde k záměně bází v místě nasedání primeru, tak při amplifikaci opakovaně nedojde k rozpoznání tohoto STR lokusu a tudíž nebude amplifikován. Naštěstí k tomuto jevu dochází jen vzácně, jelikož sekvence v oblasti kolem mikrosatelitu je poměrně stabilní (Jones et al., 1998; Butler, 2012).

Může též docházet k jevu zvanému selektivní amplifikace. V tomto případě je kratší alela amplifikována s větší četností než druhá heterozygotní alela. Jedinec se tedy při vyhodnocování jeví jako homozygot (Wattier et al., 1998).

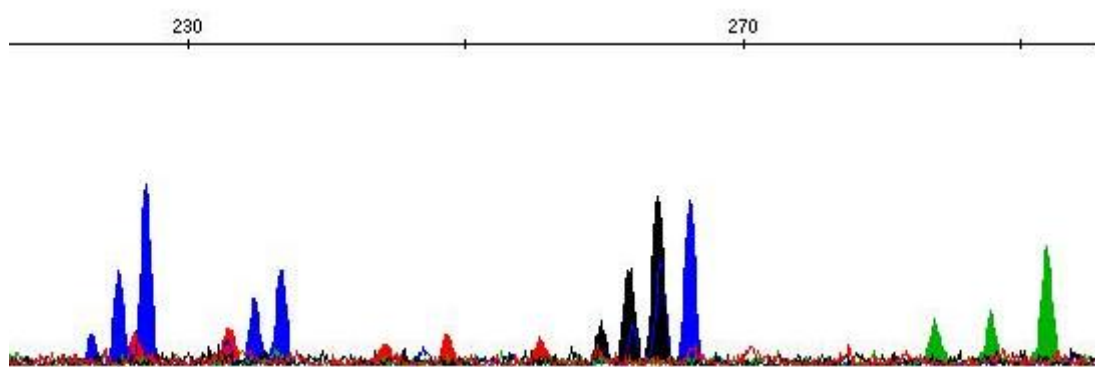
Dalším důvodem výskytu nulové alely může být nízká kvalita templátové DNA způsobená inhibičními látkami nebo samotnou degradací DNA. Tento jev má za následek zkreslení informací především u populačních studií. Je to způsobeno tím, že nulová alela svým projevem odpovídá recesivní mutaci u heterozygotů. V průběhu PCR se amplifikuje pouze dominantní alela, a při vyhodnocení se tento jedinec jeví jako homozygot (De Sousa et al., 2005).

Nulovou alelu je velmi těžké odhalit. Můžeme problémy spojené s výskytem nulové alely řešit *in silico* v rámci počítačových simulací, vycházející z provedených studií evoluční dynamiky mikrosatelitů, a takto odhadnout frekvenci nulových alel (Chapuis a Estoup, 2007). Dalším možným řešením je navrhnout nových primerů a osekvenování problematického úseku (Jones et al., 1998).

3.5.3.3 Netemplátové přidání nukleotidů a koktavé produkty

V průběhu amplifikace může *Taq* polymeráza ke konci vytvářené sekvence přidat nejčastěji ještě jeden nukleotid, typicky adenin, a z tohoto důvodu se tento jev nazývá netemplátové A. Tím se při vyhodnocování jeví fragment o bázi delší než ve skutečnosti je a může tak zkreslit výsledky (Smith et al., 1995).

Podobným problémem jsou tzv. koktavé produkty (obr. 12). Vznikají při amplifikaci v důsledku replikačního sklouznutí *Taq* polymerázy, kdy během PCR amplifikace polymeráza nenasyntetizuje celou délku mikrosatelitu, což vede ke vzniku fragmentů o menším počtu repetic. Takovéto produkty mohou mít stejnou či vyšší intenzitu než má původní alela a tím komplikují vyhodnocení výsledků (Ginot et al., 1996; Gugerli et al., 2008).



Obr. 12 Koktavé produkty

Na záznamu z kapilární elektroforézy jsou zaznamenány píky fragmentů, které vytvořily více produktů o různé velikosti. U takových to produktů je obtížné vyhodnotit pravou alelu.

Tyto problémy se dají snížit optimalizací celkového procesu od kvalitní izolace DNA, přes výběr vhodných primerů po amplifikaci pomocí PCR za použití vhodně upravené reakční směsi (Hoffman a Amos, 2005).

4 Metodika

4.1 Bioinformatická analýza dat

4.1.1 Mikrosatelitní markery

Pro testování genotypů byl využit multiplex sestavený z devíti párů primerů vybraných z článku Asch et al. (2009) (tab. 2).

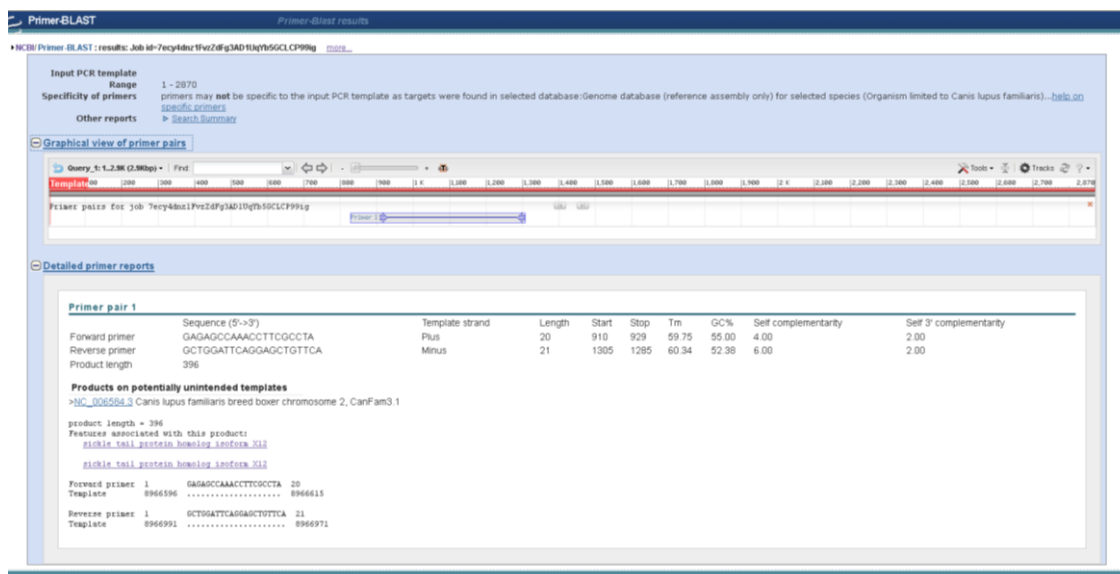
Tab. 2 Charakteristika využitých STR markerů

STR marker	Chromozom	Velikost od [bp]	Velikost do [bp]	F primer (5'-3')	R primer (5'-3')
FH3210	CFA02	230	315	CAAGGACCACGATGAAATGACT	GCTGGATTCAGGAGCTGTCA
FH3241	CFA08	250	270	TCCTTGTTTCCTTCCTCTGG	TTGGGCAAATCAAACCTCC
FH2004	CFA11	161	257	GGGGCTTTGACTGTGACCTAC	ACAGACTGAGAATGCTGGGTT
FH2658	CFA14	106	138	GAGCTCTACATCTGAAACTATAC	GAAGACGGTTTGGCAGTTTCT
FH4012	CFA15	119	143	GGGAGGGAAGCGATCTTCT	CGGTTAGCCATCCCTGAG
REN214L11	CFA16	154	162	GGCTCTCCATGCTAAGACC	TGGGTCTAATGGTTGGGATAG
FH2010	CFA24	154	170	CTATTAACAATGTCAGACTCTCAG	GAGCATGCATGTACACCAGAA
FH2361	CFA33	231	347	GCAGGTCAGAGCAGTCAGAA	GAATGTACCAGGCACTATGCA
C38	CFA38	132	217	ACAAGAGGGGATGCTGAA	TCATGTGTCTGTTGGGCATT

Převzato dle Asch et al. (2009).

4.1.2 Nové primery

Pro potřebu sekvenace bylo nutné navrhnout nové primery ve větší vzdálenosti od repetitivní sekvence. Za pomoci online softwaru Primer-BLAST (Ye et al., 2012) dostupného z <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/> byly navrženy primery dle teplotního profilu (T_m), velikosti ampliconu a specifity sekvence v genomu (obr. 13).



Obr. 13 Navrhování primeru v Primer-BLAST.

V softwaru je uvedena délka (Length), umístění na chromozomu (Start a Stop) a teplota tání (Tm). Dále je uvedeno, na jakém místě chromozomu primer nasedne – „unikátní“ sekvence.

4.2 Vzorky a izolace

Pro testování byly využity vzorky biologického materiálu vytvořené kolekce z vybraných plemen psů a vlků, odebrané bukálními stěry sliznice dutiny ústní a exkrementy. Část využitých vzorků pocházela z kolekce více než tisíce genotypů plemene československý vlčák Katedry genetiky a šlechtění. Zbylé vzorky psů a vlků byly získány od chovatelů a různých organizací z České republiky i zahraničí.

Pro optimalizaci a testování STR markerů bylo využito několik genotypů, u kterých bylo možné provádět odběry vhodného biologického materiálu opakovaně. Pro konečné analýzy bylo testováno 192 vzorků. Z tohoto bylo 96 jedinců plemene Československý vlčák, 30 jedinců plemene Saarloosovův vlčák, 30 vlků a 36 jedinců Německého ovčáka (tab. 3). Další skupina vlčích vzorků nebyla zařazena do finální analýzy, jelikož nebyly splněny specifické požadavky na kvalitu získaného genetického profilu.

Tab. 3 Genotypy použité pro testování

Genotypy použité pro testování											
CSV67	CSV212	CSV247	CSV255	CSV267	CSV270	CSV281	CSV288	CSV305	CSV312	CSV315	CSV348
CSV352	CSV440	CSV463	CSV464	CSV466	CSV479	CSV501	CSV505	CSV512	CSV515	CSV522	CSV526
CSV533	CSV539	CSV541	CSV549	CSV554	CSV560	CSV561	CSV563	CSV573	CSV578	CSV584	CSV587
CSV594	CSV598	CSV602	CSV609	CSV612	CSV620	CSV624	CSV629	CSV637	CSV640	CSV641	CSV649
CSV656	CSV606	CSV663	CSV668	CSV671	CSV674	CSV686	CSV689	CSV696	CSV697	CSV704	CSV710
CSV716	CSV720	CSV723	CSV724	CSV733	CSV738	CSV741	CSV745	CSV758	CSV760	CSV765	CSV766
CSV777	CSV780	CSV789	CSV790	CSV794	CSV789	CSV801	CSV805	CSV812	CSV815	CSV824	CSV828
CSV866	CSV869	CSV877	CSV878	CSV884	CSV889	CSV893	CSV897	CSV903	CSV909	CSV914	CSV1058
SV1A	SV2A	SV3A	SV4A	SV5A	SV6A	SV7A	SV8A	SV9A	SV10A	SV11A	SV12A
SV13A	SV14A	SV15A	SV16A	SV17A	SV18A	SV19A	SV20A	SV21A	SV22A	SV23A	SV1B
SV4B	SV5B	SV11B	SV14B	SV16B	SV21B						
KK168	KK170	KK171	KK173	KK282	KK283						
KK288	KK289	KK290	KK694	KK832	KK833	KK1149	KK1150	KK1151	KK1152	KK1157	KK1158
KK1159	KK1285	KK1286	KK1287	KK1377	VLK25B	VLK27B	VLK28B	VLK29B	VLK30B	VLK31B	VLK33B
NO1C	NO4C	NO8C	NO11C	NO12C	NO13C	NO14C	NO20C	NO22C	NO27C	NO1A	NO2A
NO3A	NO4A	NO5A	NO6A	NO7A	NO8A	NO9A	NO10A	NO11A	NO12A	NO13A	NO14A
NO15A	NO16A	NO17A	NO18A	NO19A	NO20A	NO21A	NO22A	NO23A	NO24A	NO25A	NO26A
V1	V2	V3	V4	V5	V6	V7	V8	V9	V10	V11	V12
V13	V14	V15	V16	V17	V18	V19	V20	V21	V22	V23	V24
V25	V26	V27	V28	V29	V30						

Vysvětlivky: CSV - československý vlčák; SV - Saarloosův vlčák, NO - německý ovčák; KK - označení převzaté z maďarské kolekce vlků; VLK - označení převzaté z kolekce vlků ČZU, V – vlci (ZOO).

Využili jsme oba způsoby odběru s ohledem na bezpečnost a invazivitu pro odebrání jedince. Pro izolaci byly využity dvě metody dle typu biologického materiálu, který byl izolován komerčně vyráběnými kity dle manuálu výrobce. DNA z bukálních stěrů byla izolována pomocí NucleoSpin Tissue (Macherey-Nagel) a k získání DNA z exkrementů byl použit QIAmp DNA Mini Kit (QIAGEN).

K zjištění výtěžnosti izolační procedury byla provedena kvantifikace DNA pomocí UV spektrofotometru S-111107 NanoPhotometer (Implen). Tímto způsobem byla zároveň orientačně stanovena čistota získané DNA na základě poměrů absorbancí A_{260}/A_{280} . A na základě naměřené hodnoty byly všechny vzorky naředěny na finální koncentraci $10 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$. Rovněž byla ověřena vysokomolekularita vyizolované genomické DNA pomocí agarozové elektroforézy.

4.3 Polymerázová řetězová reakce (PCR)

4.3.1 Multiplex PCR

Pro multiplex PCR byly vybrány STR markery ze článku Asch (2009) a jejich amplifikace též provedena dle tohoto zdroje. Reakční směs obsahovala 1x Master Mix (je součástí také QIAgen Multiplex PCR Plus Kit), 20 ng DNA a 18 primerů o koncentraci 0,2 μ M od každého primeru. Průběh reakce začal predenaturací 95 °C 15 min. Pokračoval 30 cykly nejprve denaturací 94 °C 30 s, anelací 60 °C 90 s a elongace 72 °C 60 s. PCR byla zakončena finální elongací při 60 °C po dobu 4800 s.

4.3.2 Optimalizace primerů

STR markery byly nejprve optimalizovány v tzv. singleplexu a byla hodnocena jejich schopnost specifické amplifikace. U vybraných primerů byla porovnávána intenzita a kvalita fluorescenčního signálu na kapilární elektroforéze, jak pro singleplex tak i multiplex.

4.4 Elektroforéza

4.4.1 Agarozová elektroforéza

Tento typ elektroforézy byl využit pro ověření vysokomolekulární genomické DNA jako základní diagnostika výsledku amplifikace a čištění ampliconů pro sekvenaci.

Separace probíhala v agarozovém gelu umístěném v horizontální separační cele Sub Cell (Bio-Rad) s 1x TBE pufrem při napětí 4 V.cm⁻¹. Vzorby byly barveny ethidium bromidem a vizualizovány pomocí UV transiluminátoru. Výsledek byl zaznamenán pomocí digitální kamery, která je součástí fotodokumentačního zařízení GelDocXR (Bio-Rad) a zpracován v programu Quantity One ver. 4.6.2 (Bio-Rad).

K orientačnímu stanovení velikosti amplifikovaných fragmentů DNA byl použit hmotnostní standard GeneRuler 100 bp nebo GeneRuler 100 bp plus (Thermo Fisher Scientific).

Pro různé druhy analýz byly využity agarozové gely o odlišné koncentraci, kdy 1% gel byl využit pro ověření vysokomolekularity DNA. Pomocí 2% gelu byly testovány STR markery a čištěny amplicony určené pro sekvenaci. V 3% gelu byly separovány velikostně odlišné fragmenty > 70bp u heterozygotních jedinců.

4.4.2 Polyakrylamidová elektroforéza

Separace amplikonů probíhala ve vertikální elektroforetické cele Sequi-Gen (Bio-Rad) v 0,5x TBE při teplotě 48 °C a výkonu 70 W nebo v cele Sequi-Gen (Bio-Rad) při teplotě 45 °C a výkonu 15 W po dobu 5 až 8 hodin v závislosti na velikosti amplikonu.

Polyakrylamidová (AA) gelová elektroforéza má několik fází, než je možné vzorky použít k dalším analýzám. První fáze spočívá v přípravě sekvenačních cel, u kterých bylo „krátké“ sklo nejprve očištěno absolutním etanolem a následně ošetřeno silanizačním roztokem obsahujícím 1 ml 96 % etanolu, 5 µl 99,5 % ledové kys. octové a 3 µl silanu (3-methakryloxypropyltrimethoxysilan). Druhé „dlouhé“ sklo bylo ošetřeno přípravkem Sigma-Cote™ (Sigma).

Během druhé fáze byl připraven 6% polyakrylamidový gel, který ve 100 ml obsahoval 15 ml 40% akrylamidového gelu (19:1), 10 ml 10x TBE, 42 g močoviny, 833 µl 10% síranu amonného (APS) a 50 µl TEMEDu (tetramethylethylendiamin). Vzorky byly nejprve smíchány s denaturačním barvivem v poměru 1:1, které obsahovalo 99,5% formamid (99 % v/v), 10 mM NaOH, 0,05 % (m/v) bromfenolové modři a 0,05 % (m/v) xylencyálové modři. Takto připravené vzorky byly denaturovány při teplotě 95 °C po dobu 5 min, a poté ponechány 30 minut na ledu a následně separovány v připravených celách.

V třetí fázi proběhlo barvení gelu pomocí stříbra. Vzorky byly nejprve fixovány po dobu 5 minut fixačním roztokem složeným z 100 ml 96 % (10 v/v) etanolu a 5 ml 99,5% ledové kys. octové (0,5% v/v) doplněném na 1 l. Poté byl gel barven 7 minut v barvicím roztoku obsahujícím 0,15 % AgNO₃ s 1,5 ml 37,5 % formaldehydu přidaného chvíli před samotným barvením. Následně byl gel opláchnut na 30 sekund destilovanou vodou. Gel byl poté vyvíjen pomocí vyvíječického roztoku, který obsahoval 1,5 % (w/v) NaOH s přidanými 3 ml 37,5 % formaldehydu. Nakonec gel prošel neutralizací hydroxidu ve fixačního roztoku po dobu 2 minut.

4.4.3 Kapilární elektroforéza

Před samotnou separací kapilární elektroforézou bylo nezbytné vzorky vhodně připravit. Vzorky byly nejprve naředěny v poměru 1:9 deionizovanou vodou a 1 µl ředěného PCR produktu byl smíchán s 12 µl Hi-Di formamidu (Life Technologies) a 0,2 µl hmotnostního standardu. Jako hmotnostní standard byl použit GeneScan 600 LIZ v.2.0 (Life Technologies). Za účelem získání jednovláknových molekul DNA byly takto připravené vzorky zahřáty v termocykleru na teplotu 95 °C po dobu 5 minut.

Separace fragmentů DNA byla provedena pomocí zařízení ABI PRISM 310 (Life Technologies) (obr. 14) v 47 cm dlouhé kapiláře vyplněné POP4 polymerem. Separáční podmínky byly následující: doba nástřiku byla 5 s při napětí 10 kV, napětí při separaci bylo 15 kV a teplota během separace byla 60 °C. Vlastní separace probíhala 28 minut. Výsledky byly zaznamenány pomocí Data Collection Software v3.1.0 (Life Technologies) a velikost alel popř. další parametry byly vyhodnoceny v programu GeneMapper v4.1 (Life Technologies).



Obr. 14 Kapilární elektroforéza.

Přístroj ABI PRISM 310 (Life Technologies).

4.5 Sekvenování

Pro sekvenaci byly vybrány genotypy, které reprezentovaly všechny alely detekované na základě fragmentačních analýz. K sekvenování byla využita dideoxyterminační metoda dle Sanger (1977). Sekvence všech fragmentů byla provedena formou služby společnosti GATC-Biotech genetickým analyzátorem ABI 3730xl (Life Technologies). Příprava vzorků byla provedena dle instrukcí společnosti uvedených na webových stránkách. K sekvenaci byla zaslána reakční směs o celkovém objemu 10 μ l obsahující připravené amplikony DNA v koncentraci 20-80 $\text{ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ a 5 μM primer.

4.5.1 Příprava a purifikace před sekvenací

Vzorky byly amplifikovány samostatně v singleplexech a pro účel sekvenace byly navrženy a optimalizovány nové primery. Získané amplikony byly dále přečištěny a připraveny dle požadavků společnosti společnosti Gata-Biotech.

Amplikony alel homozygotů byly separovány v 2% gelu a následně vyříznuty skalpelem. Čištění z gelu bylo provedeno pomocí GeneJet Gel Extraction Kit (Thermo Scientific) dle manuálu výrobce. V 3% agarozovém gelu byly separovány fragmenty heterozygotních genotypů s rozdílem alel nad 70 bp. Tyto fragmenty byly také následně čišťeny z gelu GeneJet Gel Extraction Kit (Thermo Scientific).

Alely s rozmezím menším než 70 bp byly separovány v 6% AA gelu a vyříznuty skalpelem. Takto byly ponechány 36 hodin při teplotě 37°C v 100 µl difúzního pufru obsahujícím 0,5 M octanu amoného; 10 mM octanu hořečnatého; 1 mM EDTA a 0,1% (w/v) SDS, pH 8,0. Poté byly k odstranění zbytků AA gelu využity kolonky na hrubé nečistoty z GenElute Plant Genomic DNA Miniprep Kit (Sigma). Získaný produkt byl následně přečištěn GeneJet Gel Extraction Kit (Thermo Scientific). Takto přečištěné amplikony byly dále reamplifikovány a následně separovány v 2% agarozovém gelu. Tyto fragmenty byly vyříznuty a znovu čišťeny GeneJet Gel Extraction Kit (Thermo Scientific).

4.6 Statistická analýza

Získávání dat z kapilární elektroforézy bylo provedeno pomocí Data Collection Software v.3.1.0 (Life Technologies). Zpracování dat z fragmentační analýzy proběhlo v programu GeneMapper v.4.1 (Life Technologies), který umožňuje určit velikosti jednotlivých amplikonů na základě jejich mobility a převést je pomocí nastavených parametrů na alely. V případě sekvenčních dat byl proveden import do programu Variant Reporter v.1.1 (Life Technologies) s následnou analýzou zahrnující hodnocení kvality sekvenovaných produktů, jejich alignment a identifikaci variant oproti referenční sekvenci. Referenční sekvence studovaných lokusů byly získány z databáze GenBank, která je součástí NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) nebo Ensembl (<http://www.ensembl.org/index.html>). K hledání nukleotidového dotazu omezeného na psí genom byl použit program BLASTN v.2.2.26+ (Camacho et al., 2008).

Základní populační parametry v podobě počtu alel (k), hodnot heterozygotnosti pozorované (H_O), heterozygotnosti očekávané (H_E) a polymorfního informačního indexu (PIC) byly spočítány v programu Cervus v.3.0.3 (Kalikowski et al., 2007). Tento program byl rovněž použit k ověření předpokladu H-W rovnováhy, odhadu výskytu nulové alely a vyhledání shodných genotypů. Výpočet inbredních koeficientů a párové porovnání F_{ST} pomocí AMOVy na základě 9999 permutací bylo provedeno v programu GenAlEx v6.501 (Peakall a Smouse, 2006; 2012). Testování rozdílů mezi populacemi psích plemen a vlků pomocí Kruskal-Wallisovy ANOVy spolu s rozklíčováním populační struktury PCA (analýza hlavních komponent) a CLU (hierarchické shlukování) metodou bylo provedeno v programu STATISTICA 64 v.13 (Dell Inc.). Jako input pro CLU analýzu sloužila D_a vzdálenostní matice dle Nei et al. (1983) vytvořená v programu Populations v.1.2.3.0 (vyvinutý O. Langellou, volně dostupný na <http://bioinformatics.org/~tryphon/populations/>). Výběr nejvhodnější shlukovací metody byl proveden porovnáním hodnot kofenetického korelačního koeficientu (CC) a parametrů $\Delta(0,5)$ a (1) spočítaných v programu NCSS (Hintze, 2001).

K alternativnímu odhadu počtu genetických skupin byl použit program STRUCTURE v.2.3.3 (Pritchard et al., 2000) s volbou tzv. admixture modelu a korelovanými frekvencemi alel (Falush et al., 2003). Výpočet hodnoty posteriorní pravděpodobnosti $\ln(P)D$ pro příslušné K byl proveden na základě 10^6 MCMC (Markov Chain Monte Carlo) iterací následujících po tzv. burn-in periodě o délce 10^5 MCMC iterací. Pro každé odhadované K (1-6) proběhlo 10 běhů. Výběr nejpravděpodobnější hodnoty K byl proveden s ohledem na průměrnou hodnotu $\ln(P)D$ a hodnotu parametru ΔK , který navrhl jako vhodnější ad-hoc

ukazatel populační struktury Evanno et al. (2005). Souhrnné zpracování všech běhů, výpočet průměru $\ln(P)D$, hodnoty ΔK a úprava dat pro následnou analýzu byla udělána s pomocí webového programu Structure Harvester v0.6.94 (Earl a vonHoldt, 2011) dostupného na <http://taylor0.biology.ucla.edu/structureHarvester/>. Jelikož proběhlo pro každé K 10 běhů a výsledek každého běhu je trochu odlišný, bylo zapotřebí vytvořit konsensus Q matici v programu CLUMPP v1.1.2 (Jacobsson a Rosenberg, 2007). K určení optimálního párování matic byl použit „greedy“ algoritmus analyzující celkem 10^6 náhodně vybraných matic. Tvorba výsledného sloupcového grafu byla provedena v programu DISTRICT v.1.1 (Rosenberg, 2004).

5 Výsledky

5.1 Optimalizace genotypovacího procesu

5.1.1 Sekvenační primery

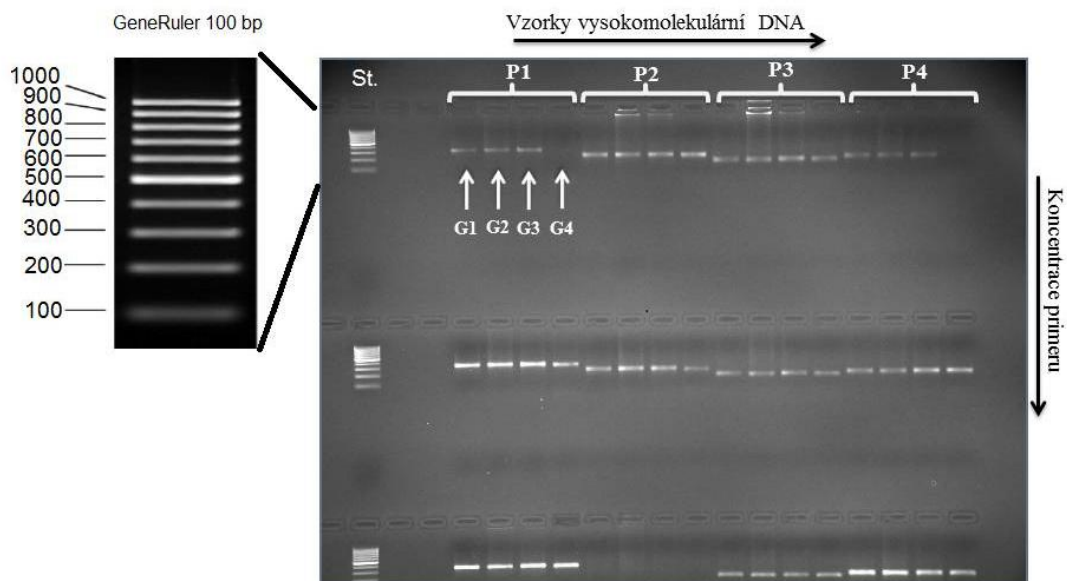
Před zamýšlenou sekvenací všech detekovaných alel byla provedena testovací sekvenační série pro každý lokus s využitím původních primerů dle Asch et al. (2009), které se využívaly pro fragmentační analýzu. Vzhledem k nízké kvalitě testovaných sekvencí v důsledku malé vzdálenosti F a R primerů od mikrosatelitního motivu, bylo nutné navrhnout primery nové, které jsou uvedeny v tabulce 4. Důležitými parametry byly teplota tání (T_m), velikost ampliconu a unikátnost výskytu sekvence v genomu.

Tab. 4 Primery navržené pro sekvenování

STR marker	Chromozom	F primer (5'-3')	R primer (5'-3')
FH3210	CFA02	TCTTGGGAGGAGAGCCAAAC	CCCGAATAGTTGCAGGATGT
FH3241	CFA08	ATCCCAACACCCCTTGACTC	TTGGGCAAAATCAAACTCC
FH2004	CFA11	TATGGAGTGAAAGCCATGGAAC	ACAGACTGAGAATGCTGGGTT
FH2658	CFA14	GCTCCTATATCTGGTTTCTTTCACC	GAAGACGGTTTGGCAGTTTCT
FH4012	CFA15	GGATCTCTGGCCTTGACTT	CGGTATAGCCATTCCCTGAG
REN214L11	CFA16	GCTATGTGATCCGGTGCAGT	TGGGTCTAATGGTTTGGGATAG
FH2010	CFA24	CTCACGTGGTCCCAAGAAG	GAGCATGCATGTACACCAGAA
FH2361	CFA33	TGCTTGAAGGTGAGACTGAA	CTGAGAGTGGGTGCAAGGAG
C38	CFA38	TTGCCTCCATGATCTGTGAATA	TCATGTGTCTGTTGGGCATT

5.1.2 Agarózová elektroforéza

Pro optimalizaci nově navržených primerů byly použity vzorky čtyř (později jen tři) genotypů, které bylo možné získat opakovaně. Připravené vzorky byly nanášeny na gel agarózové horizontální elektroforézy (obr. 15).

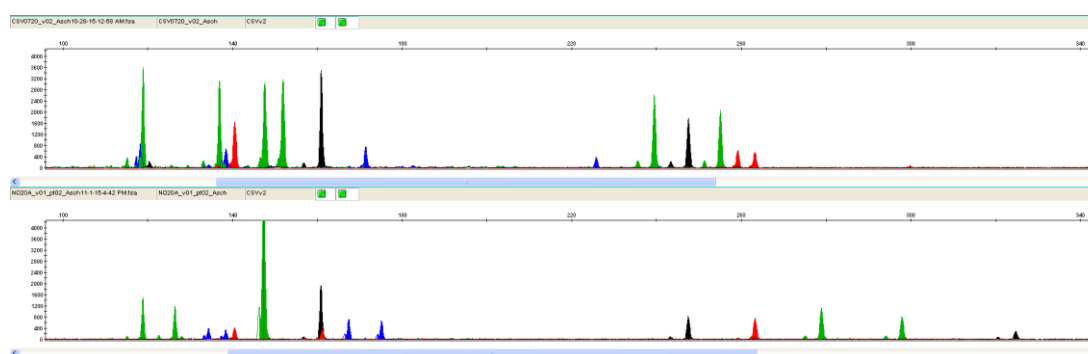


Obr. 15 Agarózová elektroforéza

Ukázka agarózového gelu použitého pro optimalizaci koncentrace primeru v PCR reakci. Jako standard byl použit GeneRuler 100 bp (St.). Vzorky byly naneseny ve čtyřech genotypech (G1-G4) při třech různých koncentracích primerů (P1-P4) v reakci.

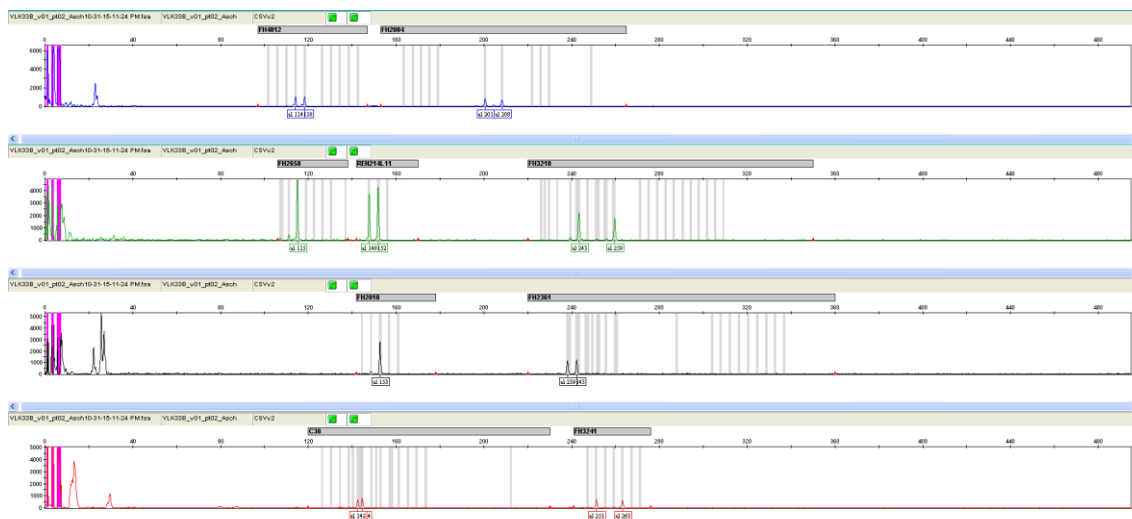
5.1.3 Kapilární elektroforéza

Kvalitní separace jednotlivých fragmentů pomocí kapilární elektroforézy byla zajištěna optimalizací nastavitelných parametrů jakým je doba nástřiku či napětí při nástřiku. Snahou bylo zajistit detekovatelný signál nad hranicí šumu pro všechny testované markery a zároveň, aby nedocházelo ke vzniku tzv. off-scale signálu, který může vést k potenciálním chybám během genotypování. Typický nonaplexový profil je ukázán na příkladu několika genotypů na obrázku 16 a obrázek 17 zachycuje použité binování alel.



Obr. 16 Záznam alel a jejich intenzit signálu v multiplexu.

Primery jsou nasynthetizované s fluorescenční značkou (NED – černá; PET – červená; VIC – zelená; FAM – modrá) a velikostně odlišitelné.



Obr. 17 Ukázka binovacího systému

5.2 Sekvenování

Hlavním cílem sekvenování bylo získání informace o dané mikrosatelitní repetici, která následně umožní označení dané alely dle standardizované nomenklatury. K analýze byl vybrán vzorek genotypů reprezentujících všechny alely detekované na základě fragmentační analýzy. Výsledky automatického zarovnání sekvencí (alignment) úspěšně osekvenovaných PCR produktů jsou uvedeny v kapitole 8. Příloha 10.1 (obr. 22 - 27). Všechny sekvence byly dále zkontrolovány a případně byla provedena manuální korekce. Nalezené standardizované motivy a označení alel *) bylo doplněno k daným lokusům spolu s jejich frekvencemi u testovaných psích plemen a vlků (tab. 6 – tab. 14). V době vypracování diplomové práce se nicméně nepodařilo osekvenovat všechny alely. U těchto alel bylo provedeno odvození standardizovaného značení s využitím informací z fragmentační analýzy a úspěšně osekvenovaných alel. Z tohoto důvodu jsou příslušné alely uvedeny v závorce, jelikož značení lze v této chvíli považovat pouze za orientační.

5.2.1.1 Lokus FH3210

Pro lokus FH3210 bylo celkem nalezeno 24 alel. U všech vzorků dohromady měla největší četnost alela 26.1 o velikosti 272 bp, která se však vyskytovala pouze u psů všech hodnocených plemen. Nejméně zastoupenou alelou byla 18.3 a 21.1 o velikostech 242 bp a 252 bp. Tyto alely se vyskytly pouze u vlků (tab. 5). Dalšími unikátními alelami v definovaném souboru vzorků byly alely 27.1 u německého ovčáka a alely 15, 16.2 a 36.1 u Saarloosova vlčáka. U vlků bylo nalezeno nejvíce (7) jedinečných alel (14.2, 15.2, 18.3, 19,

20, 21.1 a 22.1). Podtržené M nebo S v sekvenci motivu označuje místo, kde došlo k nejednoznačnému vyhodnocení báze. Písmeno M označuje možnost výskytu adeninu nebo cytosinu, zatímco S guaninu či cytosinu.

Tab. 5 Lokus FH3210

Alela [bp]	Alela*	Motiv STR	Frekvence				
			Celkem	NO	CSV	SV	V
225	14.2	(AAGA)AA(AAGA) ₁₂ CAGA	0.0089	-	-	-	0,0577
227	(15)	-	0.0089	-	-	0,0512	-
229	15.2	(AAGA)AA(AAGA) ₁₄	0.0296	-	-	-	0,1923
233	16.2	(AAGA)AA(AAGA) ₁₅	0.0355	-	-	0,2247	-
239	18	(AAGA) ₁₄ GAGA(AAGA) ₃	0.0651	-	0,0706	0,1829	-
242	(18.3)	-	0.0030	-	-	-	0,0192
243	19	(AAGA) ₁₅ GAGA(AAGA) ₃	0.0325	-	-	-	0,2115
247	(20)	-	0.0030	-	-	-	0,0192
251	21	(AAGA) ₁₇ GAGA(AAGA) ₃	0.0207	0,0357	-	-	0,0962
252	(21.1)	-	0.0030	-	-	-	0,0192
255	22	(AAGA) ₁₈ GAGA(AAGA) ₂ <u>M</u> AAGA	0.1568	-	0,2647	0,0168	0,1346
256	22.1	(AAGA)AA(AAGA) ₂₀ AGA	0.0059	-	-	-	0,0385
259	(23)	-	0.0207	-	0,0059	-	0,1154
272	26.1	(AAGA)AA(AAGA) ₁₀ <u>A</u> SA(AAGA) ₁₄	0.1864	0,0893	0,3235	0,0500	-
276	(27.1)	-	0.0148	0,0893	-	-	-
280	(28.1)	-	0.0296	0,1071	-	0,0667	-
284	(29.1)	-	0.0680	0,1071	0,0529	0,0833	0,0577
288	(30.1)	-	0.0118	0,0536	0,0059	-	-
292	31.1	(AAGA)AA(AAGA) ₁₂ AGA(AAGA) ₁₇	0.0769	0,1786	0,0941	-	-
296	(32.1)	-	0.0266	0,0893	0,0235	-	-
300	(33.1)	-	0.0680	0,1786	0,0647	-	0,0385
302	(34.1)	-	0.0710	0,0357	0,0882	0,1167	-
308	(35.1)	(AAGA)AA(AAGA) ₁₄ AGA(AAGA) ₁₇ <u>M</u> AAGA	0.0089	0,0357	0,0059	-	-
312	(36.1)	-	0.0444	-	-	0,2464	-

Vysvětlivky: CSV – československý vlčák; SV – Saarloosův vlčák, NO – německý ovčák; V – vlk.

M - A+C; S - G+C.

5.2.1.2 Lokus FH3241

V tomto lokusu bylo detekováno celkem 7 alel (tab. 6). Nejvíce zastoupenou alelou byla alela 12 o velikosti 263 bp a vyskytovala se u všech skupin. U československých vlčáků byla tato alela zastoupena u více než poloviny jedinců. Nejméně byly zastoupeny alely 13 (267 bp) a 14 (279 bp), jež se vyskytovaly pouze u vlků (tab. 6). Dalšími jedinečnými alelami byla 11, která byla identifikována pouze u německého ovčáka, a alela 8 u Saarloosova vlčáka.

Tab. 6 Lokus FH3241

Alela [bp]	Alela*)	Motiv STR	Frekvence				
			Celkem	NO	CSV	SV	V
107	11	(GAAA) ₁₁	0,0473	-	-	0,0333	0,2692
111	12	(GAAA) ₁₂	0,1657	0,0179	0,1176	0,3833	0,2308
115	13	(GAAA) ₁₃	0,1627	0,0536	0,2353	-	0,2308
119	14	(GAAA) ₁₄	0,4053	0,5179	0,4706	0,3667	0,1154
123	15	(GAAA) ₁₅	0,0680	0,1964	0,0294	0,1167	-
127	16	(GAAA) ₁₆	0,0858	0,1964	0,0706	0,1000	-
131	(17)	-	0,0030	0,0179	-	-	-
137	(18.2)	-	0,0621	-	0,0764	-	0,1538

Vysvětlivky: CSV – československý vlčák; SV – Saarloosův vlčák, NO – německý ovčák; V – vlk.

5.2.1.3 Lokus FH2004

Pro lokus FH2004 bylo nalezeno 11 alel (tab. 7), přičemž alela 12 (167 bp) byla nejčastěji zastoupena. Nejméně se vyskytovaly alely 26 (223 bp) a 33 (251 bp), které byly unikátní spolu s alelou 20.2 a 22.2 pro vlky. U německého ovčáka byla detekována unikátní alela 15.

Tab. 7 Lokus FH2004

Alela [bp]	Alela*	Motiv STR	Frekvence				
			Celkem	NO	CSV	SV	V
163	11	(AAAG) ₁₁	0,1065	-	0,0059	0,5833	-
167	12	(AAAG) ₁₂	0,4112	0,6071	0,5118	0,2167	0,0962
171	13	(AAAG) ₁₃	0,0858	0,1071	0,0353	0,2000	0,0962
175	14	(AAAG) ₁₄	0,0947	0,2143	0,0765	-	0,1346
179	(15)	-	0,0118	0,0714	-	-	-
201	20.2	(AAAG) ₁₀ AG(AAAG) ₁₀	0,0059	-	-	-	0,0385
208	22.2	(AAAG) ₁₁ AG(AAAG) ₁₁	0,0148	-	-	-	0,0962
223	(26)	-	0,0030	-	-	-	0,0192
227	27	(AAAG) ₁₀ AA(AAAG) ₄ AA(AAAG)GAAG(AAAG) ₁₀	0,1864	-	0,2882	-	0,2692
231	(28)	-	0,0769	-	0,0824	-	0,2308
251	(33)	-	0,0030	-	-	-	0,0192

Vysvětlivky: CSV – československý vlčák; SV – Saarloosův vlčák, NO – německý ovčák; V – vlk.

5.2.1.4 Lokus FH2658

Pro lokus FH2658 bylo identifikováno 8 alel. Nejčastěji byla zastoupena alela 14 o 119 bp, nejméně pak alela 17 o 131 bp, jež se vyskytovala pouze u německého ovčáka (tab. 8).

Tab. 8 Lokus FH2658

Alela [bp]	Alela*	Motiv STR	Frekvence				
			Celkem	NO	CSV	SV	V
107	11	(GAAA) ₁₁	0,0473	-	-	0,0333	0,2692
111	12	(GAAA) ₁₂	0,1657	0,0179	0,1176	0,3833	0,2308
115	13	(GAAA) ₁₃	0,1627	0,0536	0,2353	-	0,2308
119	14	(GAAA) ₁₄	0,4053	0,5179	0,4706	0,3667	0,1154
123	15	(GAAA) ₁₅	0,0680	0,1964	0,0294	0,1167	-
127	16	(GAAA) ₁₆	0,0858	0,1964	0,0706	0,1000	-
131	(17)	-	0,0030	0,0179	-	-	-
137	(18.2)	-	0,0621	-	0,0764	-	0,1538

vysvětlivky: CSV – československý vlčák; SV – Saarloosův vlčák, NO – německý ovčák; V – vlk.

5.2.1.5 Lokus FH4012

Pro lokus FH4012 bylo identifikováno 10 alel. Nejčastěji se vyskytovala alela 15 (118 bp) a nejméně alela 21 (142 bp), tato alela se vyskytovala pouze u NO. Další jedinečné alely se vyskytovaly u vlků (alely 11 a 12), jak uvádí tabulka 9.

Tab. 9 Lokus FH4012

Alela [bp]	Alela*)	Motiv STR	Frekvence				
			Celkem	NO	CSV	SV	V
102	11	(TTTC) ₁₀ (TTTT)	0,0325	-	-	-	0,2115
106	(12)	-	0,0148	-	-	-	0,0962
110	(13)	-	0,0680	-	-	0,3333	0,0577
114	(14)	-	0,0292	-	-	0,0167	0,1731
118	15	(TTTC) ₁₄ (TTTT)	0,3550	0,0357	0,6000	0,0500	0,2500
126	(17)	-	0,0207	0,0179	-	0,0333	0,0769
130	18	(TTTC) ₁₈	0,0680	0,1786	0,0353	-	0,1346
134	19	(TTTC) ₁₉	0,3107	0,4286	0,3059	0,4833	-
138	20	(TTTC) ₂₀	0,0917	0,2857	0,0588	0,0833	-
142	(21)	-	0,0089	0,0536	-	-	-

Vysvětlivky: CSV – československý vlčák; SV – Saarloosův vlčák, NO – německý ovčák; V – vlk.

5.2.1.6 Lokus REN214L11

V tomto lokusu byly nalezeny pouze 3 alely, z nichž nejčastěji zastoupenou byla alela 6 o 148 bp (tab. 10). Jedná se tak o nejméně polymorfní lokus ze všech testovaných.

Tab. 10 Lokus REN214L11

Alela [bp]	Alela*)	Motiv STR	Frekvence				
			Celkem	NO	CSV	SV	V
148	6	(GAAT) ₆	0,5828	0,8571	0,5059	0,8000	0,2885
152	7	(GAAT) ₇	0,3462	0,1071	0,4471	0,1500	0,5000
156	8	(GAAT) ₈	0,0710	0,0357	0,0471	0,0500	0,2115

Vysvětlivky: CSV – československý vlčák; SV – Saarloosův vlčák, NO – německý ovčák; V – vlk.

5.2.1.7 Lokus FH2010

Pro lokus FH2010 bylo nalezeno 5 alel. Nejčastěji se vyskytující alelou byla 10 (153 bp) a nejméně pak 8 (145 bp) (tab. 11).

Tab. 11 Lokus FH2010

Alela [bp]	Alela*)	Motiv STR	Frekvence				
			Celkem	NO	CSV	SV	V
145	8	(TTCA) ₈	0,0030	-	-	0,2167	0,0192
149	9	(TTCA) ₉	0,2426	0,4464	0,2235	-	0,1154
153	10	(TTCA) ₁₀	0,4083	0,1964	0,2412	0,7167	0,8269
157	(11)	-	0,0888	0,0179	0,1471	0,0500	0,0192
161	12	(TTCA) ₁₂	0,2574	0,3393	0,3882	0,0167	0,0192

Vysvětlivky: CSV – československý vlčák; SV – Saarloosův vlčák, NO – německý ovčák; V – vlk.

5.2.1.8 Lokus FH2361

Pro lokus FH2361 bylo nalezeno 22 alel. Nejčastěji byla zastoupena alela 16 (248 bp). Nejméně pak alely 16.2 (250 bp) a 26 (288 bp), které se vyskytovaly pouze u německých ovčáků. Pro československé vlčáky byly jedinečné alely 14 a 18, pro Saarloosova vlčáka byla unikátní alela 17.1 a pro vlky alely 13.3, 14.3, 15.3, 19 a 19.1 (tab. 12).

Tab. 12 Lokus FH2361

Alela [bp]	Alela*	Motiv STR	Frekvence				
			Celkem	NO	CSV	SV	V
239	(13.3)	-	0,0059	-	-	-	0,0385
240	(14)	-	0,1627	-	0,3235	-	-
243	(14.3)	-	0,0089	-	-	-	0,0577
244	15	(TTTC) ₁₅	0,0769	0,2143	0,0176	-	0,2115
247	(15.3)	-	0,0237	-	-	-	0,1538
248	16	(TTTC) ₁₅ (TTTG)	0,2012	0,4107	0,1765	0,0500	0,2308
250	(16.2)	-	0,0030	0,0179	-	-	-
252	17	(TTTC) ₁₇	0,0710	0,1071	0,1000	-	0,0192
253	17.1	(TTTC) ₁₅ T(TTTC)TTTG	0,0059	-	-	0,0333	-
256	(18)	-	0,0089	-	0,0176	-	-
260	(19)	-	0,0089	-	-	-	0,0577
261	19.1	(TTTC) ₁₇ T(TTTC)TTTG	0,0325	-	-	-	0,2115
288	(26)	-	0,0030	0,0179	-	-	-
304	(30)	-	0,0296	-	0,0294	0,0833	-
308	(31)	-	0,0089	-	0,0118	0,0167	-
312	(32)	-	0,0503	0,0179	0,0882	0,0167	-
316	33	(TTTC) ₃₂ (TTTG)	0,0237	0,0893	0,0118	0,0167	-
320	34	(TTTC) ₃₃ (TTTG)	0,0799	-	0,0824	0,2000	0,0192
324	(35)	-	0,0976	0,0893	0,1000	0,1833	-
328	(36)	-	0,0503	-	0,0294	0,2000	-
332	(37)	-	0,0325	0,0179	-	0,1667	-
336	38	(TTTC) ₃₇ (TTTG)	0,0148	0,0179	0,0118	0,0333	-

Vysvětlivky: CSV – československý vlčák; SV – Saarloosův vlčák, NO – německý ovčák; V – vlk.

5.2.1.9 Lokus C38

Pro lokus C38 bylo nalezeno 18 alel, z nichž nejčastěji byla zastoupena alela 13.2 (140 bp). Nejméně se vyskytovaly alely 14 (142 bp), 14.1 (143 bp) a 30.3 (211 bp), které byly nalezeny pouze u vlků. Pro vlky byly jedinečné i alely 10, 11, 16 a 17.3. Další unikátní alely byly nalezeny u německých ovčáků (15.2, 17.2 a 21.2) (tab. 13).

Tab. 13 Lokus C38

Alela [bp]	Alela*	Motiv STR	Frekvence				
			Celkem	NO	CSV	SV	V
126	10	(TTCT) ₁₀	0,0237	-	-	-	0,1538
130	(11)	(TTCT) ₁₁	0,0237	-	-	-	0,1538
134	12	-	0,0651	-	0,0235	0,3000	-
138	13	(TTCT) ₁₃	1036	-	0,0059	0,5667	-
140	13.2	(TTCT) ₁₂ TT(TTCT)	0,2426	0,2857	-	0,1333	0,0385
142	(14)	-	0,0030	-	-	-	0,0192
143	(14.1)	-	0,0030	-	-	-	0,0192
144	(14.2)	(TTCT) ₁₃ TT(TTCT)	0,2130	-	0,3000	-	0,4038
148	15.2	(TTCT) ₁₄ TT(TTCT)	0,0296	0,1786	-	-	-
150	(16)	-	0,0089	-	-	-	0,0577
152	16.2	(TTCT) ₁₅ TT(TTCT)	0,0473	0,0714	0,0588	-	0,0385
156	(17.2)	-	0,0148	0,0893	-	-	-
157	17.3	(TTCT) ₁₅ TCT(TTCT) ₂	0,0089	-	-	-	0,0577
160	(18.2)	-	0,0148	0,0714	-	-	0,0192
164	19.2	(TTCT) ₁₈ TT(TTCT)	0,1065	0,1786	0,1529	-	-
168	20.2	(TTCT) ₁₉ TT(TTCT)	0,0799	0,0714	0,1294	-	0,0192
172	(21.2)	-	0,0089	0,0536	-	-	-
211	(30.3)	-	0,0030	-	-	-	0,0192

Vysvětlivky: CSV – československý vlčák; SV – Saarloosův vlčák, NO – německý ovčák; V – vlk.

5.3 Charakterizace psích plemen a vlků populačními deskriptory

5.3.1 Intrapopulační variabilita

K základnímu popisu genetické diversity jednotlivých psích plemen a vlků byly použity klasické populační deskriptory v podobě heterozygotnosti pozorované (H_0), heterozygotnosti očekávané (H_E) a polymorního informačního indexu (PIC). Zároveň bylo provedeno ověření tzv. Hardy-Weinbergovy rovnováhy (HW) pro každý lokus u jednotlivých plemen a vlků, což je jeden ze základních předpokladů bayesovských shlukovacích modelů. K doplnění informace o testovaných lokusech byl rovněž udělán odhad výskytu nulové alely (F_{null}) u sledovaných psích plemen a vlků.

Celkem bylo identifikováno 108 alel, přičemž jejich počet se pohyboval v rozmezí 3 až 24 na lokus. Nejvíce alel bylo nalezeno pro lokus FH3210, nejméně pak pro lokus REN214L11, což bylo v souladu s výsledky genetické diversity v podobě pozorované heterozygotnosti a polymorního informačního indexu, protože nejvyšších hodnot bylo dosaženo pro lokus FH3210, zatímco nejnižších u REN214L11. Průměrné hodnoty k (12), H_0 (0,6732) a PIC (0,7335) ukazují na celkově vysokou variabilitu ve sledovaném souboru genotypů. Detailní informace ohledně těchto deskriptorů pro všechny vzorky dohromady a pro jednotlivá plemena spolu s vlky uvádí tabulky 14-18.

Lokus	k	N	Ho	PIC
FH3210	24	169	0,870	0,901
FH3241	7	169	0,574	0,677
FH2004	11	169	0,556	0,736
FH2658	8	169	0,716	0,736
FH4012	10	169	0,686	0,723
REN214L11	3	169	0,444	0,449
FH2010	5	169	0,604	0,646
FH2361	22	169	0,840	0,888
C38	18	169	0,769	0,844

Tab. 14 Souhrnné výsledky pro vybrané populační parametry

Vysvětlivky: k - počet alel, N - počet jedinců, H_0 - heterozygotnost pozorovaná, PIC - polymorní informační index

U československých vlčáků bylo nalezeno celkem 58 alel. Nejvyšší polymorfismus vykázal lokus FH2361 s 13 detekovanými alelami a nejméně lokus REN214L11 s pouhými třemi alelami. U tohoto plemene byly nalezeny pouze 2 unikátní alely, což je celkově nejmenší počet ze všech sledovaných skupin. Jak lze názorně demonstrovat na příkladu ČSV, genetická diverzita nezávisí pouze na počtu alel, ale i jejich frekvenci, jelikož nejvyššího H_o bylo dosaženo pro lokus FH3210 (11 alel) a nikoliv pro lokus FH2361 (13 alel). Srovnání rovněž nabízí lokusy FH2004 a FH2658, které mají shodně po šesti alelách, ale výrazně se liší hodnotou H_o (0,588 vs 0,718). S tímto poznatkem korespondují i hodnoty PIC (tab. 15).

Tab. 15 Výbrané výsledky pro československé vlčáky

Lokus	k	H_o	H_E	PIC	HW	F(null)
FH3210	11	0,847	0,801	0,770	NS	-0,0314
FH3241	4	0,612	0,600	0,555	NS	-0,0194
FH2004	6	0,588	0,645	0,588	NS	+0,0458
FH2658	6	0,718	0,702	0,659	NS	-0,0112
FH4012	4	0,588	0,545	0,470	NS	-0,0131
REN241L11	3	0,459	0,545	0,438	NS	+0,0868
FH2010	4	0,765	0,724	0,670	NS	-0,0328
FH2361	13	0,812	0,832	0,809	NS	+0,0123
C38	7	0,824	0,762	0,719	NS	-0,0453
Průměr	6,4	0,690	0,684	0,631		
Medián	6,0	0,718	0,702	0,659		

Vysvětlivky: k - počet alel, H_o - heterozygotnost pozorovaná, H_E - heterozygotnost očekávaná, PIC - polymorfní informační index, HW - Hardy-Weinbergova rovnováha, F (null) – frekvence nulové alely, NS – není signifikantní, ND – netestováno (malý počet jedinců v dané kategorii)

U německých ovčáků bylo pro dané lokusy nalezeno 55 alel, z toho 9 bylo privátních pouze pro NO, což je nejvyšší počet u srovnávaných psích plemen. Nejvíce alel (11) se vyskytovalo v lokusu FH3210, nejméně (3) pak v lokusech REN214L11 a FH3241 (tab. 16).

Tab. 16 Vybrané výsledky pro německé ovčáky

Lokus	k	H _o	H _E	PIC	HW	F(null)
FH3210	11	0,929	0,899	0,871	ND	-0,0277
FH3241	3	0,321	0,428	0,373	NS	+0,1215
FH2004	4	0,500	0,579	0,521	NS	+0,0830
FH2658	6	0,679	0,663	0,604	NS	-0,0406
FH4012	6	0,714	0,711	0,649	NS	+0,0005
REN241L11	3	0,286	0,256	0,234	ND	-0,0707
FH2010	4	0,536	0,658	0,576	NS	+0,0997
FH2361	10	0,929	0,770	0,728	NS	-0,1254
C38	8	0,857	0,844	0,808	NS	-0,0227
Průměr	6,1	0,639	0,645	0,596		
Medián	6,0	0,679	0,663	0,604		

Vysvětlivky: k - počet alel, H_o - heterozygotnost pozorovaná, H_E - heterozygotnost očekávaná, PIC - polymorfni informační index, HW - Hardy-Weinbergova rovnováha, F (null) – frekvence nulové alely, NS – není signifikantní

U Saarloosova vlčáka bylo identifikováno celkem 47 alel, přičemž 5 jich bylo unikátních pouze pro toto plemeno. Nejvíce alel (11) pak bylo nalezeno pro lokus FH2361. Nejméně pak pro FH3241, FH2004, REN214L11 a C38 (3). Nižší počty alel tak odpovídají i nejnižšímu průměrnému počtu alel na lokus (5,2) v rámci testovaných skupin. Zajímavým poznatkem je, že u většiny lokusů byla heterozygotnost pozorovaná vyšší než očekávaná (tab. 17).

Tab. 17 Vybrané výsledky pro Saarloosovy vlčáky

Lokus	k	H _o	H _E	PIC	HW	F(null)
FH3210	9	0,933	0,854	0,820	NS	-0,0529
FH3241	3	0,667	0,627	0,542	NS	-0,0535
FH2004	3	0,567	0,582	0,510	NS	+0,0181
FH2658	5	0,800	0,706	0,640	NS	-0,0736
FH4012	6	0,900	0,655	0,585	NS	-0,1832
REN241L11	3	0,400	0,341	0,303	NS	-0,1044
FH2010	4	0,467	0,444	0,385	NS	-0,0330
FH2361	11	1,000	0,860	0,828	NS	-0,0862
C38	3	0,633	0,581	0,499	NS	-0,0486
Průměr	5,2	0,707	0,628	0,568		
Medián	4,0	0,667	0,627	0,542		

Vysvětlivky: k - počet alel, H_o - heterozygotnost pozorovaná, H_E - heterozygotnost očekávaná, PIC - polymorfní informační index, HW - Hardy-Weinbergova rovnováha, F (null) – frekvence nulové alely, NS – není signifikantní

Nejvariabilnější skupině, a to vlčí, odpovídá i nejvyšší počet nalezených alel (68) a zároveň největší počet unikátních alel (28), což je 3x více ve srovnání s NO a stéměř o polovinu více oproti všem psím plemenům dohromady. Z hlediska jednotlivých lokusů bylo nejvíce identifikovaných alel v lokusech FH3210 a C38, opět typicky nejméně pro lokus REN214L11 (tab. 18).

Tab. 18 Vybrané výsledky výsledků pro vlky

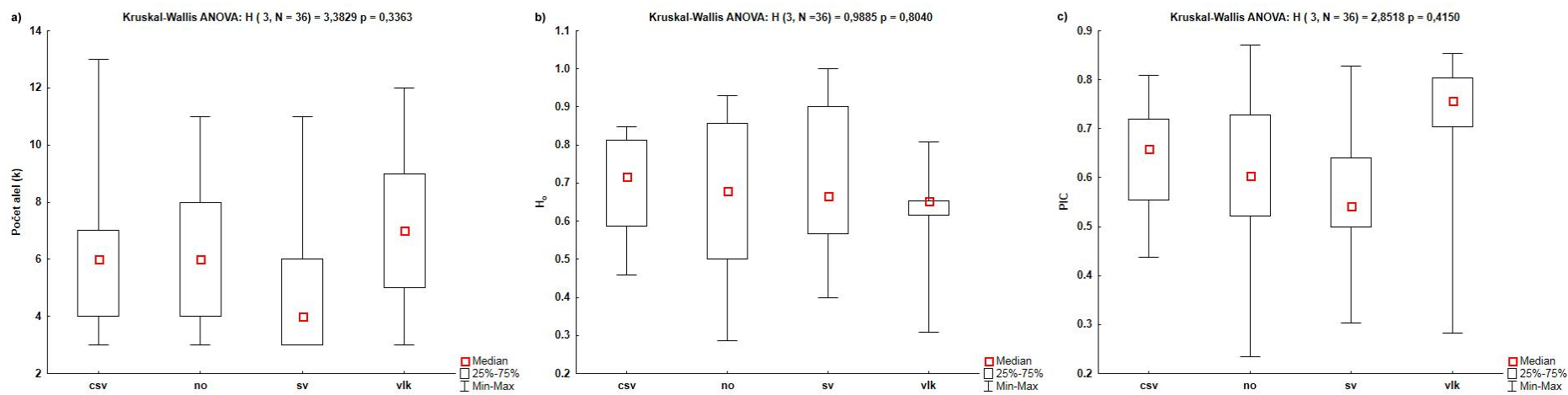
Lokus	k	H ₀	H _E	PIC	HW	F(null)
FH3210	12	0,808	0,884	0,853	NS	+0,0336
FH3241	6	0,615	0,753	0,704	NS	+0,0790
FH2004	9	0,500	0,842	0,805	***	+0,2581
FH2658	5	0,654	0,799	0,749	NS	+0,0863
FH4012	7	0,731	0,842	0,803	NS	+0,0657
REN241L11	3	0,615	0,634	0,551	NS	-0,0013
FH2010	5	0,308	0,308	0,282	ND	+0,0156
FH2361	9	0,654	0,841	0,801	**	+0,1206
C38	12	0,654	0,793	0,757	NS	+0,0946
Průměr	7,6	0,615	0,744	0,701		
Medián	7,0	0,654	0,799	0,757		

Vysvětlivky: k - počet alel, H₀ - heterozygotnost pozorovaná, H_E - heterozygotnost očekávaná, PIC - polymorfni informační index, HW - Hardy-Weinbergova rovnováha, F (null) – frekvence nulové alely, NS – není signifikantní, ND – netestováno (malý počet jedinců v dané kategorii, ** p<0,01 , ***p<0,001.

Pomocí Kruskal-Wallisovy ANOVy bylo testováno, zda existují pro dané skupiny statisticky signifikantní rozdíly v počtu alel, H₀ a PIC. Na základě výsledků jednotlivých testů (obr. 18a-c), doplněných informacemi o rozložení hodnot datového souboru ve formě krabicového grafu, byla přijata nulová hypotéza, že mezi jednotlivými skupinami neexistují statisticky významné rozdíly pro žádný ze sledovaných ukazatelů (p = 0,3363-0,804) a skupiny tudíž vykazují obdobnou variabilitu.

Součástí analýzy bylo i ověření předpokladu H-W rovnováhy v populaci a s tím i související testování možného výskytu nulové alely. Protože toto hodnocení postrádá smysl v případě všech genotypů dohromady, bylo testování provedeno pouze u jednotlivých skupin psích plemen a vlků. Důsledkem tohoto členění bylo razantní snížení počtu jedinců ve skupině, a proto u některých lokusů dané skupiny nebylo možné platnost H-W zákona ověřit. S výjimkou dvou lokusů (FH2004 a FH2361) u vlčí skupiny nebyla nalezena statisticky signifikantní odchylka od H-W rovnováhy (tab. 15 - 18). Pro lokus FH2361 byl detekován statisticky signifikantní rozdíl na hladině významnosti $\alpha = 0,01$ a pro lokus FH2004 dokonce

na hladině významnosti $\alpha = 0,001$. Příčina spočívala v populační struktuře vlků (viz. kapitola 5.3 Studium populační struktury vybraných psích plemen a vlků), protože pokud byla vlčí skupina rozdělena na vlky dle lokalit, pak ani v jednom z těchto lokusů nebyl nalezen statisticky signifikantní rozdíl pro H-W rovnováhu. Výskyt nulové alely signalizuje vysoká kladná hodnota $F(\text{null})$ ukazatele. Takovýto případ byl detekován pouze u vlčí populace pro lokus FH2004, kde byla vypočtená hodnota 0,2581. Následná korekce respektující populační strukturu vlků dle lokalit překvapivě vedla k přesně opačnému výsledku, jelikož pro vlky z maďarské lokality byla spočítaná hodnota $F(\text{null})$ ještě vyšší (0,3414). Vzhledem k malému počtu vlků z německo-rakouské lokality nemohlo být provedeno testování na výskyt nulové alely.



Obr. 18 Krabicové grafy doplněné o výsledek analýzy Kruskal-Wallisovy ANOVy

5.3.2 Interpopulační variabilita

K hodnocení různých zdrojů variability uvnitř a mezi jednotlivými psími plemeny a vlky byly použity F koeficienty neboli ukazatele inbreedingu (F_{IS} , F_{ST} a F_{IT}). Statistická významnost párových diferencí F_{ST} u daných populací byla hodnocena pomocí AMOVy na základě permutační procedury. Nízká hodnota F_{IS} (0,005) naznačila vysokou míru variability pro jedince dané populace. Analýza ukázala, že ze statistického hlediska se hodnota F_{IS} signifikantně neliší od 0 ($p = 0,345$). Na základě daného výsledku byla přijata nulová hypotéza, že podobnost jedinců v rámci skupiny odpovídá předpokladu náhodného křížení v populaci. Naproti tomu míra genetické diferenciace mezi populacemi udávaná pomocí F_{ST} koeficientu vyšla statisticky významná ($F_{ST} = 0,169$, $p = 0,000$). Detailnější analýza párových hodnot F_{ST} ukázala, že tyto rozdíly jsou významné dokonce pro libovolné dvě srovnávané populace ($F_{ST} = 0,134 - 0,204$, $p = 0,000$). Z tabulky 19 je patrné, že největší míra diferenciace je mezi skupinou SV vůči všem ostatním skupinám. U ČSV byla získána stejná hodnota míry diferenciace ($F_{ST} = 0,134$) jak proti NO, tak proti vlkům. Celková hodnota inbrídingu jedince vyjádřená jako F_{IT} , která zahrnuje celkový vliv nenáhodného křížení v subpopulaci a míru genetické diferenciace mezi subpopulacemi, vyšla jako statisticky významná ($F_{IT} = 0,174$, $p = 0,000$).

Tab. 19 Výsledné hodnoty F_{ST} na základě párového srovnání

CSV	NO	SV	V	
0,000	0,000	0,000	0,000	CSV
0,134	0,000	0,000	0,000	NO
0,204	0,189	0,000	0,000	SV
0,134	0,204	0,198	0,000	V

Vysvětlivky: hodnoty pod diagonálou ukazují hodnotu F_{ST} pro příslušnou dvojici populací, hodnoty nad diagonálou udávají pravděpodobnost.

5.4 *Studium populační struktury vybraných psích plemen a vlků*

K odhalení populační struktury byly použity odlišné matematické metody řazené mezi klasické vícerozměrné metody jako je analýza hlavních komponent (PCA – Principle Component Analysis) a hierarchická shluková analýza (dále jako CLU) v kombinaci s modelovým přístupem založeným na bayesovské statistice (STRUCTURE).

U PCA metody byly testovány dva modely založené na projekci do dvou popř. tří hlavních komponent (PC1-3). Ve finále byla vybrána projekce do tří komponentních os. Pomocí tří hlavních komponent bylo dohromady vysvětleno 19,02 % veškeré variability v datech. Obrázek 20 zobrazuje tzv. graf komponentního skóre ukazující polohu jednotlivých genotypů. Pro zvýšení přehlednosti jsou ukázány jak projekce do jednotlivých PC os (a-c), tak celková projekce pomocí 3D grafu (d). Jak je z obrázku patrné, došlo k vytvoření 4 popř. 5 poměrně jednoznačně diferencovaných skupin. První hlavní komponenta oddělila vlky (VLK) od všech psích plemen, PC2 vymeziila skupinu Saarlosových vlčáků (SV) od německých ovčáků (NO) a československých vlčáků (ČSV) a poslední hlavní komponenta (PC3) umožnila odlišení NO a ČSV. V rámci vlčího souboru se navíc pravděpodobně projevil původ vlčích jedinců, jelikož z projekce PC1-PC3 lze vypozaovat dvě skupiny. Jak ukázala další analýza, PCA jako jediná metoda navíc dokázala klasifikovat vlky dle původu na vlky z Německa či Rakouska (spodní část grafu) a vlky z Maďarska popř. Srbska (horní část grafu). Vlčí vzorky tak tvoří nejvariabilnější skupinu ze všech. Někteří jedinci, pro zjednodušení popisu označeni jako vlci (vzorky VLK25,27-29), jsou ve skutečnosti kříženci F1 a F2 generace mezi německým ovčákem a kanadským vlkem, vyšli nejpodobnější československým vlčákům. Další genotyp s označením KK694 nespádá ani do jedné z uvedených skupin. Obdobné výsledky byly získány i pomocí dalších metod (viz. níže).

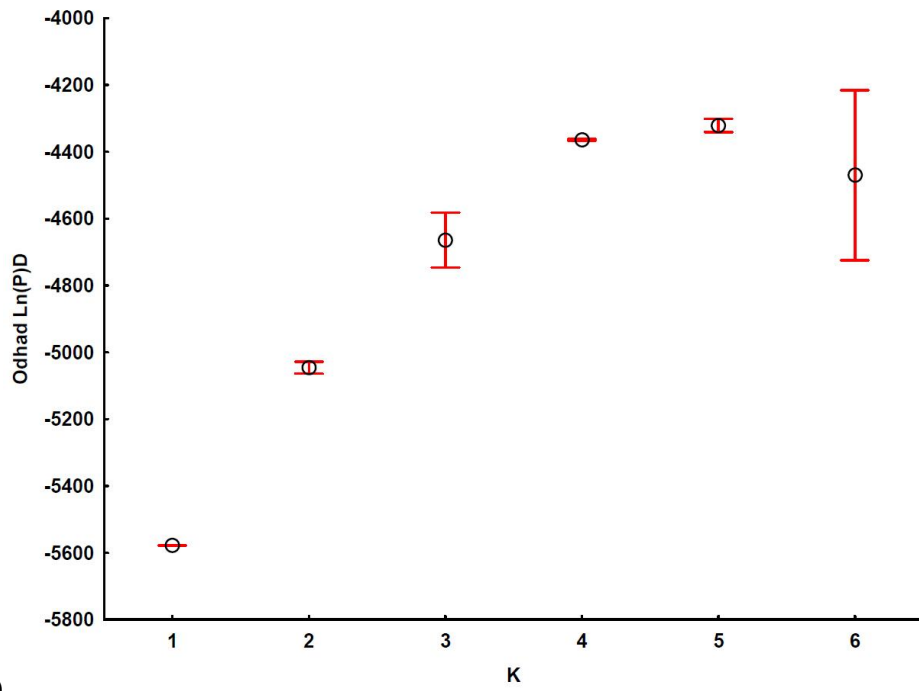
Další použitou metodou byla shluková analýza. Prvním krokem byla volba nejvhodnější shlukovací metody, která byla provedena na základě hodnot kofenetického korelačního koeficientu (CC) a parametrů Δ (0,5) a Δ (1). Nejvyšší hodnoty CC (0,7685) bylo dosaženo pro metodu neváženého průměru skupiny dvojic (UPGMA) a zároveň nejnižších hodnot Δ (0,5) a (1), jak je patrné z tabulky 20. Obdobně jako u PCA metody byly genotypy rozděleny do čtyř skupin, které jsou barevně odlišeny na obrázku 21a. V případě CLU analýzy byli rovněž správně identifikováni kříženci F1 a F2 generace přiřazením ke skupině ČSV. Naopak byly pravděpodobně nesprávně zařazeny vzorky ČSV584 a ČSV609 mezi NO, což byl jediný rozdíl oproti PCA a STRUCTURE analýze. Tato metoda opět vymeziila KK694 na pomezí skupin mezi skupinou SV na jedné straně a NO s ČSV na straně druhé.

Poslední metodou byl modelový přístup založený na bayesovských postupech implementovaný v programu STRUCTURE. Nejnižší hodnoty posteriorní pravděpodobnosti sice bylo dosaženo pro $K = 5$ ($-4321 \pm 19,64$), ale pro $K = 4$ ($-4364 \pm 2,23$) docházelo k menšímu kolísání hodnot a zároveň byl detekován nejsilnější strukturní signál na základě hodnoty ΔK (9,76 vs. 115,11). Odhady posteriorní pravděpodobnosti (a) a hodnoty ΔK (b) pro jednotlivé počty skupin jsou ukázány na obrázku 19. Finální výsledek pro jednotlivé genotypy v podobě sloupcového grafu je ukázán na obrázku 21b. Pro zvýšení přehlednosti a deklarování shodných či velmi podobných výsledků jsou příslušné skupiny označeny stejným způsobem jako v případě CLU a PCA analýzy. Tento graf umožňuje schematicky zobrazit u každého jedince procentuální podíl genomu z jednotlivých populací. Tímto způsobem lze identifikovat potomky vzniklé křížením jedinců z různých populací, což se potvrdilo v případě již zmiňovaných F1 a F2 kříženců i genotypu KK694, vykazujícího vysoký podíl genomu z NO populace.

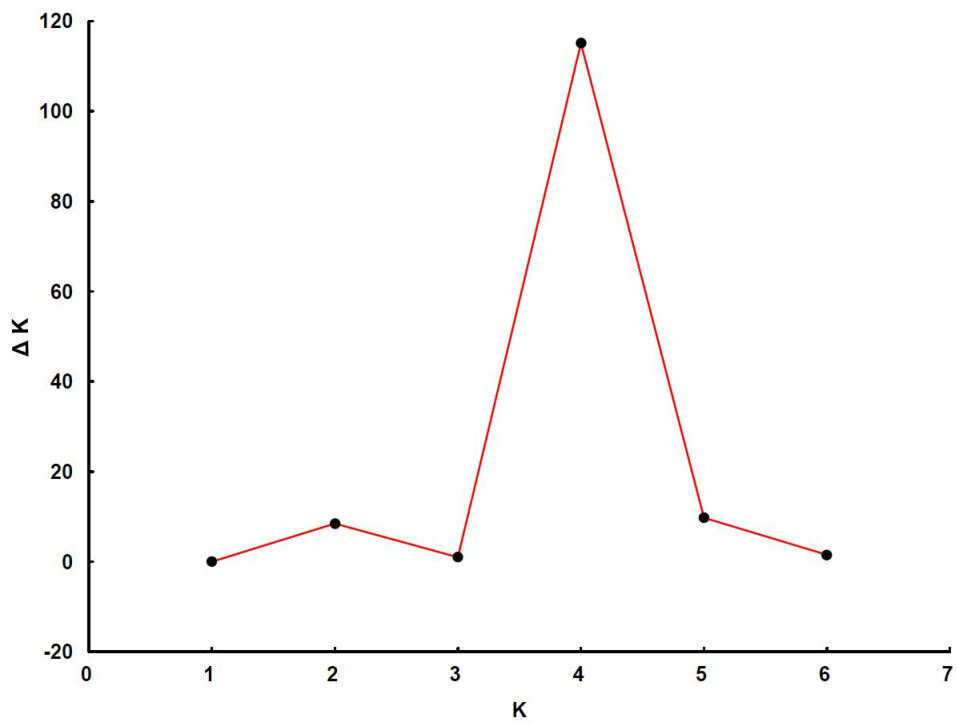
Tab. 20 Hodnoty CC a delta pro vybrané CLU metody

Metoda	CC	Delta (0,5)	Delta (1)
Nejbližšího souseda (NN)	0,6812	0,7277	0,7749
Nevzdálenějšího souseda (FN)	0,6133	0,2956	0,3224
Vážený průměr skupin dvojic (WPGMA)	0,7573	0,1209	0,1500
Nevážený průměr skupin dvojic (UPGMA)	0,7685	0,1200	0,1481
Vážený centroid skupin dvojic	0,4010	1,1890	1,2366
Nevážený centroid skupin dvojic	0,4051	1,3351	1,3864
Wardova metoda	0,6422	0,8936	0,9150

Vysvětlivky: modře označena je vybraná metoda s nejvyšší hodnotou CC a nejnižší deltou.

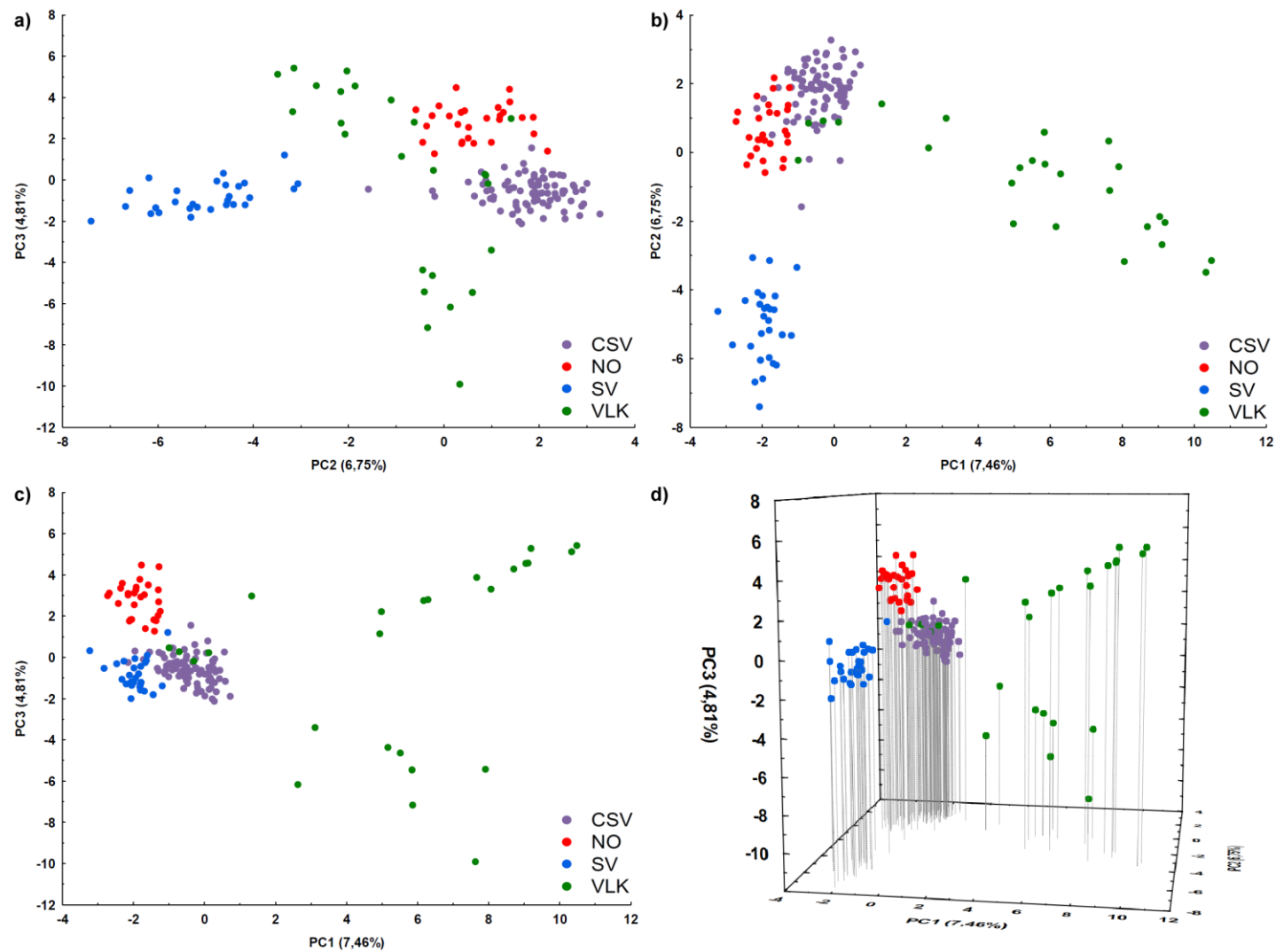


a)

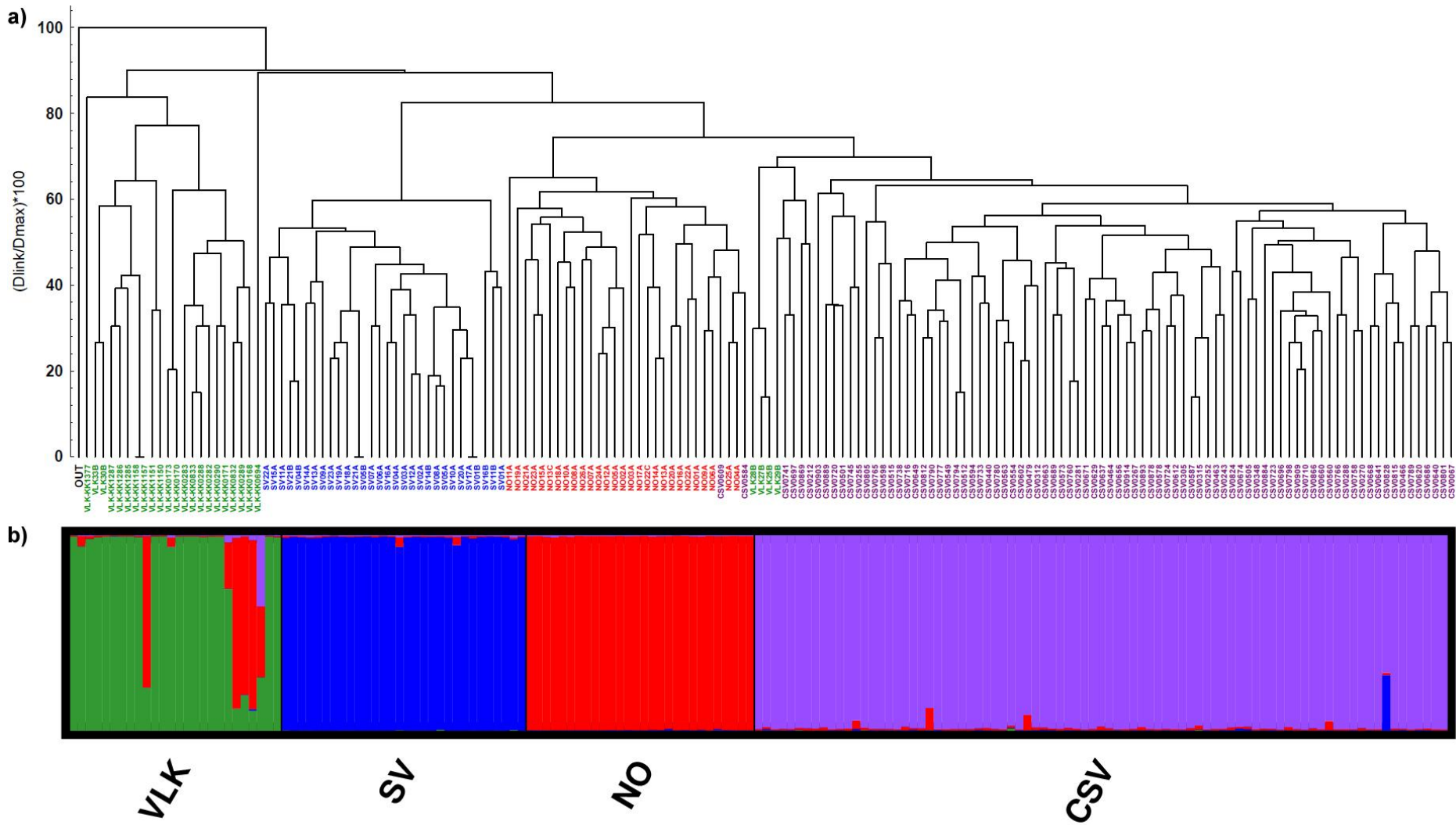


b)

Obr. 19 Odhad počtu genetických skupin K na základě průměrné hodnoty $\ln(P)D$ (a) a síly strukturního signálu dle ΔK (b) pro $K = 1-6$.



Obr. 20 Graf komponentního skóre (PCA): a) projekce PC3-PC2, b) projekce PC2-PC1, c) projekce PC3-PC1, d) 3D projekce komponent (PC1-3)



Obr. 21 Výsledky CLU analýzy v podobě dendrogramu (a) doplněné o strukturální sloupcový graf programu STRUCTURE (b)

6 Diskuze

6.1 *Optimalizace SSR markerů*

U vybraného mikrosatelitního systému, který navrhla Asch et al. (2009) proběhla testovací fáze poměrně rychle a bez problémů jak pro single- tak multiplexovou PCR. Za jeden z hlavních důvodů lze považovat kvalitně vyizolovanou DNA a použití speciálního typu reakční směsi (tzv. kitu či master mixu). Výhodou takovéhoto master mixu je zajištění správné koncentrace jednotlivých komponent reakční směsi a tudíž snížení či eliminace chyb během pipetování. Dalším kladem je typicky vysoká robustnost systému daná používáním speciálních aditiv (BSA, DMSO či v případě použitého Qiagen kitu blíže nespecifikovaný „MP faktor“ a „Q-solution“ aditivum) a „Hot-Start“ polymeráz. Tato robustnost umožňuje získat PCR produkt požadovaného lokusu u jinak problematických vzorků.

Z mé zkušenosti vyplynulo, že i takovéto systémy však mají své limity, jak ukázalo testování vzorků DNA izolované z exkrementů. Přestože k izolaci byl použit speciální kit, u většiny vzorků opakovaně selhávala amplifikace u jednoho či více lokusů, což byl i důvod, proč 30 mimořádně cenných vlčích vzorků nebylo nakonec součástí statistické analýzy dat. Důvodů může být několik, a proto otázkou zůstává účinnost, s jakou dokáže daný kit odstranit velké množství inhibitorů PCR reakce popř. množství a stupeň degradace získané DNA. Kvalita a množství izolované DNA je ovlivněna celou řadou faktorů jakými je například stáří vzorku, teplota či způsob uskladnění, které mohou hrát významnou roli (Piggot, 2004; Roeder et al., 2004).

K dalšímu zlepšení kvality samotného mikrosatelitního systému bylo by nutné udělat, pravděpodobně značně rozsáhlé, testování rozličných koncentrací u jednotlivých primerů, což by mělo vést k větší vyrovnanosti fluorescenčního signálu a tedy eliminaci případných problémů s „off-scale“ píky v některých lokusech. Takováto kvalita vyrovnanosti signálu bývá zajištěna především u forenzně-geneticky zaměřených analýz. Zde se však používají drahé specializované kity přímo od komerčních výrobců (Thermo Fisher Scientific, Promega, Qiagen), kteří složení svých reakčních směsí úzkostlivě tají, jelikož optimální složení takovéto směsi bylo zjištěno a ověřeno po tisíci testovacích sériích.

Poslední možností zlepšení kvality amplifikace a zvýšení reprodukovatelnosti je přesnější stanovení množství DNA v reakci. Standardně používaná UV spektrometrie trpí celou řadou neduhů, a proto by bylo vhodnější použití qPCR se specifickou Taq-man sondou (Kanthaswamy et al., 2015), což ale vede k nárůstu časových a finančních nákladů.

6.2 *Sekvenování SSR alel*

Z výsledků ověřovací sekvenační série, kdy byly sekvenovány 2 amplikony pro každý lokus, vyšlo najevo, že k sekvenování není možné použít původní primery dle Asch et al. (2009). Původní primery totiž nasedají příliš blízko mikrosatelitní repetice a při použití dideoxyterminační metody je kvalita sekvenace počátečních bází, typicky kolem 50 bp, velmi nízká. Situaci navíc komplikoval fakt, že řada alel byla přítomna pouze u heterozygotů, a proto k jejich separaci byla použita i akrylamidová elektroforéza, která dosahuje stejně kvalitního rozlišení velikostí fragmentů jako kapilární elektroforéza. Především velká časová náročnost tohoto přístupu je hlavním důvodem, proč se nepodařilo získat sekvence všech detekovaných alel. Jedná se však o standardní proceduru, kterou ostatně použil i autorský tým tohoto mikrosatelitního systému. K řešení problému sekvenace alel se samozřejmě nabízely minimálně další dvě alternativy v podobě ligace PCR produktů do plazmidu s následnou transformací vhodného bakteriálního nosiče nebo aplikování některé z NGS sekvenačních technologií.

Velkým kladem při využití plazmidového vektoru je jistota, že došlo k zabudování jedné molekuly DNA do plazmidu, což „zaručuje“ vysokou čistotu produktů určených k sekvenaci. Ostatně tvorba např. DNA knihoven založených na bakteriálních umělých chromozomech (BAC – bacterial artificial chromosome) byla do relativně nedávné doby dominujícím způsobem získávání vhodných fragmentů v případě projektů zaměřených na sekvenování velkých genomů (Lindblah-Toh et al., 2005). Tento přístup nebyl v této diplomové práci použit z několika důvodů. Prvním, spíše formálním, důvodem je, že v současné době Katedra genetiky a šlechtění nedisponuje GMO laboratoří, a proto nelze požadované úkony legálně provádět. Dalším důvodem je vyšší finanční a přibližně stejná časová náročnost jako v případě akrylamidové elektroforézy.

Poslední z uvažovaných alternativ bylo sekvenování pomocí NGS (next generation sequencing) technologií (Mardis, 2008; 2013; McGinn a Gut, 2013). Tyto technologie nabízejí „velkokapacitní“ sekvenování a bylo by tak možné v jedné sekvenační reakci osekvenovat všechny alely dohromady. Bohužel tyto technologie mají z hlediska zaměření diplomové práce několik nevýhod. První z nich je dána možností velkokapacitního sekvenování, která se obvykle považuje za výhodu, ale vzhledem k počtu a délce požadovaných alel by tato kapacita zůstala z velké části nevyužita. Druhou nevýhodou je nutnost přípravy tzv. knihovny, která v případě sekvenování PCR amplikonů od mnoha

jedinců znamená nákup speciálních primerových konstruktů. Tyto tzv. fúzní primery využívané např. k 454 sekvenování dosahují značné délky (50-60bp), jelikož obsahují adaptorovou sekvenci, „klíčovou sekvenci“ (key), MID (Multiplex Identifier) sekvenci a vlastní sekvenci primeru specifického pro daný lokus. Už jen tato záležitost neúměrně prodražuje cenu analýzy, což není realizovatelné v rámci diplomové práce. Poslední nevýhodu představují vysoké nároky na bioinformatické zpracování dat.

6.3 Hodnocení genetické diverzity

Z výsledků populační analýzy studovaných vzorků vyplynula existence minimálně 4 geneticky výrazně odlišných skupin, které odpovídají hodnoceným plemenům psů a kontrolnímu souboru vlků (podrobnější diskuse viz. 6.4. Populační struktura). Toto členění bylo zohledněno i pro potřeby hodnocení genetické diversity jak na úrovni vnitro, tak i mezipopulační. Z hlediska populačních deskriptorů se nabízí přímé srovnání s výsledky Asch et al. (2009). Souhrnně bylo nalezeno 108 různých alel u 169 vzorků plemen a několika vlků, což je z hlediska počtu alel (111) přibližně stejné jako v uvedené studii, která byla provedena na jednom plemeni a 12-ti křížencích různých plemen. V případě genetické diversity byla hodnota heterozygotnosti u Asch et al. (2009) o něco vyšší (0,732 vs. 0,673), což bylo pravděpodobně v důsledku velkého počtu kříženců v populaci.

Přejdeme-li k hodnocení variability mezi skupinami, pak ani pro jeden ze základních deskriptorů tj. počet alel, heterozygotnost pozorovanou a PIC nevyšel statisticky významný rozdíl mezi jakýmkoliv plemeny či vlky. Naopak celková hodnota $F_{ST} = 0,169$, která byla statisticky signifikantní, odpovídá středně silné genetické diferenciaci mezi jednotlivými skupinami (Hartl a Clark, 2007). Upřesnění hodnot F_{ST} pomocí párového porovnání ukázalo, že nejvíce diferencovanou skupinou je Saarloosův vlčák ($F_{ST} = 0,189-0,24$ dle porovnávané populace) a že u československého vlčáka existuje stejně velká míra diferenciaci vůči německému ovčáku a vlkům ($F_{ST} = 0,134$), což je v souladu s představou o vzniku tohoto plemene. Překvapivým výsledkem byla velmi nízká hodnota celkového inbredního koeficientu jedince v subpopulaci ($F_{IS} = 0,005$, $p = 0,345$), která z populačního hlediska odpovídá designu pokusu, podle kterého byli náhodně vybráni vzájemně nepříbuzní jedinci. To je v protikladu se standardní představou vysoké příbuznosti jedinců daného plemene vlivem malého počtu zakládajících jedinců. Efekt vzájemně vyšší příbuznosti jedinců oproti náhodnému křížení by se měl tudíž projevit i u takto navrženého pokusu.

Porovnání výsledků testování H-W rovnováhy a výskytu nulové alely nebylo prakticky

možné, jelikož Asch et al. (2009) nezohledňuje původ vzorků a z hlediska testu míchá různé populace. Přestože je v článku zmíněno, že příčinou statisticky signifikantní odchylky od H-W rovnováhy může být populační struktura, není na to reflektováno další analýzou, což negativně ovlivňuje správnost výsledku testování. Obdobná situace nastala v této diplomové práci v případě nehomogenní vlčí skupiny, kdy byl u dvou lokusů detekován statisticky významný rozdíl oproti H-W rovnováze. Nicméně pokud došlo k rozčlenění vlčích vzorků dle lokalit původu, zdánlivá nerovnováha oproti H-W modelu zmizela.

In silico testování na potenciální výskyt nulové alely s využitím iterativního algoritmu, který porovnává pozorované a očekávané četnosti různých genotypů, naznačilo takovouto možnost pro lokus FH2004 u jedné skupiny vlků pocházejících z maďarské lokality spolu s jedním vlkem ze Srbska, jelikož parametr F (null) dosáhl kladné hodnoty 0,3414. Někdo by samozřejmě mohl namítnout, že „srbský“ vzorek může být vysvětlením pro pozorovanou hodnotu F (null) vzhledem k malému počtu jedinců v této skupině, což by v důsledku znamenalo chybně provedenou analýzu. V případě že byl daný vzorek vyloučen z analýzy, hodnota F (null) naopak stoupla na 0,4134. Slabinou testování je však malý počet vzorků v dané skupině a příbuznost některých jedinců, což samozřejmě narušuje předpoklad náhodného křížení. Na druhou stranu, u ostatních lokusů podobně výrazná odchylka zaznamenána nebyla a určitě by bylo na místě další zkoumání.

6.4 Populační struktura

Kritickým bodem analýzy bylo správné určení populační struktury, a proto byla tato otázka zodpovězena několika statisticky odlišnými metodami.

Metoda PCA je založena na lineární transformaci původních znaků na nové latentní proměnné. Snahou je tak oddělit informaci od šumu a redukovat počet proměnných zároveň s minimalizací ztráty této informace. Získané latentní proměnné jsou komplexními ukazateli, jejichž nejdůležitější vlastností je míra variability, kterou popisují. Výsledný model s využitím tří hlavních komponent dohromady vysvětlil 19,02 % variability v datech, což se může oku laika jevit jako malá hodnota, ale je třeba brát v potaz, že došlo k redukci informace ze 108 rozměrného prostoru na pouhé tři dimenze.

Pro CLU analýzu byla použita D_a vzdálenostní matice a výběr nejvhodnější shlukovací metody byl založen na porovnání hodnot CC koeficientu, protože bylo potvrzeno na základě analýzy simulovaných a reálných dat, že CC koeficient funguje jako ukazatel správného strukturování skupin (Odong et al., 2011). Navíc dosažená hodnota CC (0,7685) u vybrané

shlukovací metody je nad hranicí obecně doporučované hodnoty (0,75) pro věrohodnost dendrogramu (Hintze, 2007), což svědčí jeho o kvalitě. K řádnému porovnání rozdílů mezi skupinami byl vytvořen zakořeněný dendrogram použitím „umělé“ vytvořeného jedince, který sloužil jako tzv. outgroup skupina.

V případě výsledků bayesovské analýzy byl stanoven počet skupin $K = 4$ na základě průměrné hodnoty posteriorní pravděpodobnosti a detekci nejsilnějšího strukturního signálu dle hodnoty ΔK . Z grafu na obrázku 19a je sice patrná vyšší hodnota $\text{Ln}(P)D$ pro $K = 5$, ale zároveň docházelo i k většímu kolísání $\text{Ln}(P)D$ hodnot mezi jednotlivými běhy. Rozdíly v hodnotách $\text{Ln}(P)D$ pro $K = 4$ a 5 nejsou příliš velké ($-4364 \pm 2,23$ vs. $-4321,08 \pm 19,65$) a navíc byl rovněž brán v potaz nejsilnější strukturní signál dle ΔK (obr. 19b). Nyní je zřejmé, že STRUCTURE pravděpodobně detekoval i jemnější strukturování vlčí skupin dle lokalit, nicméně hlavní diferenciace odpovídající 4 skupinám je platná.

Souhrnné výsledky ze tří statistických metod vykazaly značnou shodu v určení počtu genetických skupin a zařazení jedince k příslušné populaci. Tento poznatek svědčí o překvapivě vysoké rozlišovací schopnosti pouhých 9 STR markerů, což bude dáno především některými lokusy s velkým počtem alel v kombinaci s nadstandardním důrazem na eliminaci potenciálních chyb během procesu genotypování (sekvenace alel, semi-automatické vyhodnocení každého vzorku, přísná kritéria pro přijetí vzorku k finální analýze aj.). Zjištěná variabilita těchto STR markerů se tedy jeví jako dostatečná k odlišení hlavních skupin tj. ČSV, NO, SV a vlků. Navíc se podařilo pomocí PCA odhalit další strukturování u vlčích vzorků dle lokality původu. Nejlepším potvrzením správnosti a přesnosti provedených analýz je však identifikace několika hybridů F1 a F2 generace NO a kanadského vlka. Jedná se tak o jeden z nejzajímavějších poznatků, protože problematika hybridizace psa a vlka je v současné době více než aktuální, což dosvědčuje řada prací zaměřených na identifikaci hybridů v přírodních populacích (Randi, 2011; Lorenzini et al., 2014; Godinho et al., 2015).

6.5 Využitelnost mikrosatelitního systému dle Asch et al. (2009)

Porovnání alel ukázalo, že bylo nalezeno z hlediska standardizované nomenklatury 35 nových alel, přičemž pro alely 18 a 21 v lokusu FH3210, alelu 15 v lokusu FH4012 a alelu 16 v lokusu FH2361 byly detekovány mikrovarianty s rozdílnou strukturou motivu (tab. 5, 9 a 12). Jedná se o podstatné rozšíření stávajícího systému, který tak může představovat zajímavou alternativu či doplnění k pravděpodobně nejpoužívanějším STR markerům dle doporučení ISAG a jiných markerovacích systémů (Kanthaswamy et al., 2009; Ciampolini et

al., 2011; Berger et al., 2014). Navíc analýza populací dalších psích plemen umožnila provést empirický odhad skutečných frekvencí jednotlivých alel, což může být využito pro výpočet pravděpodobnosti náhodné shody dvou genetických profilů a lze najít analogii využívání takovýchto informací ve forenzní genetice. S ohledem na získané poznatky se rovněž nabízí příležitost k prozkoumání aplikovatelnosti těchto markerů pro identifikaci vlčích kříženců v molekulární ekologii.

7 Závěr

Závěrem lze konstatovat, že se podařilo splnit stanovené cíle práce s výjimkou sekvenační části projektu. Zde se podařilo osekvenovat 56 alel ze 108 detekovaných. Důvodem byla vysoká časová náročnost tohoto cíle a přísná kritéria na kvalitu sekvenovaných amplikonů.

Podařilo se vybrat a optimalizovat molekulární markery, které vykázali značnou rozlišovací sílu, jelikož se podařilo navzájem odlišit 3 plemena psů a kontrolní skupinu vlků a správně zařadit každého jedince do správné skupiny dle původu.

Pomocí základních statistických deskriptorů nebyl prokázán statisticky významný rozdíl v počtu alel na lokus či genetické diverzitě, vyjádřené v podobě heterozygotnosti a polymorfního informačního indexu. Dle hodnot F_{ST} parametru se podařilo zjistit středně velká míra genetické diference mezi psími plemeny navzájem a skupinou vlků.

Posledním bodem ze stanovených cílů práce byla analýza populační struktury vlků a psích plemen, u které se podařilo identifikovat 4 výrazně odlišné skupiny (ČSV, NO, SV a vlci) a zároveň i odlišit vlky dle lokality původu.

8 Seznam literatury

- Akey, J. M., Ruhe, A. L., Akey, D. T., Wong, A. K., Connelly, C. F., Madeoy, J., Neff, M. W., Nicholas, T. J. 2010.** Tracking footprints of artificial selection in the dog genome. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 107(3). 1160-1165.
- Altria, K. D. 1996.** Capillary electrophoresis guidebook: principles, operation, and applications. Humana Press. Totowa. 349 s. ISBN: 978-1-59259-539-6.
- Avila, L. Z., Whitesides, G. M. 1993.** Catalytic activity of native enzymes during capillary electrophoresis: an enzymic microreactor. *The Journal of Organic Chemistry*. 58(20). 5508-5512.
- Berger, B., Berger, C., Hecht, W., Hellmann, A., Rohleder, U., Schleenbecker, U., Parson, W. (2014).** Validation of two canine STR multiplex-assays following the ISFG recommendations for non-human DNA analysis. *Forensic Science International: Genetics*. 8(1). 90-100.
- Boyko, A. R. 2011.** The domestic dog: man's best friend in the genomic era. *Genome Biol*. 12(2). 216.
- Breen, M. 2008.** Canine cytogenetics—from band to basepair. *Cytogenetic and genome research*. 120(1-2). 50-60.
- Breen, M., Jouquand, S., Renier, C., Mellersh, C. S., Hitte, C., Holmes, N. G., Priat, C., Bristow, A. E., Vignaux, F., Suter, N., Chéron, A., McCann, E., André, C., Boundy, S., Gitsham, P., Thomas, R., Bridge, W. L., Sproggs, H. F., Ryder, E. J., Curson, A., Sampson, J., Ostrander, E. A., Binns, M. M., Galibert, F. 2001.** Chromosome-specific single-locus FISH probes allow anchorage of an 1800-marker integrated radiation-hybrid/linkage map of the domestic dog genome to all chromosomes. *Genome Research*. 11(10). 1784-1795.
- Breen, M., Langford, C. F., Carter, N. P., Holmes, N. G., Dickens, H. F., Thomas, R., Binns, M. M., Suter, N., Ryde, E. J., Pope, M. 1999.** FISH mapping and identification of canine chromosomes. *Journal of Heredity*. 90(1). 27-30.
- Buschiazzo, E., Gemmell, N. J. 2006.** The rise, fall and renaissance of microsatellites in eukaryotic genomes. *Bioessays*. 28(10). 1040-1050.
- Butler, J. M. 2012.** Advanced topics in forensic DNA typing: methodology. Elsevier/Academic Press. London. 680 s. ISBN: 0123745136.

- Camacho, C., Coulouris, G., Avagyan, V., Ma, N., Papadopoulos, J., Bealer, K., Madden, T.L. 2008.** "BLAST+: architecture and applications." *BMC Bioinformatics*. 10(421)
- Carrano, M. T. 1997.** Morphological indicators of foot posture in mammals: a statistical and biomechanical analysis. *Zoological Journal of the Linnean Society*. 121(1). 77-104.
- Ciampolini, R., Cecchi, F., Bramante, A., Tancredi, M., Presciuttini, S. 2012.** Towards standardization of canine STRs: a proposed nomenclature for six markers from the ISAG comparison-test panel. *Animal genetics*. 43(4). 463-467.
- Conn, M., Sarkar, G. 1995.** PCR in Neuroscience. Academic Press. London. ISBN: 9780080536453.
- De Sousa, S. N., Finkeldey, R., Gailing, O. 2005.** Experimental verification of microsatellite null alleles in Norway spruce (*Picea abies* [L.] Karst.): Implications for population genetic studies. *Plant Molecular Biology Reporter*. 23(2). 113-119.
- Dell Inc. (2015).** Dell Statistica (data analysis software system), version 13. software.dell.com.
- Earl, Dent A. a vonHoldt, Bridgett M. (2012)** STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation Genetics Resources* vol. 4 (2) pp. 359-361 doi: 10.1007/s12686-011-9548-7.
- Ellegren, H. 2004.** Microsatellites: simple sequences with complex evolution. *Nature reviews genetics*. 5(6). 435-445.
- Erlich, H. 1989.** PCR Technology: Principles and Applications for DNA Amplification. Stockton Press. New York. ISBN: 9781349202355.
- Evanno G, Regnaut S, Goudet J (2005)** Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology*, 14, 2611–2620.
- Falush, D., Stephens, M., Pritchard, J.K. 2003.** Inference of population structure: Extensions to linked loci and correlated allele frequencies. *Genetics*. 164, 1567–1587.
- Feddersen-Petersen, D. U. (2000).** Vocalization of European wolves (*Canis lupus lupus* L.) and various dog breeds (*Canis lupus* f. fam.). *Archiv fur Tierzucht*. 43(4). 387-398.
- Freedman, A. H., Gronau, I., Schweizer, R. M., Ortega-Del Vecchyo, D., Han, E., Silva, P. M., Beale, H., Lorente-Galdos, B., Marx, P., Fan, Z., Galaverni, M., Ramirez, O., Hormozdiari, F., Alkan, C., Vilà, C., Squire, K., Geffen, E., Kusak, J., Boyko, A. R., Parker, H. G., Lee, C., Tadiogola, V., Siepel, A., Bustamante, C. D., Harkins, T. T., Nelson, S. F., Ostrander, E. A., Marques-Bonet, T., Wayne, R. K. 2014.**

Genome sequencing highlights the dynamic early history of dogs. *PLoS Genet.* 10(1). e1004016.

- Germonpré, M., Sablin, M. V., Stevens, R. E., Hedges, R. E., 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.* 36(2). 473-490.
- Ginot, F., Bordelais, I., Nguyen, S., Gyapay, G. 1996.** Correction of some genotyping errors in automated fluorescent microsatellite analysis by enzymatic removal of one base overhangs. *Nucleic Acids Research.* 24(3). 540-541.
- Godinho, R., López-Bao, J. V., Castro, D., Llaneza, L., Lopes, S., Silva, P., & Ferrand, N. (2015).** Real-time assessment of hybridization between wolves and dogs: combining noninvasive samples with ancestry informative markers. *Molecular ecology resources,* 15(2), 317-328.
- Grossman, P. D., Colburn, J. C. 1996.** *Capillary Electrophoresis: Theory and Practice.* Academic Press. London. 352 s. ISBN: 9780323138192.
- Gugerli, F., Brodbeck, S., Holderegger, R. 2008.** Insertions–deletions in a microsatellite flanking region may be resolved by variation in stuttering patterns. *Plant Molecular Biology Reporter.* 26(3). 255-262.
- Hartl, D. L., Clark, A. G. 2007.** *Principles of population genetics.* Sinauer. 652 s. ISBN: 978-0-87893030802.
- Hayden, M. J., Nguyen, T. M., Waterman, A., McMichael, G. L., Chalmers, K. J. 2008.** Application of multiplex-ready PCR for fluorescence-based SSR genotyping in barley and wheat. *Molecular breeding.* 21(3). 271-281.
- Hayward, J. J., Castelhana, M. G., Oliveira, K. C., Corey, E., Balkman, C., Baxter, T. L., Kalla, S. E., Garrison, S. J., Fang, M., Center, S. A., Casal, M., Krniliev, P., Kotlikoff, M. I., Moise, N. S., Shannon, L. M., Simpson, K. W., Sutter, N. B., Todhunter, R. J., Boyko, A. R. 2016.** Complex disease and phenotype mapping in the domestic dog. *Nature Communications,* 1-17.
- Henegariu, O., Heerema, N. A., Dlouhy, S. R., Vance, G. H., Vogt, P. H. 1997.** Multiplex PCR: critical parameters and step-by-step protocol. *Biotechniques.* 23(3). 504-511.
- Hile, S. E., Eckert, K. A. 2004.** Positive correlation between DNA polymerase α -primase pausing and mutagenesis within polypyrimidine/polypurine microsatellite sequences. *Journal of molecular biology.* 335(3). 745-759.
- Hintze, J. 2001.** NCSS. NCSS, LLC. Kaysville, Utah, USA. <www.ncss.com>.

- Hintze, J. 2007.** NCSS help system [electronic manual]. Kaysville, Utah. NCSS. 2007 [cit. 2011-17-9].
- Hoffman, J. I., Amos, W. 2005.** Microsatellite genotyping errors: detection approaches, common sources and consequences for paternal exclusion. *Molecular Ecology*. 14(2). 599-612.
- Chapuis, M. P., Estoup, A. 2007.** Microsatellite null alleles and estimation of population differentiation. *Molecular biology and evolution*. 24(3). 621-631.
- Chistiakov, D. A., Hellemans, B., Volckaert, F. A. 2006.** Microsatellites and their genomic distribution, evolution, function and applications: a review with special reference to fish genetics. *Aquaculture*. 255(1). 1-29.
- Innis, M. A., Gelfand, D. H., Sninsky, J. J., White, T. J. 1990.** PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. Academic Press. London. ISBN: 9780080886718.
- Jakobsson M, Rosenberg NA (2007)** CLUMPP: a cluster matching and permutation program for dealing with label switching and multimodality in analysis of population structure. *Bioinformatics*, 23, 1801-1806.
- Jensen, P. 2007.** The behavioural biology of dogs. CAB international. London. 288 s. ISBN: 9 78 1 84593 1872.
- Jones, A. G., Stockwell, C. A., Walker, D., Avise, J. C. 1998.** Brief communication. The molecular basis of a microsatellite null allele from the white sands pupfish. *Journal of Heredity*. 89(4). 339-342.
- Jurka, J., Kapitonov, V. V., Pavlicek, A., Klonowski, P., Kohany, O., Walichiewicz, J. 2005.** Repbase Update, a database of eukaryotic repetitive elements. *Cytogenetic and genome research*. 110(1-4). 462-467.
- Kalia, R. K., Rai, M. K., Kalia, S., Singh, R., Dhawan, A. K. 2011.** Microsatellite markers: an overview of the recent progress in plants. *Euphytica*. 177(3). 309-334.
- 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*. 6(2). 290-295.
- Kanthaswamy, S., Tom, B. K., Mattila, A. M., Johnston, E., Dayton, M., Kinaga, J., Erikson, B. J., Halverson, J., Fantin, D., DeNise, S., Kou, A., Malladi, V., Satkoski, J., Budowle, B., Smith, D. G., Koskinen, M. T. 2009.** Canine population data generated from a multiplex STR kit for use in forensic casework. *Journal of forensic sciences*. 54(4). 829-840.

- Kirkness, E. F., Bafna, V., Halpern, A. L., Levy, S., Remington, K., Rusch, D. B., Venter, J. C., Fasteur, C. M., Wang, W., Pop, M., Delcher, A. L. 2003.** The dog genome: survey sequencing and comparative analysis. *Science*. 301(5641). 1898-1903.
- Koontz, L. Agarose Gel Electrophoresis. In: Lorsh, J. 2013.** Methods in enzymology: Laboratory Methods in Enzymology: DNA. Elsevier/Academi Press. London. 35-45 s. ISBN: 9780124184853.
- Langford, C. F., Fischer, P. E., Binns, M. M., Holmes, N. G., Carter, N. P. 1996.** Chromosome-specific paints from a high-resolution flow karyotype of the dog. *Chromosome Research*. 4(2). 115-123.
- Leonard, J. A., Wayne, R. K., Wheeler, J., Valadez, R., Guillén, S., & Vila, C. 2002.** Ancient DNA evidence for Old World origin of New World dogs. *Science*. 298(5598). 1613-1616.
- Leonard, J. A., Wayne, R. K., Wheeler, J., Valadez, R., Guillén, S., Vila, C. 2002.** Ancient DNA evidence for Old World origin of New World dogs. *Science*. 298(5598). 1613-1616.
- Li, Y. C., Korol, A. B., Fahima, T., Beiles, A., Nevo, E. 2002.** Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutational mechanisms: a review. *Molecular ecology*. 11(12). 2453-2465.
- Lindblad-Toh, K., Wade, C. M., Mikkelsen, T. S., Karlsson, E. K., Jaffe, D. B., Kamal, M., Mauceli, E., Zody, M. C., Kulbokas III, E. J., Chang, J. L., Clamp, M., Xie, X., Breen, M., Wayne, R. K., Ostrander, E. A., Ponting, Ch. P., Galibert, F., Smith, D. R., deJong, P. J., Kirkness, E., Alvarez, P., Biagi, T., Brokman, W., Butler, J., Chin, CH., Cook, A., Cuff, J., Daly, M. J., DeCaprio, D., Gnerre, S., Grabherr, M., Kellis, M., Kleber, M., Bardeleben, C., Goodstadt, L., Heger, A., Sutter, N. B., Thomas, R., Webber, C., Lander, E. S. 2005.** Genome sequence, comparative analysis and haplotype structure of the domestic dog. *Nature*. 438(7069). 803-819.
- Lorenzini, R., Fanelli, R., Grifoni, G., Scholl, F., & Fico, R. (2014).** Wolf–dog crossbreeding: “Smelling” a hybrid may not be easy. *Mammalian Biology-Zeitschrift für Säugetierkunde*, 79(2), 149-156.
- Mardis, E. R. 2008.** Next-generation DNA sequencing methods. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* 9. 387-402.
- Mardis, E. R. 2013.** Next-generation sequencing platforms. *Annual review of analytical chemistry*. 6. 287-303.

- McGinn, S., Gut, I. G. 2013.** DNA sequencing—spanning the generations. *New biotechnology*. 30(4). 366-372.
- McMaster, G. K., Carmichael, G. G. 1977.** Analysis of single- and double-stranded nucleic acids on polyacrylamide and agarose gels by using glyoxal and acridine orange. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 74(11). 4835-4838.
- Mellersh, C. S., Hitte, C., Richman, M., Vignaux, F., Priat, C., Jouquand, S., Ostrander, E. A., Galibert, F., Werner, P., André, C., DeRose, S., Patterson, D. F. 2000.** An integrated linkage-radiation hybrid map of the canine genome. *Mammalian Genome*. 11(2). 120-130.
- Mellersh, C. S., Langston, A. A., Acland, G. M., Fleming, M. A., Ray, K., Wiegand, N. A., Ostrander, E. A., Francisco, L., Gibbs, M., Aguirre, G. A. 1997.** A linkage map of the canine genome. *Genomics*. 46(3). 326-336.
- Nei, M., Tajima, F., Tatenno, Y. 1983.** Accuracy of estimated phylogenetic trees from molecular data. *Journal of Molecular Evolution*. 19 (2). 153-170.
- Odong, T., van Heerwaarden, J., Jansen, J., van Eeuwijk, F. 2011.** Determination of genetic structure of germplasm collections: are traditional hierarchical clustering methods appropriate for molecular marker data? *Theoretical and Applied Genetics*, 123 (2), 195-205.
- Oliveira, E. J., Pádua, J. G., Zucchi, M. I., Vencovsky, R., Vieira, M. L. C. 2006.** Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. *Genetics and Molecular Biology*. 29(2). 294-307.
- Ostrander, E. A., Wayne, R. K. 2005.** The canine genome. *Genome research*. 15(12). 1706-1716.
- Peakall R. and Smouse P.E. (2006)** GenAlEx 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Mol. Ecol. Notes*. 6. 288-295.
- Peakall R. and Smouse P.E. (2012)** GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research – an update. *Bioinformatics*. 28. 2537-2539.
- Piggott, M. P. 2005.** Effect of sample age and season of collection on the reliability of microsatellite genotyping of faecal DNA. *Wildlife Research*. 31(5). 485-493.
- Powell, W., Machray, G. C., Provan, J. 1996.** Polymorphism revealed by simple sequence repeats. *Trends in plant science*. 1(7). 215-222.
- Priat, C., Hitte, C., Vignaux, F., Renier, C., Jiang, Z., Jouquand, S., Galibert, F., Chéron, A., André, C. 1998.** A whole-genome radiation hybrid map of the dog genome. *Genomics*. 54(3). 361-378.

- Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P. 2000.** Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*. 155:945–959.
- Randi, E. (2011).** Genetics and conservation of wolves *Canis lupus* in Europe. *Mammalian Review*, 41(2), 99-111.
- Reimann, N., Bartnitzke, S., Nolte, I., Bullerdiek, J. 1999.** Working with canine chromosomes: current recommendations for karyotype description. *Journal of Heredity*. 90(1). 31-34.
- Richard, G. F., Kerrest, A., Dujon, B. 2008.** Comparative genomics and molecular dynamics of DNA repeats in eukaryotes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 72(4). 686-727.
- Richard, G. F., Pâques, F. 2000.** Mini-and microsatellite expansions: the recombination connection. *EMBO reports*. 1(2). 122-126.
- Roeder, A. D., Archer, F. I., Poinar, H. N., Morin, P. A. 2004.** A novel method for collection and preservation of faeces for genetic studies. *Molecular Ecology Notes*. 4(4). 761-764.
- Rosenberg NA (2004)** Distruct: a program for the graphical display of population structure. *Molecular Ecology Notes*, 4, 137–138.
- Sanger, F., Nicklen, S., & Coulson, A. R. 1977.** DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 74(12). 5463-5467.
- Selden, J. R., Moorhead, P. S., Oehlert, M. L., Patterson, D. F. 1975.** The Giemsa banding pattern of the canine karyotype. *Cytogenetic and Genome Research*. 15(6). 380-387.
- Schlötterer, C., Tautz, D. 1992.** Slippage synthesis of simple sequence DNA. *Nucleic acids research*. 20(2). 211-215.
- Smith, D. R. Agarose gel electrophoresis. 1996.** In: HARWOOD, A. J. *Basic DNA and RNA Protocols*. Human Press. Totowa. 17-21 s. ISBN: 978-0896033313.
- Smith, J. R., Carpten, J. D., Brownstein, M. J., Ghosh, S., Magnuson, V. L., Gilbert, D. A., Terred, J. M., Collins, F. S. 1995.** Approach to genotyping errors caused by nontemplated nucleotide addition by Taq DNA polymerase. *Genome Research*. 5(3). 312-317.
- Snustad, D., a Simmons, M. J., IMMONS, Relichová, J. 2009.** *Genetika*. Vyd. 1. Masarykova univerzita. Brno. ISBN: 9788021048522.
- Sutherland, G. R., Richards, R. I. 1995.** Simple tandem DNA repeats and human genetic disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 92(9). 3636-3641.
- Tedford, R. H., Wang, X., Taylor, B. E. 2009.** Phylogenetic systematics of the north

- american fossil caninae (Carnivora: Canidae). *Bulletin of the American Museum of Natural History*. 1-218.
- Thomas, R., Smith, K. C., Ostrander, E. A., Galibert, F., Breen, M. 2003.** Chromosome aberrations in canine multicentric lymphomas detected with comparative genomic hybridisation and a panel of single locus probes. *British journal of cancer*. 89(8). 1530-1537.
- van Asch, B., Alves, C., Gusmão, L., Pereira, V., Pereira, F., Amorim, A. 2009.** A new autosomal STR nineplex for canine identification and parentage testing. *Electrophoresis*. 30(2). 417-423.
- Vašek, J., 2011.** Charakterizace genetických zdrojů chmele pomocí molekulárně genetických metod. *Disertační práce. Česká zemědělská univerzita v Praze. Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů. Praha. 188 s.*
- Vergnaud, G., Denoeud, F. 2000.** Minisatellites: mutability and genome architecture. *Genome Research*. 10(7). 899-907.
- Vilà, C., Savolainen, P., Maldonado, J. E., Amorim, I. R., Rice, J. E., Honeycutt, R. L., Crandall, K. A., Lundeberg, J., Wayne, R. K. 1997.** Multiple and ancient origins of the domestic dog. *Science*. 276(5319). 1687-1689.
- Vodrážka, Z. 1999.** *Biochemie I. Academia. Praha. 180 s. ISBN 80-200-0600-1.*
- Wang, W., Kirkness, E. F. 2005.** Short interspersed elements (SINEs) are a major source of canine genomic diversity. *Genome Research*. 15(12). 1798-1808.
- Wang, X., Tedford, R. H., Antón, M. 2010.** *Dogs: their fossil relatives and evolutionary history. Columbia University Press. New York. 232 s. ISBN: 978-0-231-50943-5.*
- Wang, X., Tedford, R. H., Van Valkenburgh, B., Wayne, R. K. 2004.** Evolutionary history, molecular systematics, and evolutionary ecology of Canidae. *Biology and conservation of wild canids (DW Macdonald and C. Sillero-Zubiri, eds.). Oxford University Press, Oxford, United Kingdom. 39-54.*
- 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*. 7(11). 1569-1573.
- Wayne, R. K., Ostrander, E. A. 1999.** Origin, genetic diversity, and genome structure of the domestic dog. *BioEssays*. 21(3). 247-257.
- Wayne, R. K., Ostrander, E. A. 2007.** Lessons learned from the dog genome. *Trends in Genetics*. 23(11). 557-567.

- Wheeldon, T., White, B. N. 2009.** Genetic analysis of historic western Great Lakes region wolf samples reveals early *Canis lupus/lycaon* hybridization. *Biology Letters*. 5(1). 101-104.
- Wilson, D. E., Reeder, D. M. 2005.** *Mammal Species of the World: A Taxonomic and Geographic Reference*. 3. The Johns Hopkins University Press. Baltimore. ISBN 0-8018-8221-4.
- Wilson, P. J., Grewal, S., Lawford, I. D., Heal, J. N., Granacki, A. G., Pennock, D., Chambers, R. E., Waddell, W., Voigt, D. R., Theberge, M. T., Theberge, J. B., Paquet, P. C., Goulet, G., Cluff, D., White, B. N. 2000.** DNA profiles of the eastern Canadian wolf and the red wolf provide evidence for a common evolutionary history independent of the gray wolf. *Canadian Journal of Zoology*. 78(12). 2156-2166.
- Ye, J., Coulouris, G., Zaretskaya, I., Cutcutache, I., Rozen, S., Madden, T. 2012.** Primer-BLAST: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics*. 13. 134.

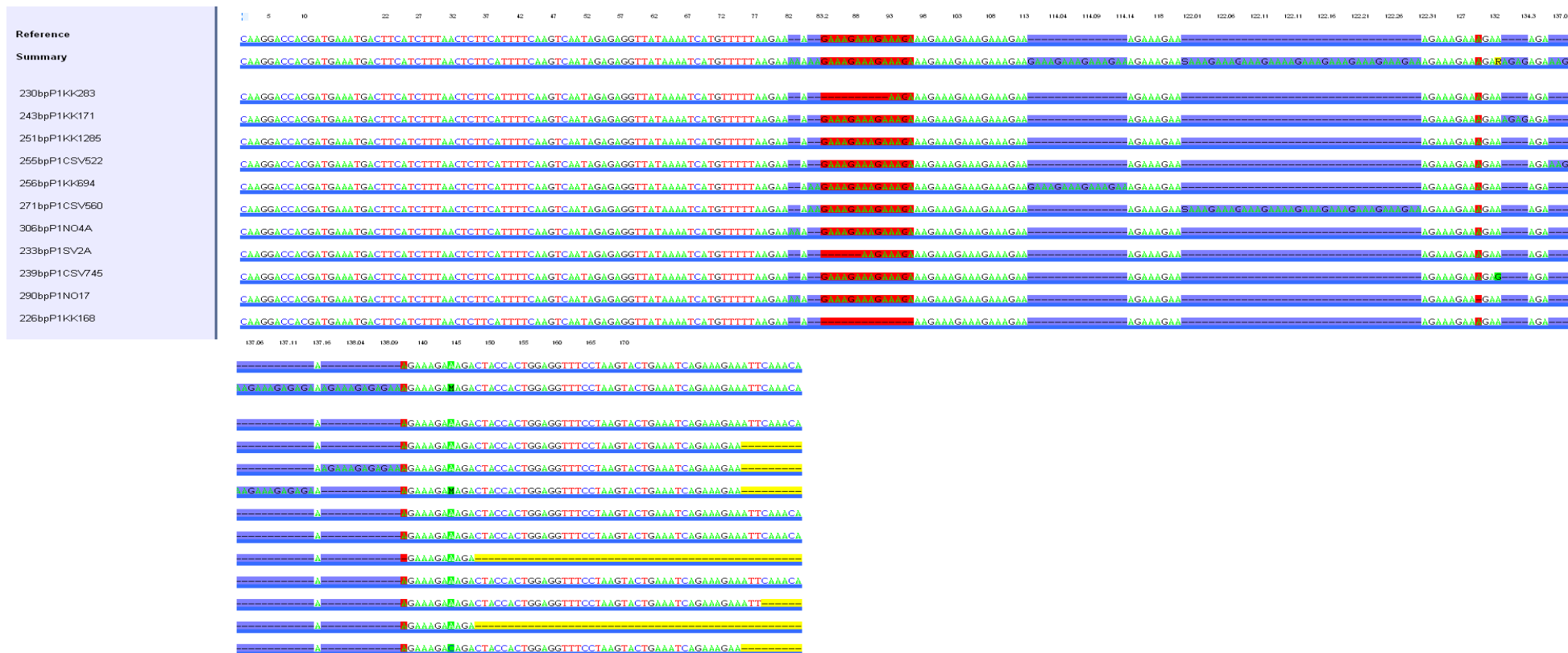
9 Seznam použitých zkratek

- ANOVA = Analysis of Variance (analýza rozptylu)
- AMOVA= Analysis of Molecular Variace (analýza molekulárního rozptylu)
- BAC= bacterial artificial chromosome (bakteriálních umělý chromozom)
- bp= base pare (pár bází)
- BSA= Bovine serum Albumin (bovinní serum albuminum)
- cDNA = complementary DNA (komplementární DNA)
- CLU= (hiearchická zhluková analýzy)
- cpSSR= Chloroplast simple sequence repeats (cloroplastová SSR)
- DAPI = 4',6-diamidin-2-fenylindole (4',6-diamidin-2-fenylindol)
- DNA = deoxyridonucleic adic (dioxyribonukleová kyselina)
- dNTP = deoxinucleotide-5'-triphosphate (deoxinukleotid-5'-trifosfát)
- EDTA= ethylenediaminetetraacetic acid (kyselina ethylendiamintetraoctová)
- FISH= Fluorescent *in situ* Hybridization (flourescenční *in situ* hybridizace)
- Gb= gigabase (gigabáze)
- H_e= Heterozygosity expected (heterozygotnost očekávaná)
- H_o= Heterozygosity observed (heterozygotnost pozorovaná)
- indel= Insertion/Deletion (inzerce/delece)
- ISAG= International Society for Animal Genetics (Společnost pro genetiku zvířat)
- kb= kilobase (kilobáze)
- qPCR= quantitative PCR (kvantitativní PCR)
- LINE= Long Interspersed Nuclear Element (dlouhý roztroušený element)
- NCBI= National Center for Biotechnology Information
- NGS= Next Generation Sequencing
- nuSSR= Nuclear SSR (jaderná SSR)
- Mb= megabase (megabáze)
- MCMC= Marcov Chain Monte Carlo
- MID= Multiplex Identifier
- MMR= Mismatch Repair (system) (opravný system)
- mtDNA= mitochondrial DNA (mitochondriální DNA)
- mtSSR= mitochondrial STR (mitochondriální SSR)
- PCA= Principle Component Analysis (analýza hlavních komponent)

PCR= Polymerase Chain Reaction (polymerázová řetězová reakce)
PIC= Polymorphic Information Content (polymorfni informační index)
SINE= Short Interspersed Nuclear Elements (krátký roztroušený element)
SNP= Single Nucleoside Polymorphism (jednobodový polymorfismus)
SSR= Single Sequence Repeat (sekvenčně jednoduché repetice)
STR= Short Tandem Repeat (krátká tandemová repetice)
TBE= tris-borate-EDTA buffer (tris-borátový pufr)
TRIS= tris(hydroxymethyl)aminomethane (tris(hydroxymethyl)aminomethan)
UPGMA= Unweighted Pair Group Method Using Arithmetic Averages (nevážený průměr skupin dvojic)
VNTR= Variable Number Tandem Repeat (variabilní počet tandemových repetice)
WGS= Whole Genome Shotgun (celogenomové náhodné sekvenování)

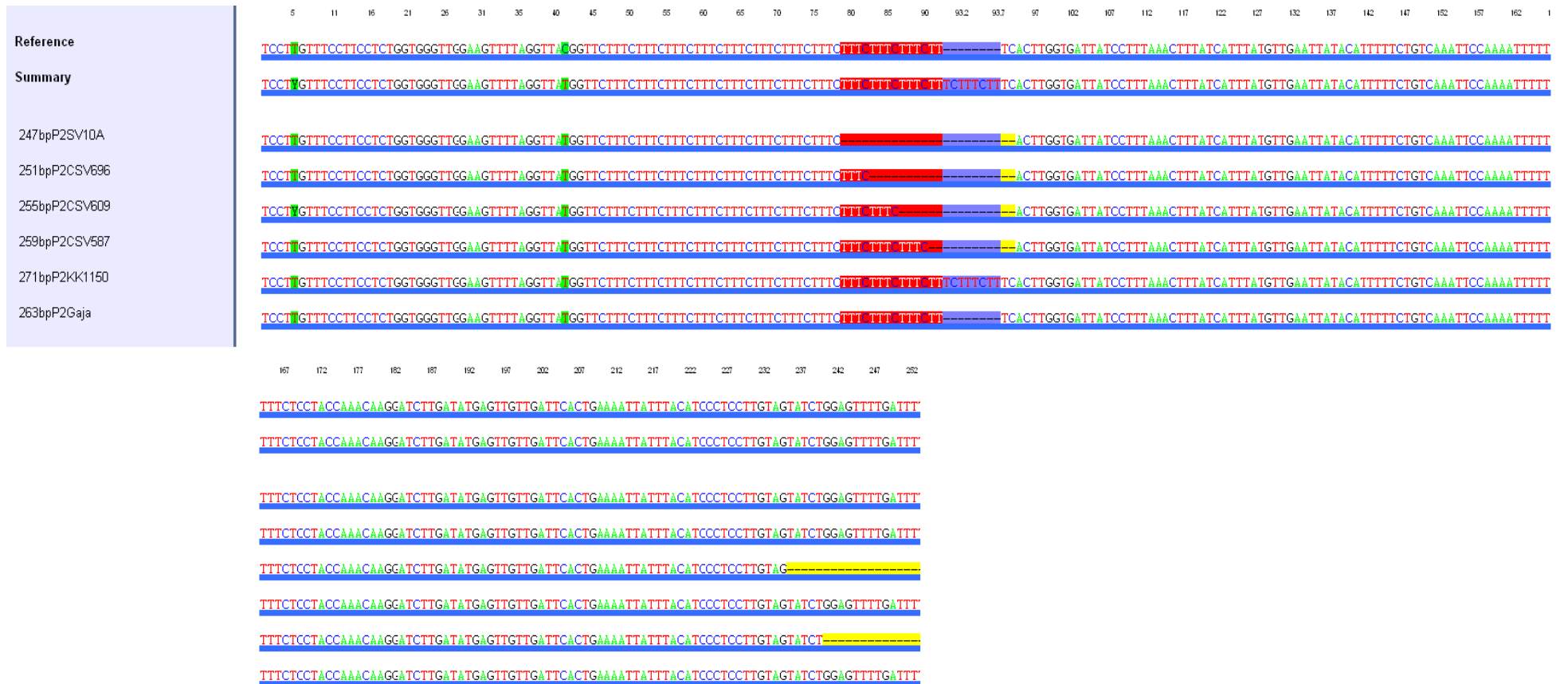
10 Přílohy

10.1 Výsledky sekvenace exportované z programu VariantReporter (pro všechny lokusy)



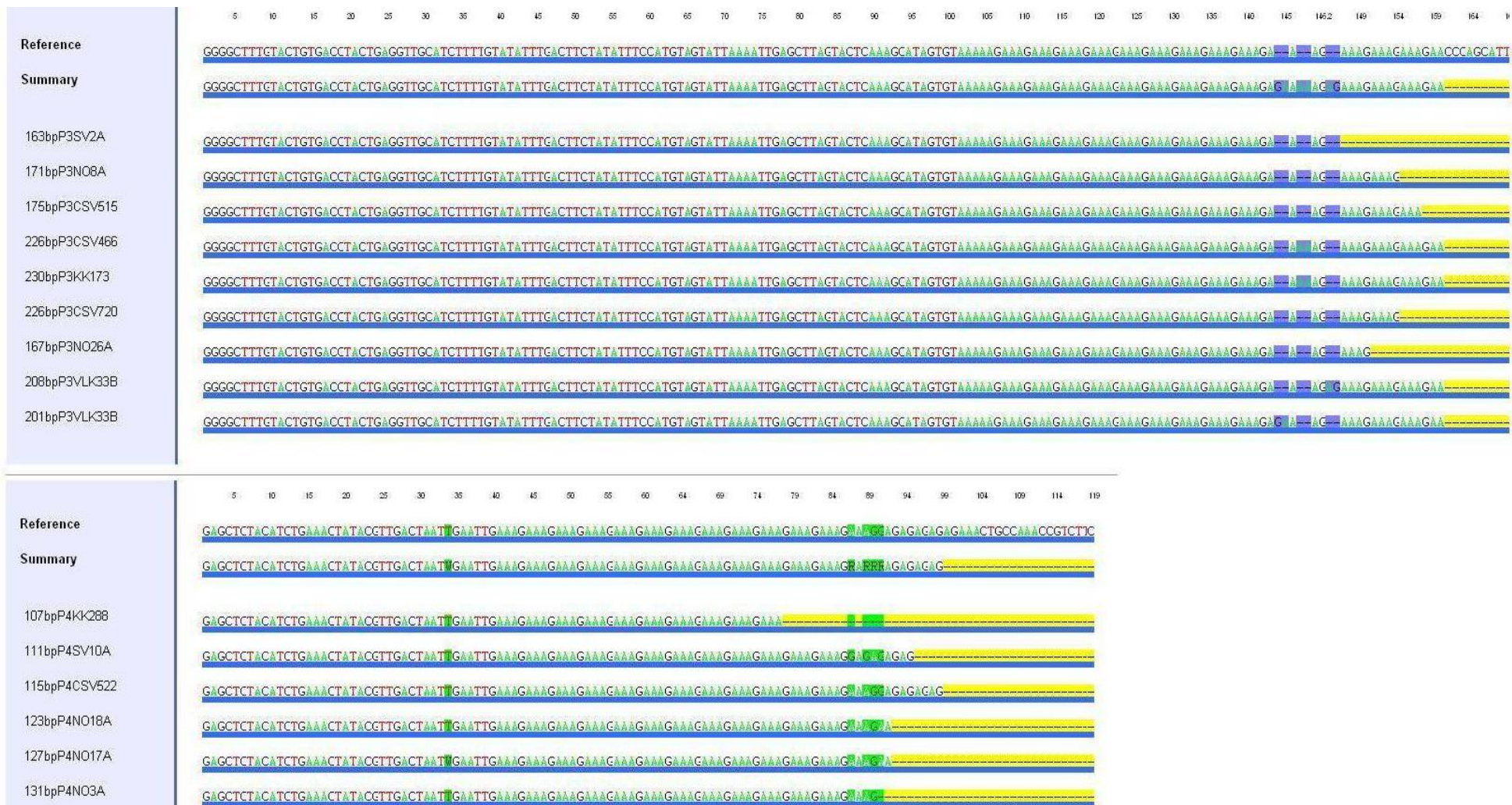
Vysvětlivky: zelená- substitute, fialová- inserce, červená- delece, žlutá- sestřih dle referenční sekvenace; označení sekvenace: lelikost alely (bp), lokus, genotyp

Obr. 22 Lokus: FH3210

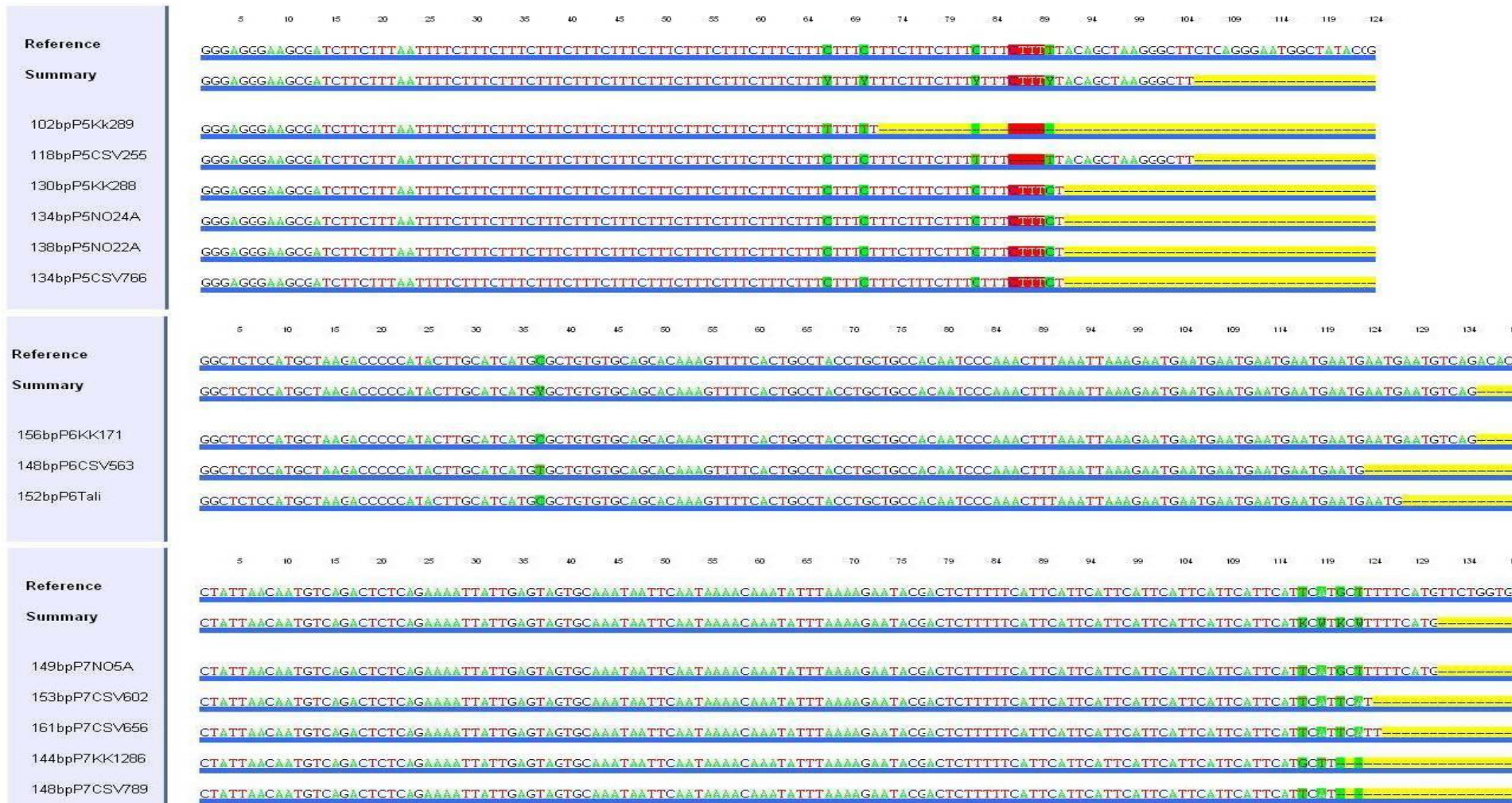


Vysvětlivky: zelená- substituce, fialová- inserce, červená- delece, žlutá- sestřih dle referenční sekvence; označení sekvence: velikost alely (bp), lokus, genotyp

Obr. 23 Lokus: FH3241

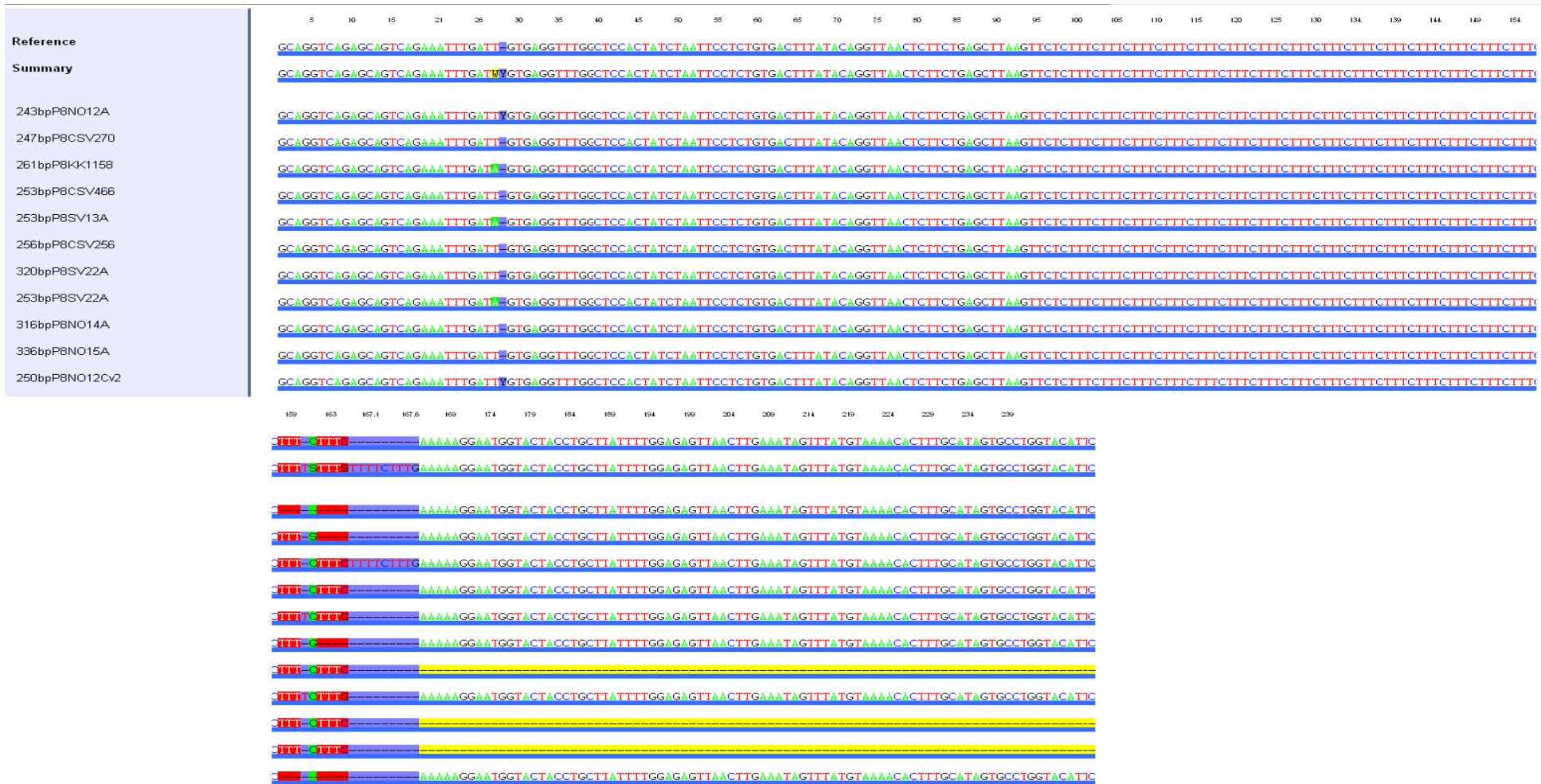


Vysvětlivky: zelená- substituce, fialová- inzerce, červená- delece, žlutá- sestřih dle referenční sekvence; označení sekvence: velikost alely (bp), lokus, genotyp
 Obr. 24 Locus: FH2004 a FH2658



Vysvětlivky: zelená- substituce, fialová- inzercie, červená- delece, žlutá- sestřih dle referenční sekvence; označení sekvence: lelikost alely (bp), lokus, genotyp

Obr. 25 Lokus: FH4012, REN214L11, FH210



Vysvětlivky: zelená- substituce, fialová- inzerce, červená- delece, žlutá- sestřih dle referenční sekvenec; označení sekvenec: velikost alely (bp), lokus, genotyp

Obr. 26 Lokus: FH2361

