

ČESKÁ ZEMĚDĚLSKÁ UNIVERZITA V PRAZE



Fakulta agrochemie, přírodních a potravinových zdrojů

Katedra genetiky a šlechtění

**Multiplex SSR markery a jejich využití při studiu
variability psiho genomu**

Diplomová práce

Vedoucí práce: doc. Dr. Ing. Pavel Vejl

Autor práce: Iveta Jelínková

2012

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci zpracovala samostatně a použila jen pramenů, které cituji a uvádím v příložené bibliografii.

Datum: 13. 4. 2012

.....

Podpis studenta

Poděkování

Tímto způsobem bych ráda chtěla poděkovat vedoucímu mé diplomové práce doc. Dr. Ing. Pavlu Vejlovi a Ing. Daniele Čílové za odborné vedení při zpracování mé diplomové práce, za cenné rady a připomínky a za ochotu a velkou trpělivost se kterou to vykonávali. Můj dík patří také Ing. Jakubu Vaškovi Ph.D. za pomoc při vyhodnocování výsledků.

Řešení diplomové práce bylo podpořeno FRVŠ MŠMT „2730 Aa-Modernizace laboratoře genetických analýz technikami založenými na principu kapilární elektroforézy a výzkumným záměrem „MSM6046070901 – Setrvalé zemědělství, kvalita zemědělské produkce, krajinné a přírodní zdroje“.

Souhrn

Cílem diplomové práce bylo analyzovat strukturu modelové populace plemene československý vlčák (364 jedinců) a charakterizovat jedince analýzou 8 SSR lokusů (FH3210, FH3241, FH4012, FH2004, FH2010, REN214L11, FH2361 a C38). Z volně přístupné databáze byl získán koeficient inbreedingu (F_x5 , F_x8), koeficient ztráty předka (AVK5, AVK8) a podíl krve vlka, jež byly dále použity pro statistická hodnocení.

Před vlastními statistickými analýzami bylo nutné provést Cox-Boxovu transformaci dat pro dosažení normálního rozdělení hodnot. Jedinci byli rozděleni podle průměru a směrodatných odchylek do 3 skupin s nízkými (skupina A), průměrnými (skupina B) a vysokými (skupina C) hodnotami. Statistickými analýzami byly hodnoceny vztahy mezi jedinci zařazených do skupin, vytvořených na základě hodnot F_x5 , F_x8 , AVK5, AVK8 a podílu krve vlka. Rovněž byla hodnocena variabilita mikrosatelitních lokusů, průměrná heterozygotnost lokusů a průměrný počet alel jednotlivých lokusů a hodnoty PIC. Hodnoty PIC se pohybovaly v rozmezí od 0,421 (REN214L11) do 0,807 (FH2361).

Na základě analýzy mikrosatelitních lokusů bylo provedeno testování paternity a maternity u 36 úplných rodin a 53 neúplných rodin. Z výchozí populace bylo pro následné statistické hodnocení vyřazeno 5 jedinců z důvodů neodpovídající paternity a maternity a 1 jedinec, u jehož otce nebyla paternita rovněž potvrzena.

Při hodnocení průměrného počtu heterozygotních lokusů jedinců, byla zjištěna závislost vysokého počtu heterozygotních lokusů jedinců na nízké hodnotě F_x a vysoké hodnotě AVK, a proto byly zjištěny rozdíly mezi jedinci ze skupin A a C pro hodnotu F_x8 a mezi hodnotami skupiny C pro AVK5 a celou populací. Analýzou průměrné heterozygotnosti mikrosatelitního lokusu byly zjištěny rozdíly mezi jedinci ze skupiny A vůči všem ostatním skupinám i vůči celé populaci. Bylo to způsobeno podílem krve německého ovčáka u plemene československých vlčáků. Rovněž byly zjištěny rozdíly mezi průměrným počtem alel jednoho lokusu u hodnot podílu krve vlka mezi skupinou A a C. Z čehož vyplývá, že u jedinců s vyšším průměrným počtem alel byl v rodokmenu více zastoupen německý ovčák, který vykazuje v SSR markerech větší variabilitu.

Klíčová slova: československý vlčák, SSR markery, testy rodičovství, genetické markery

Summary

The aim of this thesis was to analyze the structure of the breed Czechoslovakian Wolfdog (364 individuals) and to characterize individuals by 8SSR loci (FH3210, FH3241, FH4012, FH2004, FH2010, REN214L11, FH2361 and C38) analysis. From Statistics on the Czechoslovakian Wolfdogs breed datababase Inbreeding coefficient (F_{x5} , F_{x8}), Ancestor loss coefficient (AVK5, AVK8) and Wolf Blood were detected. Before statistical analysis it was necessary to make Box-Cox data transformation to achieve normal distribution of values. Individuals were included in 3 groups – class A with low values, class B with average values and class C with the high values.

Paternity and maternity testing were performed in 36 full families and a 53 incomplete families. From the default population 6 individuals was scrapped for subsequent statistical evaluation due to their inadequate paternity and maternity or inadequate paternity their parents.

Evaluation of microsatellite loci variability showed the highest PIC in locus FH2361 (0,807). The lowest value of PIC (0,421) was observed in locus REN214L11. The following statistical analysis were set out the differences in the variability of selected breeding of significant parameters (Wolf Blood, coefficient of inbreeding - F_{x5} a F_{x8} and Ancestor Loss Coefficient- AVK5 and AVK8). Statistical analyses of these significant genetic parameters showed that in the category of wolf blood significant differences were found between the arithmetic means of the extreme groups and group with the average values.

There was a difference in the category F_{x8} , where the means of extreme groups varied. Furthermore, the difference was detected also for category AVK5 between the group with the highest values and the group with average values and also between the group with the highest values and the average of the whole population.

In the final analysis, statistical differences were found between the average number of alleles per locus, which were evaluated in a group of individuals with the lowest and the highest proportion of wolf blood of which would be to conclude that in individuals with a higher average number of alleles were more represented in the pedigree German Shepherd, which shows the SSR markers in contrast to the greater variability of the wolf.

Keywords: the Czechoslovakian Wolfdog, genetic markers, microsatellites, minisatellites, parentage testing

Obsah:

1. Úvod.....	11
2. Vědecké hypotézy a cíle práce.....	13
2.1. Vědecké hypotézy	13
2.2. Cíle diplomové práce	14
3. Literární rešerše	16
3.1. Charakteristika psovitých šelem a domestikace psa	16
3.1.1. Psovité šelmy	16
3.1.2. Vlk obecný (<i>Canis lupus</i>)	17
3.1.3. Domestikace psa	18
3.1.4. Primitivní druhy psů	20
3.2. Charakteristika plemene použitého v diplomové práci.....	20
3.2.1. Plemeno	20
3.2.2. Rozdělení plemen na základě analýzy mikrosatelitů	21
3.2.3. Ovčácká plemena psů	22
3.2.4. Novoplemenná křížení	22
3.2.5. Československý vlčák.....	22
3.2.6. Sarloosův vlčák.....	25
3.3. Genetické markery a jejich rozdělení	26
3.3.1. Rozdělení genetických markerů.....	26
3.3.2. Repetitivní DNA	28
3.3.3. Mitochondriální DNA.....	29
3.4. Tandemově se opakující sekvence DNA a jejich využití při studiu psího genomu	30
3.4.1. Polymerázová řetězová reakce (Polymerase Chain Reaction) jako nástroj pro detekci polymorfismů mikrosatelitních lokusů.....	30
3.4.2. Mikrosatelitní lokusy	32
3.4.3. Využití mikrosatelitních markerů pro genetické analýzy	33
3.4.4. Minisatelity	33
3.5. Aplikace genetických markerů při určování paternity, maternity a při studiu variability psích plemen.....	34
3.5.1. Testy paternity a maternity	34
3.5.2. Testy paternity a maternity založené na polymorfismu mikrosatelitů.....	35
3.5.3. Testy založené na polymorfismu minisatelitů	36

4. Materiál a metody	37
4.1. Volba modelového psího plemene a počty hodnocených jedinců	37
4.2. Izolace DNA a metody hodnocení její kvality a kvantity	37
4.2.1. Izolace DNA z buněk bukálních sliznic	37
4.2.2. Hodnocení vysokomolekularity izolované DNA	38
4.2.3. UV spektrofotometrické hodnocení kvantity a kvality izolované DNA	38
4.3. Mikrosatelitní markery použité pro hodnocení paternity a pro populační studii ...	39
4.3.1. Volba mikrosatelitních markerů a jejich lokalizace v psím genomu	39
4.3.2. Optimalizace postupu multiplex-SSR	40
4.3.3. Optimalizovaný metodický postup při aplikaci multiplex-SSR při určování paternity	40
4.3.4. Podmínky fragmentační analýzy	43
4.3.5. Identifikace alel mikrosatelitních lokusů	44
4.3.6. Bioinformatické a populačně genetické zpracování informací o polymorfismu mikrosatelitních lokusů	45
4.4. Porovnání alelických kombinací mikrosatelitních lokusů s cílem ověřit paternitu	45
4.4.1. Ověření paternity v úplných rodinách	45
4.4.2. Ověření paternity v neúplných rodinách	45
4.5. Charakteristika populace československého vlčáka z hlediska vybraných šlechtitelských parametrů	46
4.5.1. Podíl krve vlka v genomu československého vlčáka	46
4.5.2. Koeficient inbreedingu hodnocených zvířat	46
4.5.3. Koeficient ztráty předků	47
4.5.4. Testování normality rozdělení vybraných šlechtitelských parametrů u plemene československý vlčák a transformace dat	47
4.5.5. Rozdělení modelové populace československého vlčáka do kategorií podle úrovně vybraných šlechtitelských parametrů	47
4.6. Statistické hodnocení vztahu mezi polymorfismem mikrosatelitních lokusů a zařazením jedinců do skupin vybraných šlechtitelsky významných parametrů	48
4.6.1. Testování významnosti rozdílů mezi vytvořenými skupinami šlechtitelsky významných parametrů	48
4.6.2. Testování významnosti vlivu počtu heterozygotních SSR lokusů jedinců na zařazení do jednotlivých skupin šlechtitelsky významných parametrů	48

4.6.3. Testování významnosti vlivu průměrné heterozygotnosti jednoho SSR lokusu na zařazení jedince do jednotlivých skupin šlechtitelsky významných parametrů	49
4.6.4. Testování významnosti vlivu průměrného počtu alel jednoho SSR lokusu na zařazení jedinců do jednotlivých skupin šlechtitelsky významných parametrů	49
5. Výsledky	50
5.1. Markery mikrosatelitních lokusů	50
5.1.1. Kvantita a kvalita izolované genomické DNA	50
5.1.2. Specifičnost použitých markerů.....	50
5.1.3. Detekované alely hodnocených mikrosatelitních lokusů.....	54
5.1.4. Bioinformatické a populačně genetické vyhodnocení variability mikrosatelitních lokusů populace československého vlčáka	73
5.2. Vyhodnocení paternity.....	74
5.2.1. Vyhodnocení paternity v úplných rodinách.....	74
5.2.2. Vyhodnocení paternity v neúplných rodinách	75
5.2.3. Vyhodnocení konkrétních případů nepotvrzené paternity	76
5.3. Posouzení variability vybraných šlechtitelsky významných parametrů	77
5.3.1. Výsledky testování normality rozdělení a transformace dat.....	77
5.3.2. Rozdělení populace do skupin vytvořených na základě úrovní hodnocených parametrů	84
5.3.3. Statistické vyhodnocení rozdílů mezi vytvořenými skupinami	102
5.4. Statistické vyhodnocení vlivu počtu heterozygotních SSR lokusů jedinců na zařazení do jednotlivých skupin šlechtitelsky významných parametrů.....	106
5.5. Statistické vyhodnocení vlivu průměrné heterozygotnosti jednoho SSR lokusu na zařazení jedince do jednotlivých skupin šlechtitelsky významných parametrů ...	110
5.6. Statistické vyhodnocení vlivu průměrného počtu alel jednoho SSR lokusu na zařazení jedinců do jednotlivých skupin šlechtitelsky významných parametrů ...	114
6. Diskuze	118
6.1. Polymorfismus optimalizovaných multiplex-SSR markerů	118
6.1.1. Optimalizace postupu detekce polymorfismů mikrosatelitních lokusů.....	118
6.1.2. Zjištěné polymorfismy hodnocených mikrosatelitních lokusů a variabilita plemene československý vlčák	120
6.1.3. Heterozygotnost mikrosatelitních lokusů v hodnocené populaci československého vlčáka	121
6.2. Ověření paternity a maternity v modelové populaci československého vlčáka ...	121

6.2.1. Hodnocení paternity a maternity.....	122
6.2.2. Příklad 1 nepotvrzeného rodičovství	122
6.2.3. Případy 2 a 3 nepotvrzených rodičovství.....	124
6.2.4. Hypotézy a názory na možné příčiny nesouhlasu výsledků genotypizace některých zvířat s jejich rodokmeny	125
6.3. Vztahy mezi polymorfismem mikrosatelitních lokusů a hodnotami vybraných šlechtitelsky významných parametrů.....	127
6.3.1. Výběr šlechtitelských parametrů a jejich variabilita.....	128
6.4. Vztah mezi počtem heterozygotních SSR lokusů jedinců a jejich zařazením do skupin šlechtitelsky významných parametrů	129
6.5. Vztah mezi průměrnou heterozygotností jednoho SSR lokusu a zařazením jedinců do skupin šlechtitelsky významných parametrů	130
6.6. Vztah mezi průměrným počtem alel jednoho SSR lokusu a zařazením jedinců do skupin šlechtitelsky významných parametrů	131
7. Závěr	133
8. Přehled použité literatury	137
9. Seznam použitých zkratk	144
10. Přílohy.....	145

SEZNAM PŘÍLOH

- Příloha 1: Vlk obecný (*Canis lupus*)
- Příloha 2: Standard plemene Sarloosův vlčák československý vlčák
- Příloha 3: Československý vlčák (pes)
- Příloha 4: Československý vlčák (fena)
- Příloha 5: Standard plemene Sarloosův vlčák
- Příloha 6: Pufry a roztoky použité pro gelovou elektroforézu

1. Úvod

Mezi člověkem a psem vzniklo nejstarší přátelství, kterému předcházela proces domestikace, díky které pes změnil své chování od plachého zvířete k věrnému a oddanému společníkovi. Vlivem důkladné selekce tak mohl vzniknout nejvariabilnější druh ve vzhledu, velikosti, osrstění, mentalitě a dalších vlastnostech. V dnešní době rozeznáváme více než 400 různých plemen. Některá plemena si dodnes zachovala velkou podobnost se svým předkem, vlkem, jiná přísnou selekcí změnila dokonale svůj vzhled (např. čínský chocholatý pes).

Člověk měl v některých případech snahu zregenerovat psa křížením moderních plemen psů s vlkem. Sliboval si, že pes získá vlčí vytrvalost. Tento krok sice nepřinesl očekávané výsledky, ale dal vzniknout plemenům jako je československý vlčák a saarloosův vlčák.

Československý vlčák je poměrně mladé plemeno, které vzniklo v tehdejší Československu, křížením vlka a německého ovčáka. Jedná se o málopočetné plemeno a to nejen u nás, ale i v celé Evropě a možná proto, že si stále zachovává původní vlčí povahu, není vhodné pro každého majitele. Bude mít tedy i vyšší koeficient inbreedingu, který je možné regulovat výběrem vhodného krycího psa, jehož rodokmen a tedy i koeficient inbreedingu je možné snadno dohledat ve volně přístupné databázi Statistics on the Czechoslovakian Wolfdogs breed, jež umožňuje vyhledání koeficientů ztráty předků, podílu krve vlka, a je možné se dopátrat až k prvním zakladatelům jednotlivých linií. Proto bylo toto plemeno zvoleno jako modelové v diplomové práci.

Objevením dvoušroubovice DNA v roce 1953 učinili Watson a Crick první krok v oblasti molekulární genetiky, která se neustále rozvíjí a přináší nové poznatky o vývoji člověka, rostlin ale i zvířat. Objevením genetických markerů, které si zachovávají mendelistickou dědičnost, pomohlo odhalit mnoho dědičných chorob (jak u rostlin, tak u zvířat), vybrat vhodné jedince pro další rozmnožování a odhalit mezidruhové rozdíly. Mezi genetické markery patří např. mikrosatelity.

Mikrosatelity jsou krátké tandemově se opakující sekvence, jež se liší v délce a počtu opakování a jež vykazují vysokou hladinu polymorfismu. Byly objeveny přibližně před 30 lety a staly se velmi často využívanými genetickými markery při studiu populačně genetické struktury (zvířat i rostlin), při odhalení mezidruhových rozdílů, při mapování genomu, příbuzenských vztahů (např. při určování rodičovství), populačně-

genetické struktury volně žijících živočichů ale i v humánní medicíně. Mikrosatelity nejsou nijak závislé na pohlaví.

Základem principu testování paternity a maternity jsou zákony mendelistické dědičnosti. Každý jedinec zdědil 2 alely v daném mikrosatelitním lokusu, přičemž jednu zdědil od otce a druhou od matky. Každý jedinec může být v daném lokusu homozygot nebo heterozygot. U konkrétního jedince bude existovat variabilita mezi dvěma sadami genetických markerů. K detekci těchto markerů může být použita např. gelová elektroforéza, pro kterou je zapotřebí vzorky nejprve amplifikovat pomocí metody PCR. Po vyhodnocení pak může být jednoznačně stanoveno, zda potenciální otec nebo matka je, nebo není skutečným biologickým rodičem.

2. Vědecké hypotézy a cíle práce

2.1. Vědecké hypotézy

Řešení diplomové práce je založeno na přijetí nebo vyvrácení některých vědeckých hypotéz. Tyto hypotézy vyplývají ze studia problematiky molekulární a populační genetiky psů. Výchozí hypotézy mohou shrnout do následujících bodů:

- U psa bylo identifikováno velké množství mikrosatelitních lokusů, které jsou lokalizovány na autozomech i gonozomech. Mikrosatelitní lokusy umístěné na autozomech jsou charakteristické vždy dvojicí alel a markery těchto lokusů vykazují kodominantní charakter.
- Pro variabilitu jednotlivých mikrosatelitních lokusů je charakteristický mnohočetný alelismus. Počet alel, které se mohou vyskytovat v jednotlivých lokusech je závislý na konkrétním, lokusu. Mezi jednotlivými lokusy existuje variabilita v počtu nalezených alel. Schopnost jednotlivých lokusů podávat informace o variabilitě je možné vyjádřit pomocí parametru PIC.
- Mikrosatelitní lokusy vykazují Mendelistickou dědičnost a z důvodů podvojného založení a kodominance lze tyto markery použít pro řadu genetických studií jako je například určení paternity a maternity nebo posuzování homeostáze populace.
- Protože mikrosatelitní lokusy představují nekódující část DNA, lze předpokládat, že se z hlediska selekce budou chovat neutrálně. Existují však mikrosatelitní lokusy, které jsou lokalizovány v těsné genové vazbě s některými geny a tudíž v důsledku selekce budou ovlivněny i rovnováhy alel těchto vázaných mikrosatelitních lokusů.
- Mikrosatelitní markery jsou stabilní, ale přesto nelze vyloučit vznik mutací *de-novo*, které mohou způsobit změnu počtu opakování mikrosatelitních motivů. Dvojice primerů nezbytné pro amplifikace mikrosatelitních lokusů je možné navrhnout tak, aby v jedné amplifikační reakci probíhala syntéza fragmentů většího počtu mikrosatelitních lokusů současně. Tento předpoklad je základem pro navrhování multiplex-SSR markerů.
- Vzhledem ke kodominanci mikrosatelitních markerů je možné na základě porovnání pozorované a očekávané heterozygotnosti, zda pozorovaná populace je podle Hardy-Weinbergova zákona v rovnováze. Plemeno československý vlčák patří mezi mladá plemena, ale lze předpokládat, že v průběhu plemenitby

došlo k příbuzenskému křížení. Příbuzenská plemenitby vede k homozygotizaci populace, tedy ke snižování genetické variability.

- Lze předpokládat, že příbuzenské křížení bude snižovat rovněž i variabilitu mikrosatelitních lokusů, kterou lze blíže charakterizovat například pomocí počtu heterozygotních lokusů hodnocených zvířat, pomocí heterozygotnosti mikrosatelitních lokusů, nebo pomocí počtu alel v mikrosatelitních lokusech.
- Opakované zařazení vlků s neznámou genetickou variabilitou při vzniku plemene československý vlčák mohlo teoreticky vést ke snížení genetické variability současných představitelů plemene československý vlčák. Hypoteticky lze předpokládat, že vlci použité pro vyšlechtění plemene představovala zvířata chovaná člověkem a tudíž jejich genetická variabilita nemusela být vysoká.

2.2. Cíle diplomové práce

Na základě výše uvedených vědeckých hypotéz bylo možné navrhnout konkrétní cíle pro řešení diplomové práce. Tyto cíle je možné vyjádřit následujícími body:“

1. Zpracovat literární rešerši zaměřenou na problematiku mikrosatelitních analýz psího genomu.
2. Vybrat modelovou populaci plemene československý vlčák, která bude představovat jedince se známým původem, a u kterých bude k dispozici biologický materiál určený k izolaci DNA.
3. Provést studium rodokmenů všech jedinců vybrané populace s cílem identifikovat úplné a neúplné rodiny.
4. U všech hodnocených jedinců populace stanovit hodnoty koeficientů inbreedingu, koeficientů ztráty předků a podílu krve vlka.
5. U šlechtitelsky významných parametrů uvedených v předchozím bodě uvádějící normalitu rozdělení a v případě, že rozdělení dat neodpovídá normálnímu rozdělení. Navrhnout a provést transformaci dat s cílem přiblížit se parametrům normálního rozdělení.
6. U všech šlechtitelsky významných parametrů vypracovat způsob rozdělení jedinců do kategorií tak, aby byly získány skupiny jedinců s extrémně vysokými a extrémně nízkými hodnotami studovaných parametrů.
7. U hodnocených jedinců izolovat genomickou DNA z buněk bukálních sliznic pomocí komerčně vyráběného kitu.

8. Optimalizovat systém SSR-multiplex markerů a modelovou populaci hodnotit pomocí 8 autozomálních mikrosatelitních lokusů.
9. Provést bioinformatické zpracování molekulárních dat pomocí parametru zjištěné a očekávané heterozygotnosti, PIC, v počtu heterozygotních lokusů jedinců, průměrné heterozygotnosti jednotlivých lokusů a průměrného počtu alel jednotlivých lokusů.
10. Provést statistickou analýzu zaměřenou na vyhodnocení vztahů mezi zařazením jedinců do jednotlivých skupin vytvořených na základě hodnot koeficientu inbreedingu, koeficientů ztráty předků a podílu krve vlka a variabilitou mikrosatelitních lokusů vyjádřenou pomocí počtu heterozygotních lokusů jedinců, průměrnou heterozygotností lokusů a průměrného počtu alel jednotlivých lokusů.

3. Literární rešerše

3.1. Charakteristika psovitých šelem a domestikace psa

3.1.1. Psovité šelmy

Za první předky všech šelem jsou považováni *Creodonti*. Před 40 miliony lety se v průběhu pozdního eocénu a časného oligocénu objevila čeleď *Miacidae*, která se pokládá za společného předka vlků, šakalů a kojotů. Velikostí a stavbou těla se podobal lasici a měli chrup psovité šelmy. Vyhynul asi před 20 milióny lety před naším letopočtem (Gingerich, 1983).

Podle archeologických kosterních nálezů byl za nejstaršího „prapsa“ považován *Tomarktus*, který byl velký asi jako liška a žil přibližně před dvaceti milióny lety. Nové výzkumy ukazují, že se *Tomarktus* na přímém vývoji psa domácího nepodílel a jednalo se pouze o jeho slepou vývojovou větev. V současné době se za předka retenčních psovitých šelem považuje *Leptocyon*, který byl podobný dnešním Nandiniím (Šebková, 2010; Wang, 1993).

Téměř všichni zástupci mají podobnou morfologii – protáhlé štíhlé tělo na vyšších nohách, prodloužený čenich, poměrně malé tlapy s nezatažitelnými drápy, bohatou srstí a dlouhý hustým ocasem. Podle typu nášlapu je řadíme mezi prstochodce. Většina zástupců má 42 zubů, velmi vyvinuté trháky a velké špičáky (Anděra et al. 1999).

Většina psovitých žije v hierarchicky uspořádaných smečkách a díky dobře zorganizovanému lovu, dobré orientaci, vynikajícímu čichu i sluchu, dosahují velmi dobrých loveckých úspěchů. Ovšem lišky mimo období páření žijí samotářsky (Weissenberger, 2011).

Po celém světě se vyskytuje 35 druhů psovitých šelem a z toho jsou u nás 2 druhy původní. Z neznámějších zástupců sem patří: liška obecná, šakal obecný, pes hyenový, kojot préríjní, dingo a vlk. (Gaisler a Zíma, 2007).

3.1.2. Vlk obecný (*Canis lupus*)

Říše: *Animalia*

Kmen: *Chordata*

Třída: *Mammalia*

Řád: *Carnivora*

Čeleď: *Canidae*

Rod: *Canis*

(Zdroj: BioLib.cz)

Vlk patří mezi největší evropské psovité šelmy. Původně byl rozšířen po celé severní polokouli, ale díky pronásledování lidmi byl částečně vyhuben. Dnes se vyskytuje v Severní Americe, Evropě, Blízkém východě a Asii, kde obývá lesy, tundry, pouště, travnaté oblasti a hory (Godinho, 2011). U nás byl poslední vlk zastřelen v polovině 19. století a dnes se na území České republiky může pouze zatoulat ze sousedního Slovenska nebo Polska. Od roku 2002 je u nás zařazen mezi kriticky ohrožené druhy (Findejs et al. 1998).

Canis lupus se dále dělí asi na 13 - 16 poddruhů, lišící se konstitucí, stavbou těla, kvalitou i barvou srsti (od rezavohnědé až po šedočernou barvu), tvarem hlavy, apod. Dosahují hmotnosti od 25 do 80kg, kohoutové výšky od 55 do 80cm a délky těla až 160cm (ocas bývá dlouhý okolo 60cm) (Červený et al. 2000).

Základním kamenem vlčí rodiny je smečka. V létě je tvořena jednou rodinou, kdežto v zimě se sdružují vlčí rodiny do větších smeček, které mají 10-15 členů. Smečka vlkům zajišťuje bezpečí, vyšší šanci na kořist, výchovu mláďat a ochranu lovišť. Ve smečce platí přísná hierarchie, kterou smí porušit pouze vlčata, ale jen do určitého věku. Na vrcholu stojí jeden alfa samec a jedna alfa fena (Červený et al. 2004).

Mimo období rozmnožování vlci nejsou vázáni na konkrétní místo a jsou schopni putovat za potravou po rozsáhlém teritoriu mnoho kilometrů (Anděra et al. 1999).

Vlci jsou monogamní. Feny přicházejí do říje na rozdíl od psů pouze jednou ročně v období od ledna do března (Darimont et al. 2009). Březost trvá 56-63 dnů a feny rodí 5-7 vlčat. Několik dnů po porodu fena začíná lovit v blízkém okolí brlohu. Asi po dvaceti dnech začíná vlčata přikrmovat natrávenou potravou ze žaludku. Vlci a ostatní členové smečky pomáhají vlčici tím, že jí přinášejí svou kořist. Po čtyřech až pěti týdnech jsou vlčata odstavena a začínají přijímat tuhou potravu. Vlci pohlavně dospívají

ve 2-3 letech a mohou se dožít 12 až 16 let. Mladí vlci, dokud se neosamostatní, nebo nenajdou partnera, nebo volné teritorium, zůstávají se smečkou (Hartl a Jedlička, 1996).

Hlavní složku potravy tvoří maso ulovených i uhynulých zvířat. Z kořisti spotřebuje vše kromě velkých kostí skotu. Loví hlavně kopytníky (jeleny, soby, srnce, divoká ale i domácí prasata, ovce, popř. pasoucí se dobytek). Nepohrdne ani zajíci a ostatními hlodavci, obojživelníky nebo plazy (Uhlenbroaková, 2009). Zástupce tohoto druhu je znázorněn v příloze 1.

3.1.3. Domestikace psa

Domestikace je plánovitý proces osvojování si zvířat člověkem, tedy přeměna divokého zvířete ve zvíře domácí. Domestikace psa je spjata s počátky lidského rodu. Podle genomického výzkumu se pes oddělil od vlka již před 100 000 lety, ale vlastní domestikace je datována od doby před 40 000 lety. Podle některých zdrojů by mohla začít již před 135 000 lety (Dostál, 2007).

Vývoj a domestikace psa probíhaly prakticky po celém světě. Dokazují to četné kosterní nálezy psů v různých světadílech. Nejstarší kosterní nálezy dokazující počátky domestikace byly objeveny na území dnešního Iráku a Íránu a jsou staré přibližně 10 000 až 15 000 let (Swenson, 2001).

Centra domestikace byla většinou na místech, na kterých člověk přešel od fáze lovu k zemědělství a usedlému způsobu života, ačkoliv domestikace probíhala i na místech, na kterých lidé zůstali u fáze lovu, protože tehdejší klimatické podmínky byly pro zemědělství nevyhovující (Ruvinsky a Sampson, 2001).

Předchůdci dnešních psů se stejně jako pravěcí lidé šířili do okolního světa nejvíce ze dvou oblastí – z Afriky a z Asie, ale také z Evropy, což dokazují četné kosterní nálezy pocházející z doby 7500 let před naším letopočtem. Mezi genomem evropských a asijských psů je rozdíl, což by mohlo znamenat, že evropská plemena psů se vyvinula z jiných poddruhů vlka nežli plemena asijská. Při vykopávkách nebyly nalezeny celé kostry, ale pouze fragmenty skeletů. Díky tomu, že pravděpodobně neustále docházelo ke křížení mezi psy divokými a domácími, nemůžeme určit přesné datování přechodu psa od divoké formy k domácí (Císařovský, 2008; Dostál 2005; Räber, 1994).

Kompletním osekvenováním psího genomu v roce 2005 jsme nyní schopni určit, kdy a kde byla započata domestikace a také kdo byl předkem psa domácího. Studium

psiho genomu se zjistilo, že mitochondriální DNA psa a vlka se nijak významně geneticky neliší, tedy předkem psa bude s velkou pravděpodobností vlk (Anderson et al., 2002; Sargan et al. 2007).

Fáze domestikace

Podle Råbera (1994) můžeme přeměnu vlka v psa domácího rozdělit do 4 fází: V první fázi v době kamenné byl člověk obklopen divokými psy, kteří lovili stejnou kořist jako on. Později došlo k postupnému sblížení vlka a člověka, oba pak začali žít ve vzájemné symbióze, ze které vlk získal od člověka snadnou potravu a to buď v podobě zbytků z kořisti, nebo odpadků. Odměnou za to mohl člověka upozornit na možná nebezpečí v podobě dravých šelem nebo příslušníků cizích tlup. Ve druhé fázi se vlk (pes) stal na člověku závislejší a člověk začal poprvé korigovat plemnitbu a bránil křížení s divokými formami zvířat. Ve třetí fázi člověk už vědomě bránil křížení s divokými zvířaty a snažil se vědomě upevnit povahu, odchylky či mutace, které by v přírodě byly vyřazeny. Do čtvrté fáze přešel pes přibližně až v 19. století, kdy člověk stavěl na první místo nejvíce vzhled svých domácích zvířat. Tuto fázi označit jako počátek vzniku plemen (Gagliardi et al. 2011).

Domestikační změny:

V průběhu domestikace došlo k mnohým morfologickým změnám - např. se zmenšila lebka, u některých plemen se zkrátila čelisti, zmenšil se objem mozku a to až o 30%. Díky tomu se zmenšila smyslová centra, zhoršila se samostatnost při řešení problémů a stoupla cvičitelnost a závislost na člověku. Zároveň se oslabila či dokonce úplně vymizela plachost. Po psychické stránce některá plemena psů zůstala na úrovni 4 – 5 měsíčního vlčete. Rovněž došlo ke změně hlasových projevů – zatímco vlci pouze kňučí, vyjí. Mezi členy smečky komunikují více výraznou obličejovou mimikou. U psů se tato komunikace zmenšila na minimum a pravděpodobně kvůli dorozumívání s člověkem začali štěkat (Ruvinsky a Sampson, 2001).

Změnou složení přijímané potravy (od masožravců ke všežravcům) došlo k prodloužení zažívacího traktu. Domestikací se u psů změnila barva a struktura srsti, mnohdy došlo ke zkrácení končetin (např. u jezevčků), u některých plemen došlo k zakroucení ocasu, objevily se svislé ušní boltce, kožní řasy a záhyby. Většina plemen psů začala být diestrická na rozdíl od vlků, kteří jsou pouze monoestriční (Irion et al. 2003).

3.1.4. Primitivní druhy psů

Pes bažinný (rašelinní) (*Canis familiaris palustris Rütimer*) žil v mladší době kamenné asi 10 000 let před naším letopočtem. Vzhledem se podobal dnešnímu špicovi, byl menšího až středního vzrůstu. Byl to prapředek špiců, pinčů, teriérů, kníračů, dobrmanů a erdelteriérů.

Pes Inostranzewův (*Canis familiaris Inostranzewi*) jeho kosterní fragmenty byly nalezeny v okolí Ladožského jezera. Na rozdíl od psa bažinného byl mnohem mohutnější a je pravděpodobně přímým potomkem severoevropských vlků nebo jejich kříženců se psem bažinným. Tento druh dal původ přírodním plemenům, která si dodnes z vlčích předků dochovala mnoho vlčích vlastností (jako např. monoestricita, menší vrhy štěňat, apod.). Jsou to např. plemena: husky, lajka, norský losí pes, keeshound a psi eskymáctí.

Canis familiaris decumanus byl velmi robustní. Stal se předchůdcem dnešních molosoidních plemen. Stavbou těla se nejvíce podobá dnešním dogám a některá se dochovala v téměř nezměněné podobě od dob antiky.

Pes bronzový (*Canis familiaris matris optimae*) pochází z doby bronzové přibližně 4 – 5 000 let před naším letopočtem. Dal vzniknout ovčáckým plemenům – např. německému ovčákovi, belgickým ovčákům a kolii, kteří si po psovi bronzovém zachovali stejnou stavbu kostry a tvar lebky.

Pes popelištní (*Canis familiaris intermedius*) žil na našem území a byl středního vzrůstu. Stavbou lebky připomíná dnešní brakýře a lovecké pudly.

Canis familiaris leineri pochází z mladší doby kamenné a možná byl prapředkem dnešních chrtů, u kterých dosud neznáme jejich přesný původ. Morfologií lebky se vůbec nepodobali vlkům, ale více připomínají dnešního šakala (na rozdíl od ostatních plemen mají menší mozkovnu). Chrti měli dvě centra domestikace – východoevropské a severoafrické stepi. Podle některých teorií se vyvinuli ze stepních vlků a podle jiných vznikli z křížení stepních vlků se šakalem (Šebková, 2010).

3.2. Charakteristika plemene použitého v diplomové práci

3.2.1. Plemeno

Plemena jsou druhy držené člověkem v sexuální izolaci, které se liší ve více znacích a ve vlastnostech předávaných dále na potomky a kterými se liší od jiných jedinců stejného druhu.

Díky vysoké variabilitě psiho genomu je obtížné určit vývoj jednotlivých plemen, ale díky archeologickým vykopávkám můžeme určit primitivní poddruhy psů, ze kterých odvozujeme dnešní plemena psů. Na počátku domestikace došlo k upevnění genů, které se podílí na projevu celkového fenotypu. Díky geografické izolaci, působení člověka a vnějším podmínkám prostředí začala vznikat plemena primární, neboli fundamentální. Tento proces začal pravděpodobně už v mezolitu, kdy člověk začal cíleně bránit sexuálnímu kontaktu s divokými zvířaty a začal upevňovat a dál rozmnožovat odchylky, které se mu zalíbily např. krotkost, zbarvení – bílé znaky apod. (Räber, 1994).

Prvním chovatelům záleželo nejvíce na tom, aby pes předal na potomky své schopnosti a bez ohledu na vnějším vzhledu. Tyto potomky dál křížili mezi sebou, díky čemuž vznikla více nebo méně ohraničená plemena. Dopomohl k tomu také názor, že určité morfologické znaky souvisejí s dobrými vlastnostmi, např. pes s převislým uchem měl dobrý čich pro stopování.

Na počátku 19.stol měl vzhled psa větší význam nežli původní účel, pro který byli dříve chováni, ale dosud nebyly zavedeny žádné ustálené plemenné standardy. Ve druhé polovině 19. století došlo k ustálení plemen psů díky selekci a křížení nejprve raných forem psů s vhodnými typy psů a pak i ustálenými plemeny, aby se dosáhlo žádoucích znaků (morfologických i povahových) (Ruvinsky a Sampson, 2001), čímž se ale u některých plemen značně snížila genetická variabilita (Irion et al. 2003).

3.2.2. Rozdělení plemen na základě analýzy mikrosatelitů

Do 1. skupiny patří ancestrální plemena, která jsou nejbližší vlkům. Můžeme u nich spolehlivě určit, jak a kdy se postupně se od vlka oddělovala. Můžeme sem zařadit tato plemena: šarpej, šiba inu, čau čau, akita, basenji, sibiřský husky, aljašský malamut, afgánský chrt, saluki, tibetský teriér, samojed, lhasa apso, pekinéz a shit-zu. Do druhé skupiny patří psi molosoidních plemen. Do třetí skupiny můžeme zařadit plemena ovčácká, barzoje, irského vlkodava a svatobernardského psa. Ve čtvrté skupině najdeme ostatní plemena a to hlavně lovecká plemena evropského původu (Císařovský, 2008).

3.2.3. Ovčácká plemena psů

K nejstarším formám zemědělství patří pastevectví ovcí, což byl první krok přechodu od lovců a sběračů k prvním zemědělcům. Při pastevectví pes pomáhal hlídat a ochraňovat stáda. Našli své uplatnění i při lovu medvědů, vlků, ale také divokých prasat.

Podle Cho (2005) tato skupina plemen vznikla pravděpodobně v Asii, v Tibetu, díky počátkům obchodních styků z Asie směrem na Západ, při kterých psi doprovázeli své pány, možná už od období neolitu.

Jsou to typy podobné divokým psům. Jsou pro ně typické: delší tělo než je kohoutková výška, ploché čelo, špičatý čenich, velké vzpřímené uši, většinou kratší tuhá srst a svěšený ocas (Räber, 1994).

3.2.4. Novoplemenná křížení

Novoplemenným křížením se myslí spojování již ustálených plemen psa domácího nebo zpětné křížení domácího psa s divokým předkem, vlkem (Anderson et al. 2002). Původním cílem bylo upevnit psí povahu, nebo dosáhnout většího výkonu u psů, vyšší jedince a větší vytrvalost (např. u tažných psů). Toto „osvěžování krve“ znamenalo v domestikaci krok zpět a proto téměř nikdy nepřineslo očekávané výsledky (jedinci byli plašší, málo štěkali, což snižovalo možnosti dalšího využití) – bylo to i díky tomu, že domestikace trvala desítky tisíc let a genetické změny probíhaly kousek po kousku. Zpětné křížení původního vlka se zdegenerovaným genomem současného psa vyvolává genetický šok. Křížení vlka se psem probíhá po celém světě, ale nejvíce v USA. Ke křížení vlka se psy se nejčastěji využívá německý ovčák, méně aljašský malamut a sibiřský husky (Muñoz-Fuentes et al. 2009).

3.2.5. Československý vlčák

Země původu – bývalé Československo

Patronát: Slovenská republika

FCI č. 332

Skupina 1: Ovčáci a honáčtí psi

Sekce 1: Ovčáci

Využití: pracovní pes

Datum vydání platného standardu 28. 4. 1994

Standard plemene je uveden v příloze 2, typičtí představitelé plemene jsou znázorněni v příloze 3 a 4.

Historie plemene:

Pokusy křížit německé ovčáky s vlky v Československu byly připravovány již od roku 1955. V roce 1957 se Ing. Karel Hartl poprvé pokusil křížit karpatskou vlčici Brittu s německým ovčákem. První spojení se bohužel nepodařilo, protože nebyla dostatečně zajištěna kontrola doby hárání. O rok později byl k vlčici připuštěn německý ovčák Cézár z Břízového háje. V tomto spojení byl křížen klidný pes s agresivnější vlčicí, oba ve vlkošedém zbarvení. Původním cílem tohoto křížení nebylo vytvořit plemeno nové, ale pouze zjistit, zda dosáhne stejné plodnosti u vlků a i u kříženců a zda se potomci budou více podobat vlku či německému ovčákovi po stránce genetické, fyziologické a také i morfologické. Bylo zjištěno, že neexistuje statisticky významný rozdíl mezi plodností kříženců a jejich rodičů (Findejs et al. 1998).

Vlastnosti prvních kříženců

U dvou třetin kříženců, feny zůstaly monoestrické stejně jako vlčice (Räber 1994). V F1 generaci se významně projevilo vlčí chování (plachost, prchání, agresivita při překročení „kritické vzdálenosti“) (Císařovský, 2008) a všechna štěňata byla vlkošedě zbarvená. Do následných křížení byli vybíráni pouze němečtí ovčáci silné povahy. Všichni psi museli mít výrazný fenotyp, ale pro použití psů do chovu byla důležitější povahová stránka před exteriérem (Hartl a Jedlička, 1996). V dalších generacích klesal podíl vlčího zbarvení ve vrhu a ve třetí generaci již bylo možné vybrat jedince, kteří byli vhodní pro výcvik. Ovšem neprokázalo se, že by vlkošedé zbarvení mělo významnou korelaci s původní plachou povahou vlka. (Findejs et al. 1998).

Kříženci oproti německým ovčákům vynikali kvalitnější srstí s lepšími izolačními schopnostmi, větší vytrvalostí v zátěžových testech proti německým ovčákům, čichovými schopnostmi a také orientačním smyslem. Psi byli rovněž odolnější proti vedru a vlhku. Jen velmi málo psů (i ze třetí generace) bylo vhodných pro výcvik. Kříženci se plně přimkli k člověku, který je krmil a pečoval o ně, ale s cizími lidmi vycházeli obtížněji než němečtí ovčáci (Hartl a Jedlička, 1996).

Počátky vzniku plemene

V roce 1958 major Rosík s nadporučíkem Kubaškem poprvé navrhli vyšlechtit nové plemeno, kdy použili prvního křížence po Brittě a Césarovi, jako strážného psa u pohraniční stráže. Aby nedocházelo k inbreedingu, byly založeny nezávislé chovné linie, ve kterých byli ve většině případů použiti psi německých ovčáků z domácího chovu.

Podle Findejse (1998) v roce 1966 Ing. Karel Hartl vypracoval první plemenný standard. Tehdy již existovaly čtyři filiální generace kříženců z první skupiny po Brittě a Césarovi a dvě filiální generace po Brittě a německém ovčáku Kurtu z Václavky. Zároveň byla poprvé podána žádost na odbornou komisi Svazarmu o zapsání vlčáků do plemenné knihy. Tato žádost byla zamítnuta z důvodu malého počtu jedinců v chovu, díky kterému rapidně poklesl zájem chovat nové plemeno. V Čechách a na Slovensku zůstalo jen několik chovatelů.

V sedmdesátých letech byla většina kříženců převezena do Malacek, bratislavského útvaru Pohraniční stráže, kde populaci obohatil vlk Šarik, který byl spojen s kříženkou třetí filiální generace Xelou z Pohraniční stráže a s fenou československého vlčáka Urtou z Pohraniční stráže.

V roce 1982 u nás vznikl Klub československých vlčáků a to nejprve v Brně, o měsíc později i v Praze a téhož roku byl československý vlčák uznán kynologickým svazem tehdejší ČSSR, jako národní plemeno (Císařovský, 2008; Hartl a Jedlička, 1996).

Kvůli malému počtu zvířat měli chovatelé problém udržet přirozenou strukturu genofondu a zabránit inbreedingu. Ten se podařil zmírnit křížením německého ovčáka Bojara von Schotterhofa s vlčicí Lejdy ze ZOO Hluboká a vybraný pes z toho spojení Kazan z Pohraniční stráže byl několikrát použit k další plemenitbě. V celém křížení za 25 let se na vzniku plemene se podíleli čtyři vlci – Britta, Argo, Šarik a Lejdy.

Dne 13. června v roce 1989 bylo uznáno i u F.C.I. pod jménem Československý vlčák (Czechoslovakian Wolfdog, Tschechoslowakischer Wolfshund, Perro lobo checoslovaco, Chien-Loup Tchecoclovaque). Po zániku Československa přebrala patronát nad plemenem Slovenská republika a v roce 1999 byl definitivně zaregistrován FCI jako standard č. 332 (Findejs et al. 1998).

Povaha

Na rozdíl od Sarloosova vlčáka je samostatnější a méně ostýchavý. Je to temperamentní, inteligentní, velmi aktivní, hravé a vytrvalé plemeno, kterému stále zůstávají původní instinkty vlka. Převládá orientační a aktivně obranná reakce (Císařovský, 2008). Má komplexní sociální chování, je velmi teritoriální a k cizím příslušníkům svého druhu ve vlastním revíru je velmi nesnášenlivý. Nebojácný a k cizím lidem velmi nedůvěřivý, ale ke svému pánovi je velmi věrný. Podobně jako Saarloosův vlčák málo štěká. Je vhodný pouze pro zkušené chovatele. Nachází využití jako služební pes a pouze omezeně jako doprovodný pes (Hartl a Jedlička, 1996).

3.2.6. Sarloosův vlčák

Země původu: Nizozemsko

FCI: č. 311

Skupina 1: Ovčáctí a honáctí psi

Sekce 1: Ovčáci

Standard plemene je uveden v příloze 5.

Historie plemene

Jedná se poměrně o mladé plemeno. Jméno plemene bylo odvozeno po jeho nizozemském zakladateli Leenertu Saarloosovi (1884 - 1969), který se bouřil proti nesmyslnému přešlechtování psích plemen. Podle jeho názoru současná plemena v průběhu domestikace zdegenerovala. Chtěl proto znovu vyšlechtit „přírodního“ psa, který by se tělesnou i duševní stránkou podobal vlkovi.

V roce 1932 poprvé spáril psa německého ovčáka Gerhada van de Fransenum se sibiřskou vlčicí Fleur z Blijdorp ze Zoo v Rotterdamu a toto křížení neustále opakoval. Narození kříženci byli plaší a ve vztahu k lidem velmi nespolehliví. Potomky dál křížil s Německými ovčáky a doufal, že přísnou selekcí získá nové plemeno, které by odpovídalo jeho představám. Mnoho štěňat mu zahynulo na psinku, protože Saarloos mylně předpokládal, že kříženci a vlci budou odolní vůči „civilizačním chorobám“ a odmítl je proti psince očkovat. Díky této chybě mu nakonec pošla i vlčice. I po několika generacích psům zůstávala vlčí plachost a opatrnost (Räber, 1994).

Sarloosův vlčák by býval zaniknul, pokud by v roce 1975 „Raad van Beheer op Kynologíích Gebied in Nederland“ neuznal vlčáka jako nizozemské plemeno a podle

jeho zakladatele jej nazval Saarloosův vlčák. V roce 1979 byl i uznán standard u F.C.I. jako standard č. 311.

V další práci po zakladateli plemene pokračovala společnost „Nederlase Vereniging van Saarlooswolfhonden“ Zaměřovala se oproti Saarloosovi více na exteriér než na charakterové vlastnosti, což se jim ale nevyplatilo. V průběhu několika let byli psi plaší až bázlívní a jejich povahu se dařilo napravit jen v období rané socializace. Dospělosti dosahuje oproti ostatním psům poměrně pozdě – až ve dvou až třech letech (Císařovský, 2008).

Povaha

Díky křížení vlka a německého ovčáka podělil značnou část povahy po vlkovi. Saarloosovi vlčáci jsou inteligentní, nedůvěřiví, ostražití, ale také nezávislí a svéhlaví. Jsou nedůvěřiví k neznámým lidem, zvířatům a věcem. Mají výborný čich, velkou výdrž a velmi dobře vyvinutý lovecký instinkt.

Jeho největším povahovým plusem je jeho touha žít co nejbližší vlastní rodině, teda projev vysokého stupně sociálního citění smečkového zvířete. Čemuž se musí i přizpůsobit výchova, která vyžaduje klidný a trpělivý přístup (Räber, 1994).

Využití

Kvůli tomu, že podobně jako československý vlčák málo štěká, není proto vhodný jako pracovní pes. Štěkot spíše připomíná kašel. (Císařovský, 2008). Původně byl vyšlechtěn jako slepecký pes, ale pro funkci není vhodný, protože v něm stále zůstává plachost a opatrnost a nelze jej používat v běžném městském ruchu (Verhoef-Verhallen, 2007).

3.3. Genetické markery a jejich rozdělení

3.3.1. Rozdělení genetických markerů

Jednu z možných definic molekulárních markerů uvádí Chloupek (2000), který rozeznává dva základní typy markerů – proteinové a DNA. Proteinové markery jsou produkty určitého lokusu, které se dají separovat v gelové matici a následně vizualizovat barvením (Chloupek, 2000). DNA markery lze definovat specifickou

strukturou úseků DNA a je možné hodnotit je pomocí molekulárně-genetických metod (Chloupek, 2000).

Pomocí genetických markerů lze sledovat lokusy, které jsou předávány z generace na generaci a odhadovat polymorfismus v genomu (Sunnuck, 2000). Především DNA markery lze využít v řadě oblastí základního i aplikovaného biologického výzkumu. DNA markery mohou sloužit například ke studii genetické variability na vnitro i mezidruhové úrovni, k odhalení příčin dědičných onemocnění, k identifikaci jedince či určování rodičovství (Ichikawa et al., 2001). Dají se rovněž aplikovat i v rámci šlechtitelských programů, kde mohou usnadnit výběr vhodných jedinců z hlediska požadované vlastnosti a tím celý šlechtitelský proces urychlit. V takovémto případě pak mluvíme o tzv. MAS - Marker Assisted Selection (Korzun, 2002).

Obliba DNA markerů spočívá v řadě předností oproti jiným typům markerů např. morfologickým či biochemickým. Jednou z výhod je jejich obecná aplikovatelnost u všech organismů u kterých byla zvládnuta izolace DNA. Další výhodou je, že nejsou závislé na podmínkách vnějšího prostředí nebo ontogenetickém stádiu organismu. Navíc jsou metody využívající molekulárních markerů tzv. nedestruktivní, což znamená, že stačí nepatrné množství DNA studovaného organismu, které lze získat bez velkého invazivního zákroku. Vhodným živočišným materiálem je například malé množství krve, spermatu, chlupových cibulek atd. (Irion et al. 2003).

K získávání a analýze DNA markerů lze s úspěchem využít celou řadu molekulárně-genetických metod, které jsou v obecném principu založeny na restrikčním štěpení, hybridizaci, amplifikaci či kombinaci výše uvedeného. Použití konkrétní metody se odvíjí od množství dostupných genetických informací o daném organismu, časové, technické a finanční náročnosti (Kenis, 2003).

Příkladem metody založené na restrikčním štěpení s následnou hybridizací je RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism). Tato metoda se vzhledem ke své technické a časové náročnosti příliš nepoužívá a v současné době převažují metody jejichž součástí je amplifikace cílových úseků DNA např. AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism), SSR (Simple Sequence Repeat), STS (Sequence Tagged Sites), PCR-RFLP (Šmarda et al. 2005).

V další části literární rešerše se úmyslně zaměřím pouze na charakterizaci nekódujících sekvencí genomu psa. Důvodem je skutečnost, že při řešení experimentu diplomové práce se nevěnuji markerování konkrétních genů, ale naopak se zabývám problematikou využití mikrosatelitních markerů, v nekódujících oblastech genomu.

3.3.2. Repetitivní DNA

Prokaryotické organismy mají DNA složenou převážně z kódujících úseků, zatímco u mnohobuněčných eukaryot je DNA složena jak z exonů a intronů, tak i ze sekvencí které nic nekódují nebo dosud neznáme jejich pravou funkci. V lidském genomu tvoří repetitivní sekvence přibližně 30% celkové DNA a můžeme je rozdělit do dvou typů- na tandemové a rozptýlené repetic (Snustad a Simmons, 2009).

Chromozomy eukaryot obsahují mnoho repetitivní DNA v haploidní sadě chromozomů a tvoří 15—80% eukaryotních genomů. Nejčastější opakující se sekvence nejsou transkribovány a ani nejsou překládány do polypeptidového řetězce.

Nejrozšířenějšími z repetitivních sekvencí DNA jsou transponovatelné genetické elementy (retrotranspozony- např. LINE a SINE elementy) – sekvence DNA, které se mohou přemísťovat nejen v rámci chromozomu z místa na místo, ale dokonce i z chromozomu na chromozom (Alberts et al. 2006).

Psi mají velké množství oblastí tandemových opakování, které se nachází v řídicí (regulační) oblasti mitochondriální DNA. Skládají se z 10 bp repetic, které se tandemově opakují a to obvykle 20 - 40krát. Většina psiho genomu se skládá z nekódujících úseků DNA, která je částečně tvořena repetitivními sekvencemi. Tyto opakující se sekvence se prokázaly jako neocenitelné pro genetické mapování, identifikaci jedince, testy paternity a také např. pro sledování domestikačních změn při přeměně ze psa na vlka (Ruvinsky a Sampson, 2001).

Tandemově se opakující neboli satelitní DNA

Její přesná funkce dosud není známa, ale jsou to krátké opakující se sekvence, opakující se i po 10 párech bází, u savců tvoří asi 10-15% genomu. Nacházejí se v oblasti centromer a na koncích chromozomů (Snustad a Simmons, 2009).

Tabulka 1: Charakteristika satelitní DNA – upraveno podle (Snustad a Simmons, 2009).

Sekvence	Délka repetic (v párech bází)	Počet repetic
Běžná satelitní DNA	100 000 – 10 milionů	1-10
Minisatelitní DNA	100 – 100 000	10-100
Mikrosatelitní DNA	10 – 100	1-6

Rozptýlená repetitivní DNA

Tyto jednotky nenásledují v genomu přímo za sebou, nýbrž jsou v něm různě rozmístěny. Jeden úsek je dlouhý 100 – 1000 párů bází. Tyto kopie jsou si podobné, ale ne identické. Rozptýlená repetitivní DNA tvoří 25-40% většiny genomu savců. Do této kategorie sekvencí DNA jsou zařazovány LINE a SINE element (Wayne et al. 2009).

LINE elementy

LINE jsou dlouhé roztroušené repetitivní DNA elementy. Ve většině savčích genomů mají asi 104 kopií na haploidním genomu. LINE je dlouhý více než 5 kb a obsahuje dva otevřené čtecí rámce, z nichž jeden ukazuje sekvenční homologii enzymu reverzní transkriptázy retrovirů. LINE chybí dlouhé terminální repetice potřebné pro syntézu virové DNA u retrovirů (Kenis, 2003).

SINE elementy

SINE jsou krátké roztroušené repetitivní DNA elementy, jsou to nejčastěji opakované sekvence pozorované u psů. Často bývají spojeny s mikrosatelitními repeticemi a dosahují délky 130 - 150 bp. Odhaduje se, že v haploidním genomu psa se nachází přibližně 400000 kopií SINE elementů. U různých druhů savců byly pozorovány dvě skupiny SINE, které jsou odvozeny z transkriptů RNA polymerázy III. Jedna skupina SINE se vyvinula z genů tRNA, zatímco druhá se vyvinula z 7SL RNA genu. Ale jen tRNA-SINE byl zjištěn v psím genomu. Jsou podobné 7SL-SINE (Alu sekvencím) u lidí a myší, ale dosud není jisté, ze kterých tRNA genů psa se SINE elementy vyvinuly. Největší podobnost byla prokázána s tRNA^{Gln} (Snustad a Simmons, 2009).

3.3.3. Mitochondriální DNA

Mitochondrie mají minoritní množství DNA v porovnání s jaderným genomem, které se dědí maternálně. Jednoduchý genom kóduje 22 tRNA, 2 rRNA a několik enzymů, které jsou součástí dýchacího řetězce. DNA v každé mitochondrii je z 90% tvořena kódujícími sekvencemi. Sekvence mitochondriální DNA byly použity ke zjištění původu psa domácího, fylogenezi genomu čeledi *Canidae* a pomáhají mj. i při zjištění informací pro zachování ohrožených druhů. Kompletní mitochondriální genom psa byl určen teprve nedávno. Spolu se sekvencí chromozomu Y, mají značný význam při určování původu různých čistokrevných plemen psů a to i v rámci rodokmenů.

Obsahuje-li vzorek velmi málo jaderné DNA nebo je-li DNA silně degradovaná, můžeme využít analýzu mitochondriální DNA. Existuje zde tedy větší šance najít neporušenou kopii mtDNA než kopii jaderné DNA ze vzorku. V jedné buňce je přibližně 100 mitochondrií a v každé mitochondrii je asi 10 kopií mtDNA. Tedy na jednu buňku připadne asi 1000 kopií mtDNA. (Ruvinsky a Sampson, 2001).

Mitochondriální DNA psů obsahuje asi 16 500 bp. Většina molekuly kóduje proteiny nebo RNA, v této oblasti jsou mezi různými jedinci malé rozdíly. Tato část se zapojuje do regulace replikace a transkripce. Analýza se provádí pomocí sekvenování DNA a to buď pomocí Sangerovy sekvenace popř. pomocí mini sekvenace. Nevýhodou je že díky relativně malé velikosti genomu mtDNA a maternální dědičnosti může mít mnoho jedinců stejnou sekvenci mtDNA. Velký počet tandemových opakování u mtDNA má mnoho zvířat ovšem ne člověk (Parra et al. 2009).

3.4. Tandemově se opakující sekvence DNA a jejich využití při studiu psího genomu

V této samostatné kapitole literární rešerše bych se ráda zaměřila zejména na problematiku polymorfismů mikrosatelitních sekvencí, protože experimentální část diplomové práce vychází právě z tohoto typu markerů. Detekce polymorfismů mikrosatelitních lokusů je obvykle založena na principu amplifikace repetitivní sekvence metodou polymerázové řetězové reakce, jejíž obecné principy jsou popsány v následující kapitole.

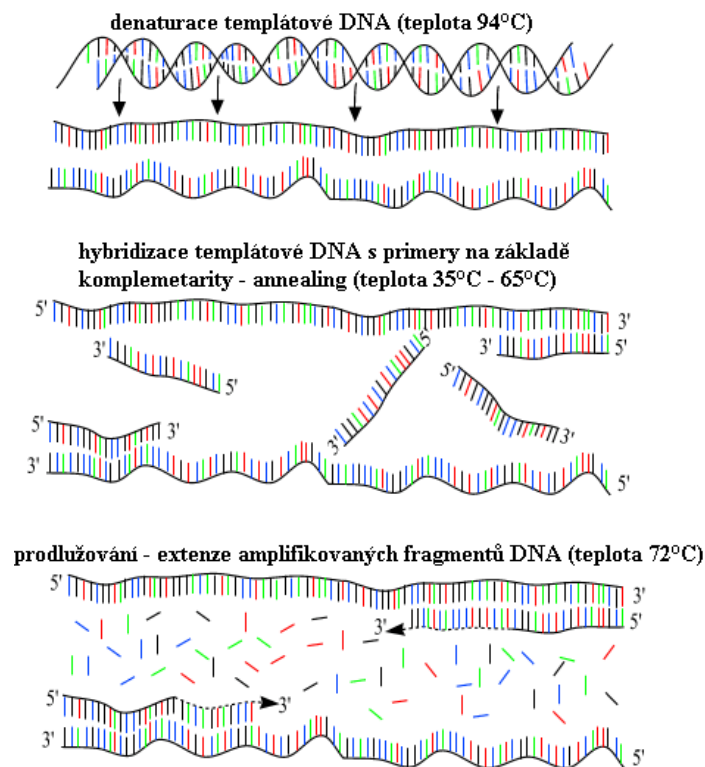
3.4.1. Polymerázová řetězová reakce (Polymerase Chain Reaction) jako nástroj pro detekci polymorfismů mikrosatelitních lokusů

PCR byla objevena v roce 1985 Kary Mullisem. Tato metoda umožňuje rychle a efektivně namnožit konkrétní nukleotidovou sekvenci obsaženou v jakékoliv DNA. PCR probíhá zcela *in vitro*, tedy bez použití buněk. Je mnohem rychlejší než klonování genů za pomoci plazmidového nebo fágového vektoru a je založena na použití DNA polymerázy pro opakované kopírování templátové molekuly DNA. PCR je potřebuje pro amplifikaci oligonukleotidy (primery), které jsou komplementární ke známým sekvencím ohraničujícím oblast zájmu, se kterými se párují na základě komplementarity. Pro použití primerů musí být známá alespoň počáteční a koncová

sekvence amplifikované oblasti, pomocí kterých může DNA polymeráza dosyntetizovat zbytek řetězce (Campbell a Reece, 2006).

Metoda PCR zahrnuje 3 kroky, které se mnohokrát opakují. V prvním kroku je genomická DNA denaturována zahřátím na teplotu 92 – 95°C po dobu přibližně 30 s. Během této fáze dochází k rozvolnění vodíkových můstků a DNA se stává jednořetězcovou. V druhém kroku se denaturovaná DNA hybridizuje nadbytkem syntetických oligonukleotidových primerů tak, že se společně inkubují při teplotě 35 – 65°C po dobu přibližně 30 sekund. Teplota pro připojení primerů závisí na délce a obsahu bází v primerech. Ve třetím kroku je použita termostabilní *Taq*-polymeráza pro replikaci úseku DNA mezi místy komplementárními k oligonukleotidovým primerům. K polymeraci dochází při 70-72°C přibližně po dobu 60 sekund. V dalším cyklu se produkty PCR denaturují a po připojení primerů se replikují termostabilní DNA polymerázou. Tyto kroky se neustále opakují, dokud není dosaženo potřebného množství DNA. Po každém cyklu se počet molekul amplifikovaného fragmentu oproti předcházejícímu cyklu zdvojnásobí. Z jedné molekuly DNA po 30 cyklech vznikne více než miliarda kopií (Snustad a Simmons, 2009).

Obrázek1: Kroky PCR reakce - upraveno podle Vierstraete (2001)



PCR probíhá v termocykleru ve kterém můžeme amplifikovat velké množství vzorků najednou. *Taq* polymeráza je tzv. termostabilní, díky čemuž se nemusí přidávat po každém denaturačním cyklu (jako DNA polymeráza I). Proto se pouze při přípravě směsi dodá nadbytek *Taq* polymerázy a oligonukleotidových primerů a zbylé kroky jsou pouze řízeny postupným střídání teploty během jednotlivých cyklů. Její nevýhodou je, že postrádá 3'→5' korekturní aktivitu a vykazuje tak větší chybovost při replikaci. Je-li požadována vysoká přesnost mohla by být místo ní použita termostabilní polymeráza s 3'→5' korekturní aktivitou (např. *Pfu* nebo *Tli* polymerázu). *Taq* polymeráza rovněž nedokáže účinně amplifikovat úseky delší než několik tisíc nukleotidových párů. V tomto případě můžeme místo ní použít *Tfl* polymerázu, která dokáže amplifikovat fragmenty dlouhé i 35 kb. Ovšem delší úseky již nelze pomocí PCR amplifikovat. (Albetrs et al. 1998).

Po dostatečném namnožení sekvence DNA ji můžeme obarvit a následně detekovat gelovou elektroforézou. PCR se využívá pro klonování úseku DNA (jak DNA, tak RNA), detekci virových infekcí, diagnózu dědičných onemocnění, v soudním lékařství při řešení forenzních případů zaměřených na identifikaci jedince z velmi malého množství izolované DNA apod. (Kubišta et al. 2006).

3.4.2. Mikrosatelitní lokusy

Mikrosatelity se často označují také jako SSR markery (Simple Sequence Repeat), STR (Short Tandem Repeat) nebo také SSLP (Simple Sequence Length Polymorphism) (Vivodík et al. 2010). Jsou to krátké tandemově se opakující úseky, dlouhé 2-6 bp. Mohou tvořit jedno-, di-, tri-nebo tetranukleotidové repetice. Nejčastější jsou dinukleotidové repetice. Často se u nich vyskytují motivy typu $(CA)_n$, $(GAAA)_n$ nebo $(CAG)_n$ (Kenis, 2003). U psů byly první mikrosatelitní markery objeveny v roce 1992 a byly složeny výhradně z $(CA)_n$ opakování (Ichikawa, et al. 2001). Mimo jiné se zjistilo, že po celém genomu savců je náhodně roztroušeno nejméně 50000 mikrosatelitních repetit (Ruvinsky a Sampson, 2001).

Mikrosatelity jsou vysoce polymorfní a jsou často používány jako genetické markery (Gagliardi et al. 2010), zachovávají mendelistickou dědičnost (van Asch et al. 2010; Korzun, 2002) a patří mezi kodominantní markery (Zajc et al. 1997; Chistiakov 2006).

Analyzovat můžeme jak rostlinný materiál, tak i vzorky zvířat bez ohledu na pohlaví (Ichikawa, et al. 2001). Mikrosatelitní markery je možné získat z genomických knihoven za použití hybridizace s oligonukleotidovými sondami, nebo pomocí metody tzv. cross-amplifikace, která spočívá v použití primerů u druhů, které již byly popsány a které jsou druhu námi hledanému blízce příbuzné (Kim et al. 2001). Do analýzy je zapotřebí pouze malé množství DNA potřebné k provedení SSR analýzy (10-50 ng).

SSR markery se vyznačují vysokým stupněm polymorfismu, což je dáno poměrně vysokou frekvencí mutací mikrosatelitních lokusů.

3.4.3. Využití mikrosatelitních markerů pro genetické analýzy

Studiem SSR markerů můžeme sledovat např. variabilitu lokusů v rámci rodin, plemen, druhů (Irion et al. 2003), ale i mezi druhy (Rogalska et al. 2002). Tyto markery lze použít nejen pro identifikaci jedinců, forenzní analýzy, testování paternity a maternity, ale i ke studiu populačně populačně-genetických parametrů, jako je tok genů, efektivní velikost populace, odchylky od Hardy-Weinbergovy rovnováhy, stupeň inbreedingu.(van Asch et al. 2010; Šeda et al. 2010). K detekci případů porušení genetické rovnováhy v důsledku selekce, migrace, náhodného genetického driftu (Bryja a Hájková, 2005; Kraic, 2005). SSR markery nacházejí své využití i při odhalení některých genetických chorob např. atrofie sítnice, rakoviny ledvin, narkolepsie a další (Sargan et al. 2007).

Podle Vivodík et al. (2010) můžeme mikrosatelitní sekvence můžeme rozdělit na dokonalé, nedokonalé a složené. Dokonalé jsou tvořeny jednou nepřerušenou repetitivní sekvencí např. (AT)₈. V nedokonalých mikrosatelitních sekvencích je motiv přerušen několika nukleotidy např. (AT)₆CG(TC)₁₂ a složené mikrosatelitní sekvence jsou tvořeny několika nukleotidovými motivy jako např. (AT)₁₅(AC)₂₀.

3.4.4. Minisatelity

Minisatelity nebo také VNTR (variable number of tandem repeats) jsou ohraničené oblasti DNA s vysokou variabilitou počtu opakování nukleotidových sekvencí. V současné době bylo popsáno přes 2000 minisatelitů (Cho, 2005). Poprvé byly identifikovány v intronech lidského myoglobinu a bylo prokázáno, že jsou složeny z „bloků“ o velikosti od 2 do 250 bp. Minisatelity se vyskytují se v subtelomerických

oblastech chromozomů (Campbel a Reece, 2009) a podle Šedy et al. (2012) by některé minisatelity mohly mít regulační funkci. Obvykle jsou vysoce polymorfní a liší se v sekvenci nukleotidů, délce a počtu opakování. Mohou být rovněž použity jako genetické markery asociované s fenotypovými vlastnostmi a také při testování otcovství (Bobrová, 2003).

Kvůli délce se analýza minisatelitů nemůže provádět pomocí PCR reakce, ale musí být použit Southern blotting, čímž se značně omezuje jejich použití (Schlötterer, 2004).

3.5. Aplikace genetických markerů při určování paternity, maternity a při studiu variability psích plemen

3.5.1. Testy paternity a maternity

Tyto testy se provádějí především v případech sporného rodičovství. Nejčastějším scénářem bývá určení biologického otce z několika možných kandidátů, méně častěji pak určení skutečné matky. U některých plemen začíná být standardem tvorba tzv. DNA profilu u všech zvířat s průkazem původu. Daný DNA profil pak může být, v případě nesrovnalostí, využit i jako test paternity či maternity, jelikož DNA profilování je založeno na stejném genetickém principu (van Asch et al., 2009). Pokud se například neprokáže deklarovaný původ u daného vrhu nedostanou štěňata průkaz původu a chovateli hrozí sankce ze strany příslušné kynologické organizace nehledě na pošramocenou pověst (Ruvinsky a Sampson, 2001).

V současné době se pro určení rodičovství stejně jako pro DNA profilování využívají mikrosatelitní markery. Klasický markerovací systém umožňuje analýzu 8 až 27 (Butler, 2005) mikrosatelitních lokusů najednou. Použité mikrosatelitní lokusy bývají podrobně charakterizovány z hlediska pozice na chromozomu a určení jednotlivých alel. Nejčastěji se využívají jaderné autozomální mikrosatelity, které jsou vzájemně volně kombinovatelné.

3.5.2. Testy paternity a maternity založené na polymorfismu mikrosatelitů

Díky vysokému polymorfismu, nezávislosti na pohlaví a mendelistické dědičnosti se mikrosatelity ukázaly být vhodné pro testování paternity a maternity (van Asch et al., 2009; Cho, 2005).

Vzorky DNA žen, štěňat a potenciálních otců slouží jako templáty v reakcích PCR s oligonukleotidovými primery, které jsou specifické pro daný mikrosatelitní lokus. Objevením techniky multiplex PCR se snížil počet PCR reakcí potřebných pro analýzu (van Asch et al. 2009; Eggleston et al. 2002). V současné době jsou k dispozici i komerční kity, které rovněž usnadní analýzu. Produkty PCR je možné analyzovat buď pomocí gelové elektroforézy, nebo pomocí automatických sekvenátorů (Sun et al. 2003).

K potvrzení rodičovství je podle Sun et al. (2003) nutné, aby se potomek shodoval s rodiči alespoň v 80% všech alel, Irion et al. (2003) toleruje neshodu ve dvou lokusech z 26, kdežto Bowling et al. (1997) a Zajc (1999) tolerují pouze 1 lokus z 11. Pro velmi dobrou vypovídající schopnost je nutné si zvolit dostatečný počet mikrosatelitů (Vilá et al. 2003). Podle Kreutzer et al. (2008) je zapotřebí si zvolit alespoň 10-15 mikrosatelitů.

Mohou nastat situace, kdy obvykle v ojedinělém lokusu neodpovídá alelická kombinace mikrosatelitního lokusu potomka jeho rodičům. Výskyt této abnormality bývá způsoben nejčastěji *de-novo* vzniklou mutací, která se projeví změnou opakování mikrosatelitního motivu. Další možnou příčinou může být výskyt tzv. nulových alel. Principem vzniku nulové alely je mutace v místě, jež je homologní k sekvenci primeru (většinou na 3'konci), který tedy nemůže nasednout na jednovláknovou DNA a tedy neproběhne ani amplifikace daného úseku DNA při reakci PCR. Nulové alely jsou alely, jež se během PCR reakce neamplifikují a heterozygotní jedinec se pak může jevit jako homozygotní. Tuto alelu ovšem dál předává na své potomky, u kterých se již může fenotypově projevit. Proto pak může dojít k chybnému zamítnutí testování paternity a maternity. Potvrzení výskytu nulové alely je možné, ale je zapotřebí navrhnout nové primery a v případě úspěšné amplifikace osekvenovat PCR produkt vyšetřovaného výskytu lokusu (van Asch et al. 2010; Dakin a Avise, 2004).

3.5.3. Testy založené na polymorfismu minisatelitů

První testování paternity a maternity založené na polymorfismu minisatelitů zahrnovalo použití tzv. „DNA otisku prstů“ (Fingerprinting) (Ruvinsky a Sampson, 2001).

DNA matek, potenciálních otců a jejich potomků je možné izolovat z krve, nebo z tkání a dále štěpit vhodnými restrikčními enzymy na různě dlouhé fragmenty. Ty jsou separovány gelovou elektroforézou a poté při Southern Blottingu přeneseny na nylonovou membránu, která je následně hybridizována radioaktivně značenou sondou. Po odmytí nenavázaných sond se při autoradiografii zobrazí „žebřík“ fragmentů, který představuje „DNA otisk prstů“. Porovnáním otisků otců, matek a potomků je pak možné vizuálně určit biologické otce a matky (Wayne et al. 1999).

Podobně jako v případech testování mikrosatelitních lokusů se zde mohou vyskytovat tzv. nulové alely s četností 1-2%. (Podle Huang et al. 1999; Tamaki et al. 1992, Yamamoto et al. 2000), ačkoliv Henke et al. (1999) tolerují i 3-4%.

Ačkoliv metoda DNA otisku prstů je relativně rychlá a jednoduchá, analýza potomků a rodičů musí probíhat na stejném gelu a tato metoda vyžaduje poměrně velké množství kvalitní DNA. V současné době se místo této metody častěji využívá metod založených na polymorfismu mikrosatelitů (Ruvinsky a Sampson, 2001).

4. Materiál a metody

4.1. Volba modelového psího plemene a počty hodnocených jedinců

Pro analýzy bylo zvoleno plemeno československý vlčák. Toto plemeno je na pracovišti Katedry genetiky a šlechtění FAPPZ ČZU v Praze používáno jako model pro studium molekulárních markerů kauzálních mutací vedoucí k některým dědičným onemocněním. Toto plemeno, respektive vzorky extrahované DNA představovaly dostatečně široký soubor jedinců pro studium paternity. Námi zvolená výchozí populace obsahovala 364 psů (188 fen a 176 psů). Všichni tito jedinci byli podrobeni testům paternity. Metodický postup tohoto molekulárního testu a jeho výsledky jsou součástí samostatných kapitol diplomové práce. Vzhledem k tomu, že u 5 jedinců (2 feny a 3 psi) nebyla potvrzena paternita odpovídající jejich rodokmenům, byli tito jedinci z následných populačně genetických studií vyloučeni. Vyloučení jedinci jsou v tabulce 10 vyznačeni červenou barvou. Ve výchozí populaci plemene československý vlčák byla zařazena ještě jedna fena, jejíž původ je odvozen od psa s neodpovídající paternitou. Tato fena, která je v tabulce 10 vyznačena modrou barvou, byla rovněž z dalšího statistického hodnocení vyloučena. Výchozí populace byla tak na základě mikrosatelitního testu paternity zredukována na 358 jedinců (185 fen a 173 psů), kteří byli následně použiti pro statistické a populačně genetické hodnocení.

4.2. Izolace DNA a metody hodnocení její kvality a kvantity

4.2.1. Izolace DNA z buněk bukálních sliznic

DNA byla izolována metodou, která je založena na extrakci DNA z bukálních sliznic. Odběr byl proveden sterilními cytologickými kartáčky (Lotus Global Co., Ltd.), které byly zasunuty mezi tvář a dásně a krouživými pohyby byla odebrána epiteliální vrstva buněk. Psi před odběrem vzorků psi nesměli minimálně dvě hodiny jíst ani pít.

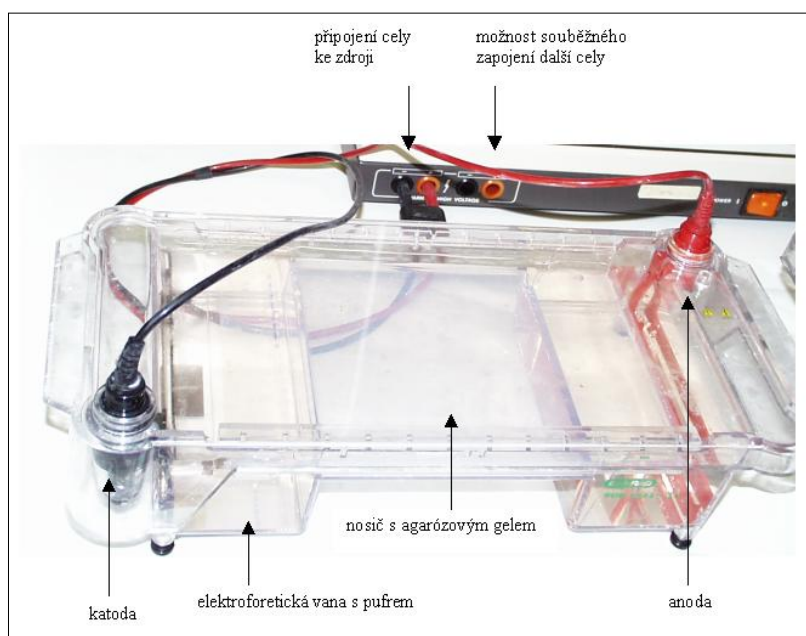
Po odběru buněk byly kartáčky umístěny do aseptických podmínek, aby mohly důkladně vyschnout. Následně byly krátkodobě skladovány v papírových obálkách v mrazicím boxu při teplotě -20°C .

Vlastní izolace genomické DNA byla provedena pomocí kitu NucleoSpin® Tissue XS (Machery-Nagel). Při izolaci DNA byl dodržen přesný postup určený pro izolaci DNA z bukálních stěrů podle návodu dodaného výrobcem.

4.2.2. Hodnocení vysokomolekularity izolované DNA

Izolované vzorky DNA byly po extrakci hodnoceny z hlediska vysokomolekularity DNA pomocí elektroforézy. Elektroforéza byla provedena v elektroforetické cele SubCell (BioRad) znázorněná na obrázku 2. Vzorky byly separovány v 1% agarózovém gelu v prostředí 1x TBE pufru, jehož složení je uvedeno v příloze 6.

Obrázek 2: Elektroforetická cela SubCell (BioRad)



Elektroforéza probíhala při laboratorní teplotě při konstantním napětí 120 V po dobu 60 minut. Získané elektroforeogramy byly digitalizovány systémem GelDoc (BioRad) s pomocí programu QuantityOne (BioRad).

4.2.3. UV spektrofotometrické hodnocení kvantity a kvality izolované DNA

Kvantita izolované DNA byla změřena UV-spektrofotometricky pomocí přístroje NanoPhotometer (Implen). Tento přístroj současně vyhodnotil i poměry absorbancí A260/A280 a A260/A230, které je možné využít pro detekci případných kontaminací organickými sloučeninami.

Extrahovaná genomická DNA byla u všech vzorků naředěna na konstantní koncentraci $10 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ 1x TE pufrem, jehož složení je uvedeno v příloze 6.

4.3. Mikrosatelitní markery použité pro hodnocení paternity a pro populační studii

4.3.1. Volba mikrosatelitních markerů a jejich lokalizace v psím genomu

V této diplomové práci byly použity markery: FH3210, FH3241, FH2658, FH4012 (Guyon et al. 2003), FH2004, FH2010 (Francisco et al. 1996), REN214L11 (Breen, 2001), FH2361 (Mellersh, 1998) a C38 (Asch et al. 2009). V tabulce 2 je uvedeno, na kterém chromosomu se vyskytují použité mikrosatelitní lokusy. Sekvence použitých primerů párů a jejich fluorescenční značení je uvedeno v tabulkách 3 a 4.

Tabulka 2: Lokalizace hodnocených mikrosatelitních lokusů

Lokus	Umístění na autosomu
FH3210	CFA2
FH3241	CFA8
FH2004	CFA11
FH4012	CFA15
REN214L11	CFA16
FH2010	CFA24
F2361	CFA33
C38	CFA38
FH2658	CFA14

Tabulka 3: Charakteristika multiplexu I

Multiplex	Primery		Barva	Sekvence
I	FH 3210	F	VIC	CAAGGACCACGATGAAATGACT
		R		GCTGGATTCAGGAGCTGTTCA
	FH 3241	F	PET	TCCTTGTTTCCTTCCTCTGG
		R		TTGGGCAAATCAAACCTCC
	FH 2004	F	6-FAM	GGGGCTTTGTACTGTGACCTAC
		R		ACAGACTGAGAATGCTGGGTT
	FH 2010	F	NED	CTATTAACAATGTCAGACTCTCAG
		R		GAGCATGCATGTACACCAGAA

Tabulka 4: Charakteristika multiplexu II

Multiplex	Primery		Barva	Sekvence
II	FH 4012	F	6-FAM	GGGAGGGAAGCGATCTTCT
		R		CGGTTAGCCATTCCCTGAG
	REN214L11	F	VIC	GGCTCTCCATGCTAAGACC
		R		TGGGTCTAATGGTTTGGGATAG
	FH2361	F	NED	GCAGGTCAGAGCAGTCAGAA
		R		GAATGTACCAGGCACTATGCA
	C38	F	PET	ACAAGAGGGGATGCTGAA
		R		TCATGTGTCTGTTGGGCATT

4.3.2. Optimalizace postupu multiplex-SSR

Z předchozí kapitoly vyplývá, že pro řešení diplomové práce byl použit systém SSR markerů, podle van Asch et al. (2009). Tito autoři u modelového plemene Cão de Gado Transmontano sestavili multiplex PCR, ve kterém bylo zahrnuto celkem 9 primerových párů pro amplifikaci 9 SSR lokusů. Vzhledem k tomu, že plemeno československý vlčák použité při řešení diplomové práce je z hlediska mikrosatelitních markerů zcela neprozkoumané, byly primerové páry navržené van Asch et al. (2009) rozděleny do dvou multiplex systémů vždy po čtyřech lokusech - tabulka 3 a 4.

Pro reprodukovatelnost multiplex-SSR markerů bylo nezbytné zajistit specifickou amplifikaci. To znamená, že primery multiplex-PCR musely nasedat vždy specificky na sekvence lemující mikrosatelitní lokusy. Pro zajištění specifické amplifikace byly prováděny experimenty zacílené na optimalizaci:

- kombinací mikrosatelitních lokusů, množství templátové DNA v reakční směsi
- koncentrace primerů v reakční směsi
- použitého typu termostabilní polymerázy
- koncentrace reakčních aditiv – Enhancer (Top Bio) a BSA.

4.3.3. Optimalizovaný metodický postup při aplikaci multiplex-SSR při určování paternity

Optimalizovaný metodický postup multiplex-SSR markerů představoval navržené složení amplifikačních reakcí a teplotní a časové podmínky během PCR. Tyto parametry, které byly použity pro hodnocení všech jedinců vybrané populace československého vlčáka, jsou uvedeny v následujících tabulkách.

Tabulka 5: Složení PCR pro amplifikaci multiplex-SSR I

Složka	Koncentrace
DNA	20 ng. 12,5 μl^{-1}
Tris-HCl	10 mM
MgCl ₂	1,5 mM
KCl	50 mM
FH3210-F	0,12 μM
FH3210-R	0,12 μM
FH3241-F	0,24 μM
FH3241-R	0,24 μM
FH2004-F	0,12 μM
FH2004-R	0,12 μM
FH2010-F	0,24 μM
FH2010-R	0,24 μM
dNTP	200 μM
BSA	5 ng. 12,5 μl^{-1}
Enhancer - TMA oxalát (Top Bio)	2 mM
Taq polymeráza (Roche)	0,5 U . 12,5 μl^{-1}
Objem	12,5 μl
pH	8,3

Tabulka 6: Složení PCR pro amplifikaci multiplex-SSR II

Složka	Koncentrace
DNA	20 ng. 12,5 μl^{-1}
Tris-HCl	10 mM
MgCl ₂	1,5 mM
KCl	50 mM
FH4012-F	0,2 μM
FH4012-R	0,2 μM
REN214L11-F	0,66 μM
REN214L11-R	0,66 μM
FH2361-F	0,12 μM
FH2361-R	0,12 μM
C38-F	0,32 μM
C38-R	0,32 μM
dNTP	200 μM
BSA	5 ng. 12,5 μl^{-1}
Enhancer - TMA oxalát (Top Bio)	2 mM
Taq polymeráza (Roche)	0,5 U . 12,5 μl^{-1}
Objem	12,5 μl
pH	8,3

Amplifikace obou multiplex systémů probíhala v Termocykleru C1000™ Thermal Cycler (BioRad). Tento typ termocykleru umí pracovat s teplotním gradientem. Při optimalizaci multiplex-SSR marker byla s využitím tohoto gradient optimalizována rovněž anelační teplota. Výsledkem optimalizačních experimentů bylo navržení jednotného teplotního a časového profilu amplifikace, který byl aplikován na oba dva multiplex-SSR systémy. Na obrázku 3 je znázorněn použitý typ termocykleru. V tabulce 7 je uveden profil amplifikace.

Obrázek 3: Termocykler C1000™ Thermal Cycler (BioRad)



Tabulka 7: Teplotní a časový profil amplifikace multiplex-SSR systému I a II

Počáteční denaturace	95°C	900 sekund	1 cyklus
Denaturace	94°C	30 sekund	30 cyklů
Annealing	60°C	60 sekund	
Prodlužování	72°C	30 sekund	
Závěrečné prodlužování	72°C	3600 sekund	1 cyklus

4.3.4. Podmínky fragmentační analýzy

Kapilární elektroforéza použitá pro fragmentační analýzu separuje jednovláknové fragmenty. Separace jednovláknových je fragmentů je nezbytná pro odhalení délkových polymorfismů, které vyplývají z variability opakování mikrosatelitních motivů. Proto bylo nutné provést denaturaci amplifikovaných produktů multiplex-SSR I a II. Před jejich denaturací bylo provedeno naředění produktů amplifikace pomocí ddH₂O. U obou dvou multiplexů bylo provedeno ředění následujícím způsobem. K 1 μ l PCR produktu bylo přidáno 9 μ l ddH₂O. Pro navození denaturace byl použit vysoce čistý Hi-Di formamid (Applied Biosystems). K určení velikosti amplifikovaných SSR alel bylo nutné přidat do každého vzorku hmotnostní standard GeneScanTM-600 LIZ[®] Size Standard (Applied Biosystems). Podmínky ředění vzorku a složení denaturační směsi jsou uvedeny v následující tabulce.

Tabulka 8: Složení denaturační směsi multiplex-SSR I a II

Ředěný PCR produkt multiplex-SSR I (μ l)	Ředěný PCR produkt multiplex-SSR II (μ l)	LIZ 600 (μ l)	Hi-DI formamid (μ l)
1	1	0,2	12

Vzorky určené k denaturaci byly umístěny v polypropylenových stripech a během denaturace zakryty speciální PCR folií. Denaturace probíhala v termocykleru C1000TM Thermal Cycler (BioRad) při teplotě 95°C po dobu 5 minut. Denaturované fragmenty DNA byly následně v termocykleru ochlazeny na teplotu 4°C.

Vlastní fragmentační analýza byl provedena s využitím přístroje ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems), který je znázorněný na obrázku 4. Podmínky kapilární elektroforézy, které byly aplikovány na všechny vzorky a oba dva multiplex-SSR systémy jsou uvedeny v následující tabulce.

Tabulka 9: Charakteristika podmínek kapilární elektroforézy

Parametry separace	Nastavené hodnoty
Délka kapiláry (cm)	36
Modul	GS STR POP4 (1ml) G5
Polymer	POP4
Virtuální filtr	G5
Doba nástřiku (s)	5
napětí při nástřiku (kV)	10
teplota při separaci (°C)	60
Napětí při separaci (kV)	15
Doba separace (minuty)	24

Obrázek 4: Pohled do laboratoře



4.3.5. Identifikace alel mikrosatelitních lokusů

Získaná data z fragmentační analýzy byla zpracována v programu GeneMapper verze 4.1. (Applied Biosystems). V daném programu byla vyhodnocena kvalita dat a velikost jednotlivých fragmentů. Pro standardizaci analýzy bylo zapotřebí převést údaje o velikostech fragmentů na alely pomocí tzv. „binů“.

K vytvoření sady „binů“ byly vybrány referenční vzorky genotypů. Každý „bin“ pak definoval oblast, ve které program očekává výskyt příslušné alely. Na základě těchto oblastí byly definovány alely, podle kterých byli vyhodnoceni ostatní jedinci.

4.3.6. Bioinformatické a populačně genetické zpracování informací o polymorfismu mikrosatelitních lokusů

Hodnocení základních populačních parametrů – heterozygotnosti očekávané (H_E) a pozorované (H_O), polymorfního informačního indexu (PIC), počtu a frekvencí jednotlivých alel bylo provedeno pomocí programu CERVUS 3.0.3 (Kalinowski et al. 2007). V tomto programu byly rovněž zjišťovány odchylky od Hardy-Weinbergova zákona pro frekvenci alel jednotlivých lokusů.

4.4. Porovnání alelických kombinací mikrosatelitních lokusů s cílem ověřit paternitu

4.4.1. Ověření paternity v úplných rodinách

Z tabulky 10 vyplývá, že v hodnocené databázi plemene československý vlčák bylo identifikováno celkem 36 úplných rodin. Původ hodnocených zvířat tj. určení jejich matek a otců bylo provedeno s využitím mezinárodní databáze tohoto plemene, která je volně přístupná na internetové adrese <http://www.wolfdog.org/>. Termín úplná rodina představuje takovou situaci, kdy u hodnoceného jedince byly k dispozici vzorky DNA od obou rodičů. Jedinci s těmito parametry jsou v tabulce 10 označeny písmenem „R“ a pořadovým číslem rodiny. Vlastní ověření paternity bylo provedeno na základě porovnání alelických kombinací SSR lokusů rodičů a potomků.

4.4.2. Ověření paternity v neúplných rodinách

Z tabulky 10 rovněž vyplývá, že u některých jedinců modelové populace byly k dispozici pouze vzorky DNA jednoho z jejich rodičů. Z pohledu genetiky se jednalo o skupiny sourozenců a polosourozenců u kterých bylo provedeno molekulární hodnocení rovněž jejich matky nebo otce. V databázi bylo identifikováno celkem 35 matek, u kterých byli hodnoceni rovněž jejich potomci. Tito potomci jsou v tabulce 10 označeni písmenem „M“ (matka) a číslem jejich matky. Pro analýzy byli použiti rovněž potomci

18 otců. Tito potomci jsou v tabulce 10 označeni písmenem „O“ (otec) a číslem jejich otce.

4.5. Charakteristika populace československého vlčáka z hlediska vybraných šlechtitelských parametrů

4.5.1. Podíl krve vlka v genomu československého vlčáka

Podíl krve vlka u hodnocených jedinců byl převzat z mezinárodní databáze Statistics on the Czechoslovakian Wolfdogs breed, která je volně přístupná na internetové adrese <http://www.amicale-chien-loup-tchecoslovaque.com/cgi-bin/form.py>. Tato databáze je vytvářena a aktualizována ve Francii a zahrnuje v sobě kompletní údaje z plemenné knihy plemene československý vlčák. Podíl krve vlka je stanovován u všech jedinců na základě prostého výpočtu zastoupení vlčího genomu v křížencích různých filiálních generací i u současných představitelů plemene. Například kříženec první filiální generace vlka a psa vykazuje 50% (0,5) podíl krve vlka ve svém genomu. Pokud je tento F1 hybrid křížen s čistokrevným psem je podíl vlčí krve u potomků vzniklých z tohoto křížení 25% (0,25).

4.5.2. Koeficient inbreedingu hodnocených zvířat

Koeficient inbreedingu hodnocených jedinců byl rovněž převzat z mezinárodní databáze Statistics on the Czechoslovakian Wolfdogs breed, která je volně přístupná na internetové adrese <http://www.amicale-chien-loup-tchecoslovaque.com/cgi-bin/form.py>. Tato databáze je vytvářena a aktualizována ve Francii a zahrnuje v sobě kompletní údaje z plemenné knihy plemene československý vlčák.

Koeficient inbreedingu vyjadřuje procentuální zastoupení autozygotnosti jedince vzhledem k určité původní populaci, která by měla být od námi hledaného jedince dostatečně vzdálená. Je stanovován podle vzorce:

$$F_x = \sum \frac{1 + F_a}{2^{n_1 + n_2 + 1}}$$

kde:

Σ – počet úseků ke všem společným předkům

n_1 – počet úseků (generací) ke společnému předku ze strany otce

n_2 – počet úseků (generací) ke společnému předku ze strany matky

F_a – koeficient inbreedingu společného předka

(Wright, 1922; Jakubec et al. 2010)

4.5.3. Koeficient ztráty předků

Koeficient ztráty předků (AVK, Ancestor-Loss Coefficient) hodnocených jedinců byl převzat z mezinárodní databáze Statistics on the Czechoslovakian Wolfdogs breed, která je volně přístupná na internetové adrese <http://www.amicale-chien-loup-tchecoslovaque.com/cgi-bin/form.py>. Tato databáze je vytvářena a aktualizována ve Francii a zahrnuje v sobě kompletní údaje z plemenné knihy plemene československý vlčák.

Koeficient ztráty předků je opět stanovován u všech jedinců. Stanovuje procentuální podíl jedinečně se vyskytujících předků v rodokmenu ke všem předkům v rodokmenu hodnoceného zvířete

4.5.4. Testování normality rozdělení vybraných šlechtitelských parametrů u plemene československý vlčák a transformace dat

Před samotným statistickým testováním byla provedena tzv. exploratorní analýza dat (EDA) zaměřená na ověření normálního rozdělení dat pro parametry: F_{x5} , F_{x8} , AVK5, AVK8 a krev vlka. Normalita rozdělení byla ověřována na základě grafické analýzy – pomocí histogramů a Q-Q grafu a pomocí hodnot šikmosti (g_1) a špičatosti (g_2).

Jelikož většina hodnocených parametrů nesplnila předpoklad normálního rozdělení dat, bylo zapotřebí data transformovat. K transformaci byla použita tzv. Box-Coxova transformace dat zlepšující parametry šikmosti i špičatosti vzhledem k normálnímu rozdělení.

4.5.5. Rozdělení modelové populace československého vlčáka do kategorií podle úrovně vybraných šlechtitelských parametrů

Jedinci byli rozděleni do tří skupin (A, B, C) podle hodnot transformovaných parametrů (Zastoupení krve vlka, F_{x5} , F_{x8} , AVK5, AVK8) uvedených v tabulce 16. Skupina A představovala jedince, kteří měli hodnotu transformovaného parametru

menší než hodnotu aritmetického průměru $-s$. Skupina B byla vymezena intervalem transformovaných hodnot aritmetického průměru $\pm s$. Skupina C obsahovala jedince, kteří měli hodnotu transformovaného parametru větší než je hodnota aritmetického průměru $+s$.

Cílem tohoto postupu bylo vytvořit skupiny A a C, které by měly teoreticky představovat jedince s extrémními hodnotami v zastoupení krve vlka, F_x5 , F_x8 , AVK5, AVK8.

4.6. Statistické hodnocení vztahu mezi polymorfismem mikrosatelitních lokusů a zařazením jedinců do skupin vybraných šlechtitelsky významných parametrů

4.6.1. Testování významnosti rozdílů mezi vytvořenými skupinami šlechtitelsky významných parametrů

U významných šlechtitelských parametrů (zastoupení krve vlka, F_x5 , F_x8 , AVK5, AVK8) bylo provedeno statistické porovnání významnosti rozdílů mezi průměry jednotlivých skupin vytvořených na základě hodnoty aritmetického průměru a směrodatné odchylky viz kapitola 4.5.5. Porovnány byly rovněž průměry psů a fen vzájemně a průměry psů a fen vůči celkové populaci. Pro analýzu byl použit dvouvýběrový t-test v programu STATISTICA 9.1. (StatSoft).

4.6.2. Testování významnosti vlivu počtu heterozygotních SSR lokusů jedinců na zařazení do jednotlivých skupin šlechtitelsky významných parametrů

Rozdíl mezi průměrnými počty heterozygotních lokusů jedinců zařazených do skupin A, B a C podle úrovní transformovaných hodnot výše jmenovaných znaků byly hodnoceny pomocí dvouvýběrových t-testů. Současně bylo testováno, zda existují statisticky významné rozdíly mezi průměry skupin A, B, C a průměrem celkové populace. Pro statistickou analýzu byl použit program STATISTICA 9.1. (StatSoft).

4.6.3. Testování významnosti vlivu průměrné heterozygotnosti jednoho SSR lokusu na zařazení jedince do jednotlivých skupin šlechtitelsky významných parametrů

Rozdíly mezi průměrnou hodnotou heterozygotnosti SSR lokusů u jedinců zařazených do skupin A, B a C podle úrovní transformovaných hodnot výše jmenovaných znaků byly hodnoceny pomocí dvouvýběrových t-testů. Současně bylo testováno, zda existují statisticky významné rozdíly mezi průměry skupin A, B, C a průměrem celkové populace. Pro statistickou analýzu byl použit program STATISTICA 9.1. (StatSoft).

4.6.4. Testování významnosti vlivu průměrného počtu alel jednoho SSR lokusu na zařazení jedinců do jednotlivých skupin šlechtitelsky významných parametrů

Rozdíly mezi průměrnými počty alel SSR lokusů u jedinců zařazených do skupin A, B a C podle úrovní transformovaných hodnot výše jmenovaných znaků byly hodnoceny pomocí dvouvýběrových t-testů. Současně bylo testováno, zda existují statisticky významné rozdíly mezi průměry skupin A, B, C a průměrem celkové populace. Pro statistickou analýzu byl použit program STATISTICA 9.1. (StatSoft).

5. Výsledky

5.1. Markery mikrosatelitních lokusů

5.1.1. Kvantita a kvalita izolované genomické DNA

Cílem diplomové práce byla aplikace markerů založených na principu PCR v populační analýze československého vlčáka. Cílem práce nebylo hodnotit kvalitu izolované DNA ani její výtěžnost. Přesto tyto parametry jsou důležité pro následnou aplikaci mikrosatelitních markerů. Extrahovaná DNA měla z hlediska výtěžnosti následující parametry:

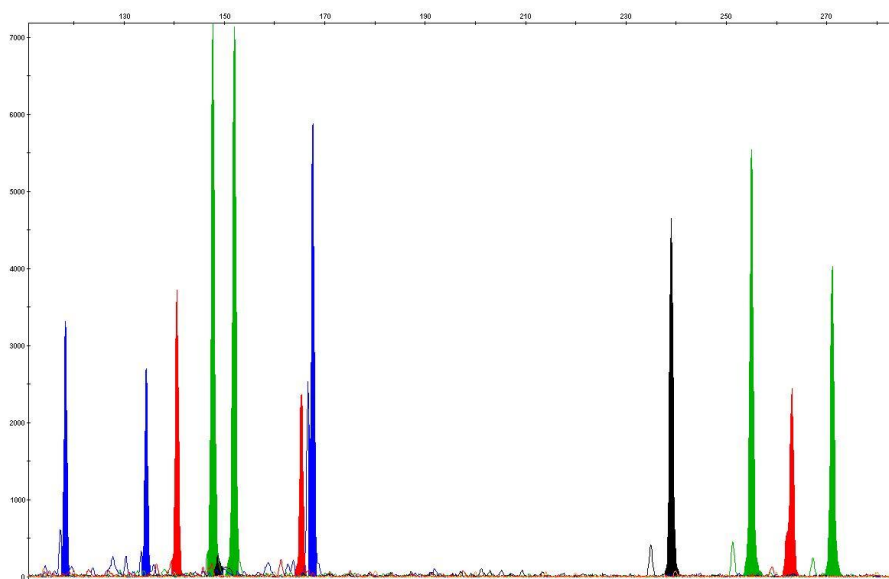
- průměrné množství DNA získané z jednoho kartáčku: 18300 ng, $V_k = 4,2 \%$
- poměr absorbancí A260/A280: 1,91, $V_k = 3,6 \%$
- poměr absorbancí A260/A230: 2,13, $V_k = 5,1 \%$

Výše uvedené parametry vždy odpovídaly vysoce čisté DNA. Množství extrahované DNA by bylo možné použít bez problému k velkému počtu molekulárních analýz jednoho jedince, protože do jedné standardní PCR reakce je obvykle přidáváno pouze 20 ng DNA. Rovněž testovací elektroforézou bylo zjištěno, že DNA izolovaná DNA kitem má vždy vysokomolekulární charakter.

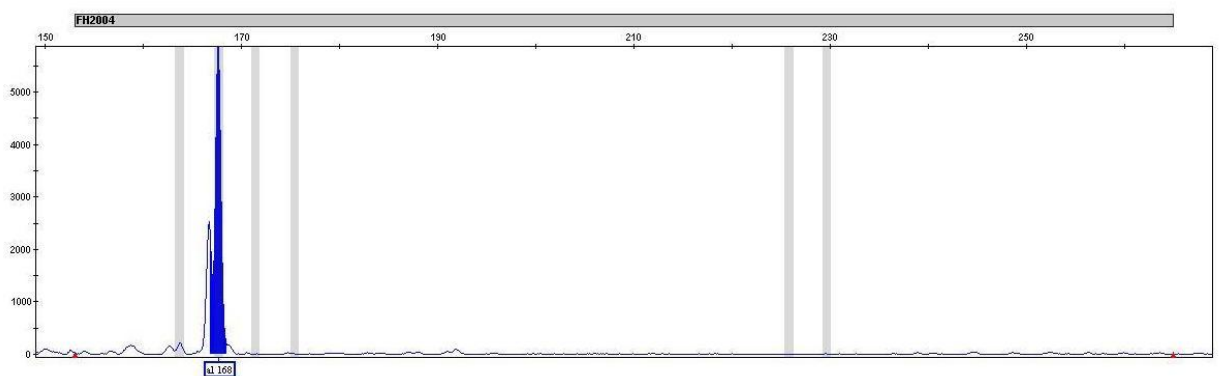
5.1.2. Specifičnost použitých markerů

Všechny markery, které byly zařazeny do multiplexu I a II spolehlivě amplifikovaly alely, jejichž velikosti se plně shodovaly s intervalem velikostí, které popsali van Asch et al. (2009). Z metodického postupu vyplývá, že oba multiplexy byly smíchány a tudíž při jedné separaci bylo analyzováno všech 8 mikrosatelitních lokusů. Na obrázku 5 je uveden chromatogram s vyznačenými píky jednotlivých alel před vyhodnocením pomocí programu GeneMapper verze 4.1. (Applied Biosystems). Na následujících obrázcích je znázorněn postup identifikace alel mikrosatelitních lokusů pomocí tzv. „binů“. Pro všechny lokusy byla charakteristická vysoká specifičnost. Optimalizovaný metodický postup amplifikace, ředění a denaturace vzorků zajistil, že výšky píků alel jednotlivých mikrosatelitních lokusů byly vyváženě vysoké a rovněž automatické odečítání velikostí jednotlivých alel proběhlo bez komplikací.

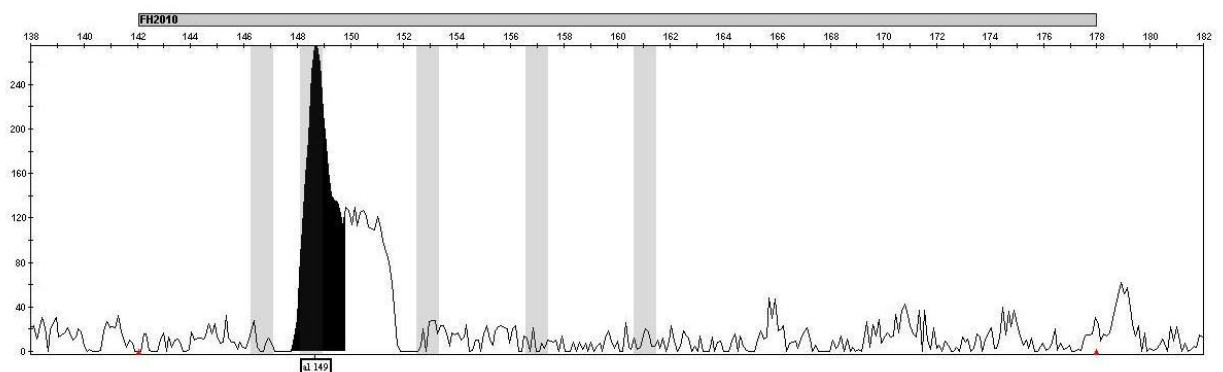
Obrázek 5 Chromatogram detekovanými alelami SSR-multiplexů I a II



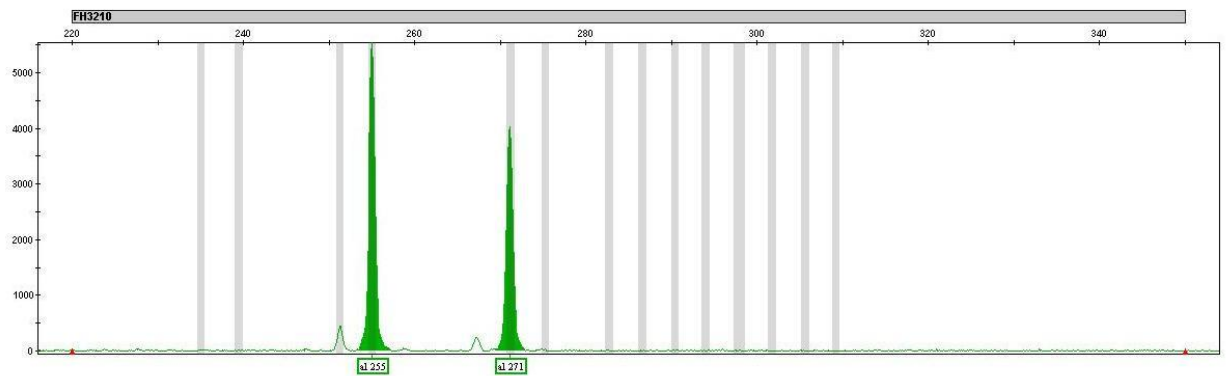
Obrázek 6: Detekce alel mikrosatelitního lokusu FH2004 pomocí programu GeneMapper verze 4.1. (Applied Biosystems)



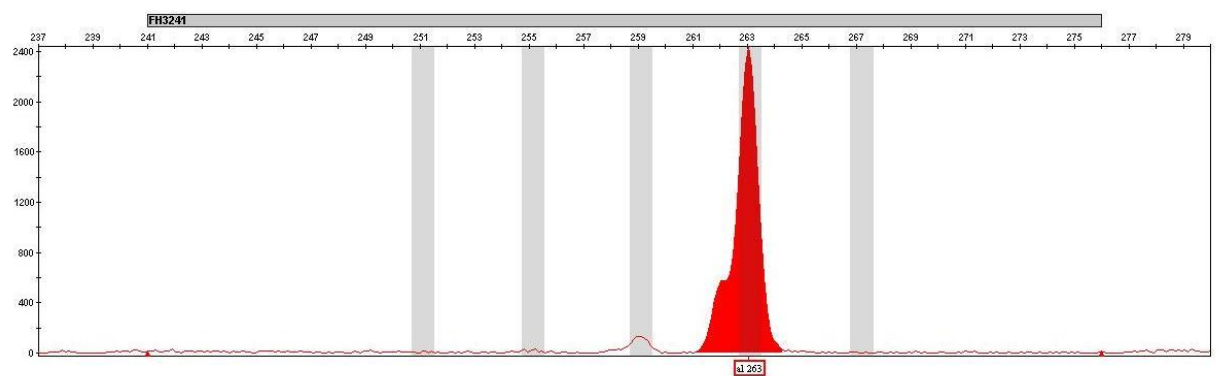
Obrázek 7: Detekce alel mikrosatelitního lokusu FH2010 pomocí programu GeneMapper verze 4.1. (Applied Biosystems)



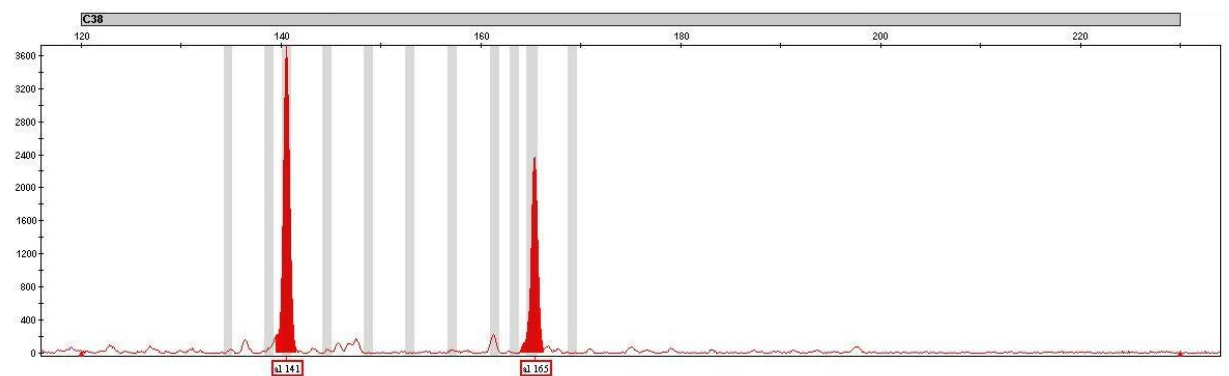
Obrázek 8: Detekce alel mikrosatelitního lokusu FH3210 pomocí programu GeneMapper verze 4.1. (Applied Biosystems)



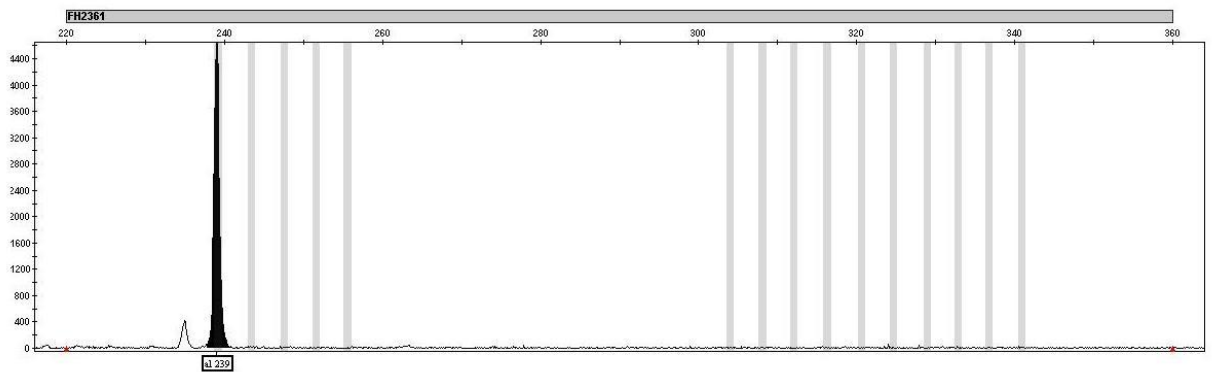
Obrázek 9: Detekce alel mikrosatelitního lokusu FH3241 pomocí programu GeneMapper verze 4.1. (Applied Biosystems)



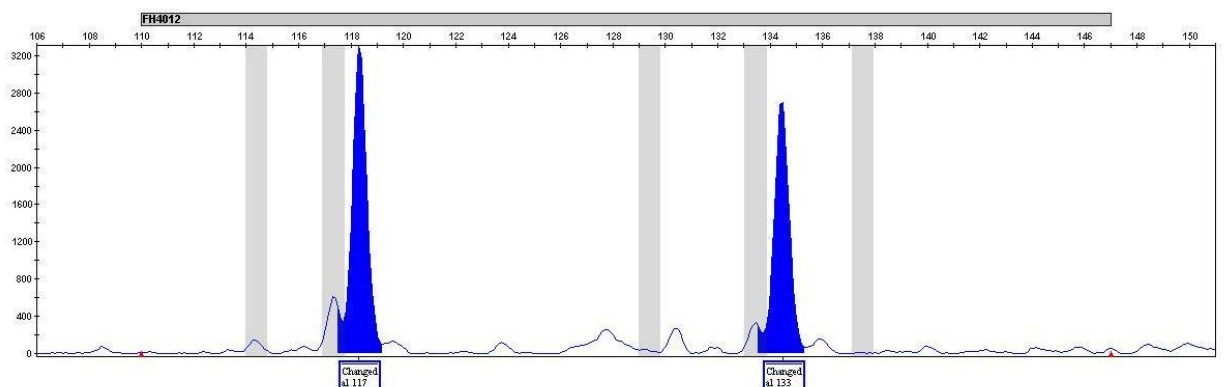
Obrázek 10: Detekce alel mikrosatelitního lokusu C38 pomocí programu GeneMapper verze 4.1. (Applied Biosystems)



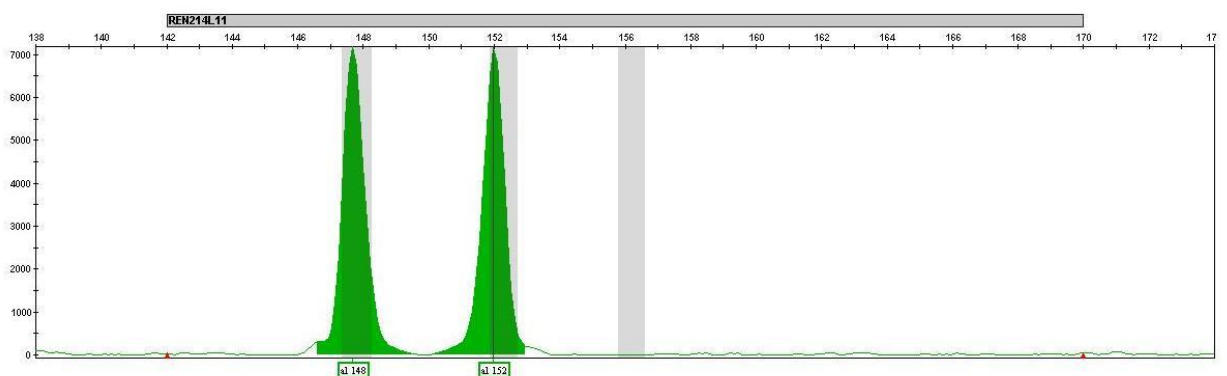
Obrázek 11: Detekce alel mikrosatelitního lokusu FH2361 pomocí programu GeneMapper verze 4.1. (Applied Biosystems)



Obrázek 12: Detekce alel mikrosatelitního lokusu FH4012 pomocí programu GeneMapper verze 4.1. (Applied Biosystems)



Obrázek 13: Detekce alel mikrosatelitního lokusu REN214L11 pomocí programu GeneMapper verze 4.1. (Applied Biosystems)



5.1.3. Detekované alely hodnocených mikrosatelitních lokusů

V tabulce 11 je uveden přehled detekovaných alel všech hodnocených jedinců. Do této tabulky jsou zařazeni rovněž jedinci, u kterých nebyla potvrzena paternita a jeden jedinec, jehož původ je odvoze od psa s neodpovídající paternitou. Výsledky – detekované alely 8 SSR-lokusů jsou zcela záměrně seřazeny podle rodokmenové příslušnosti jednotlivých jedinců k úplným respektive neúplným rodinám.

Tabulka 10: Genetická příbuznost hodnocených jedinců a detekované alely SSR lokusů – 1. část, červenou barvou jsou vyznačeni jedinci s neodpovídající paternitou, modrou barvou je označen potomek jedince s neodpovídající paternitou

Č.	Pohlaví	Rodina	Matka	Otec	SSR-multiplex I								SSR-multiplex II								Počet heteroz. lokusů
					FH2004		FH2010		FH3210		FH3241		C38		FH2361		FH4012		REN214L11		
					alela 1	alela 2	alela 1	alela 2	alela 1	alela 2	alela 1	alela 2	alela 1	alela 2	alela 1	alela 2	alela 1	alela 2	alela 1	alela 2	
318	F	R1	317	275	168	175	153	161	271	271	263	263	145	153	239	304	117	117	152	156	5
324	F	R1	317	275	168	168	153	161	239	255	259	263	141	145	239	325	117	133	152	152	6
319	P	R1	317	275	168	175	149	161	271	271	263	263	145	153	239	325	133	133	152	152	4
320	P	R1	317	275	168	168	153	161	271	271	259	263	141	145	304	325	117	117	152	156	5
322	P	R1	317	275	168	168	149	161	255	271	263	263	141	145	304	325	117	133	152	152	5
304	F	R2	323	326	168	226	153	157	239	255	259	263	141	145	248	321	133	133	148	152	7
307	F	R2	323	326	168	226	157	157	255	255	259	263	141	141	243	341	133	133	148	152	5
308	F	R2	323	326	226	226	153	157	239	271	255	263	141	145	243	248	117	133	148	152	7
141	F	R3	111	67	168	226	161	161	255	271	263	263	165	169	312	312	117	133	148	152	5
143	F	R3	111	67	168	226	161	161	271	290	255	263	141	145	239	312	117	133	148	152	7
140	F	R3	111	67	168	226	157	161	290	298	255	263	165	169	243	248	117	133	148	152	8
139	P	R3	111	67	168	226	157	161	255	271	263	263	141	169	248	312	117	133	148	152	7
142	P	R3	111	67	168	226	157	161	255	298	263	263	141	145	239	312	117	133	148	152	7
290	P	R4	289	175	168	171	157	161	290	290	251	255	141	141	252	321	117	138	148	152	6
365	F	R5	363	361	168	168	153	157	271	271	251	263	141	141	239	239	117	138	148	156	4
364	P	R5	363	361	168	226	149	157	271	271	255	263	141	141	239	239	117	138	148	152	5
367	P	R5	363	361	168	226	149	161	271	271	251	251	141	141	239	239	117	117	148	156	4
214	F	R6	206	212	226	230	153	161	239	302	259	263	141	145	304	337	117	129	152	152	7
262	F	R6	206	212	168	230	149	161	290	302	259	263	135	145	321	337	117	129	148	152	8
334	F	R6	206	212	230	230	149	161	255	290	259	263	135	141	304	325	117	129	148	152	7
306	P	R6	206	212	168	230	149	161	290	302	259	263	141	145	304	325	117	117	152	152	6

Tabulka 10: Genetická příbuznost hodnocených jedinců a detekované alely SSR lokusů – 2. část, červenou barvou jsou vyznačeni jedinci s neodpovídající paternitou, modrou barvou je označen potomek jedince s neodpovídající paternitou

Č.	Pohlaví	Rodina	Matka	Otec	SSR-multiplex I								SSR-multiplex II								Počet heteroz. lokusů
					FH2004		FH2010		FH3210		FH3241		C38		FH2361		FH4012		REN214L11		
					alela 1	alela 2	alela 1	alela 2	alela 1	alela 2	alela 1	alela 2	alela 1	alela 2	alela 1	alela 2	alela 1	alela 2	alela 1	alela 2	
466	F	R7	464	175	226	226	153	161	283	298	263	263	141	145	252	321	117	117	148	152	5
80	P	R7	464	175	168	171	153	157	283	298	255	263	141	141	252	321	117	133	148	152	7
465	P	R7	464	175	168	226	157	161	298	302	259	263	141	145	321	325	117	133	148	152	8
358	P	R8	328	326	175	226	153	161	255	271	251	263	141	169	248	321	117	133	148	148	7
131	F	R9	97	99	226	226	161	161	255	271	255	255	153	169	248	252	117	133	148	152	5
132	F	R9	97	99	168	226	161	161	239	255	251	263	135	145	239	248	117	133	148	148	6
133	F	R9	97	99	168	226	149	161	239	255	251	255	145	169	252	325	117	133	148	148	7
261	P	R9	97	99	226	226	149	161	255	271	255	263	145	169	239	248	117	133	148	152	7
343	F	R10	328	326	226	226	153	161	255	271	251	255	145	169	248	321	117	133	148	148	6
158	P	R10	464	352	168	168	149	161	255	302	259	263	141	145	239	321	117	133	148	152	7
409	F	R11	120	195	226	226	161	161	271	294	259	263	145	145	239	239	133	138	148	152	4
77	F	R12	466	67	168	226	153	161	255	283	263	263	141	145	252	316	117	117	152	152	5
110	F	R12	466	67	226	230	161	161	255	283	263	263	141	165	252	312	117	117	152	152	4
203	P	R13	335	80	168	230	153	161	271	298	263	263	141	169	248	252	117	117	148	152	6
240	F	R14	422	371	168	175	153	161	255	302	263	263	145	165	239	248	117	133	148	152	7
378	P	R15	382	104	168	226	157	161	271	271	259	263	141	169	239	308	117	133	148	148	6
301	P	R16	303	89	226	226	149	161	271	290	255	259	141	141	239	239	133	138	148	152	6
279	F	R17	383	67	168	175	153	161	255	271	263	263	165	169	239	248	117	133	148	152	7
373	F	R17	383	67	168	168	153	161	255	271	251	263	141	165	239	248	117	133	148	148	6
399	P	R17	383	67	168	230	153	161	255	271	263	263	141	141	239	248	117	133	148	152	6
229	F	R18	226	350	168	168	149	161	271	283	251	255	145	169	239	248	117	117	148	152	6

Tabulka 10: Genetická příbuznost hodnocených jedinců a detekované alely SSR lokusů – 3. část, červenou barvou jsou vyznačeni jedinci s neodpovídající paternitou, modrou barvou je označen potomek jedince s neodpovídající paternitou

Č.	Pohlaví	Rodina	Matka	Otec	SSR-multiplex I								SSR-multiplex II								Počet heteroz. lokusů
					FH2004		FH2010		FH3210		FH3241		C38		FH2361		FH4012		REN214L11		
					alela 1	alela 2	alela 1	alela 2	alela 1	alela 2	alela 1	alela 2	alela 1	alela 2	alela 1	alela 2	alela 1	alela 2	alela 1	alela 2	
403	P	R19	396	441	226	226	153	153	271	298	255	263	141	145	243	329	117	133	152	152	5
162	F	R20	165	175	168	171	157	157	239	290	255	263	141	145	239	252	117	117	148	148	5
160	P	R20	165	175	171	226	161	161	271	290	255	263	145	145	239	325	117	117	148	148	4
163	P	R20	165	175	168	171	157	157	271	290	259	263	141	145	239	252	117	117	148	148	5
397	F	R21	383	465	168	175	153	161	271	302	251	263	141	169	248	325	117	133	148	152	8
13	P	R22	440	67	168	230	157	161	255	298	263	263	141	165	243	312	117	117	148	152	7
281	F	R23	283	282	168	230	161	161	271	302	263	263	165	165	248	325	117	129	152	152	4
280	F	R24	284	282	168	226	153	161	239	271	259	263	141	141	248	248	129	133	152	152	5
379	P	R25	404	383	168	175	153	153	255	271	255	263	141	169	239	248	133	133	148	152	6
167	F	R26	166	161	168	226	149	157	271	271	259	263	141	141	239	239	117	117	148	152	4
273	F	R26	166	161	168	168	149	161	271	271	259	263	141	145	239	239	117	133	148	148	4
351	P	R26	166	161	168	226	149	161	271	271	251	263	145	145	239	239	117	133	148	152	5
407	P	R26	166	161	168	226	149	161	239	271	259	263	141	145	239	239	133	133	148	152	6
396	F	R27	374	393	168	226	149	153	271	271	255	263	141	145	325	329	117	133	148	152	7
105	F	R28	97	371	168	226	161	161	255	255	251	263	141	153	239	239	117	117	152	152	3
413	F	R29	276	414	164	168	153	161	239	239	251	259	139	169	239	256	117	117	148	152	6
159	P	R30	103	353	168	168	149	149	255	271	263	263	141	145	239	252	117	133	152	152	5
194	P	R30	103	353	168	168	149	149	255	271	259	263	141	145	239	239	133	133	152	152	3
398	P	R31	395	371	168	226	149	161	271	271	263	263	141	165	239	239	117	117	148	152	5
335	F	R32	114	74	226	230	153	161	271	271	255	263	169	169	248	252	117	133	148	152	7
468	P	R33	382	104	168	226	157	161	271	271	259	263	141	169	248	325	133	133	148	152	6

Tabulka 10: Genetická příbuznost hodnocených jedinců a detekované alely SSR lokusů – 4. část, červenou barvou jsou vyznačeni jedinci s neodpovídající paternitou, modrou barvou je označen potomek jedince s neodpovídající paternitou

Č.	Pohlaví	Rodina	Matka	Otec	SSR-multiplex I								SSR-multiplex II								Počet heteroz. lokusů
					FH2004		FH2010		FH3210		FH3241		C38		FH2361		FH4012		REN214L11		
					alela 1	alela 2	alela 1	alela 2	alela 1	alela 2	alela 1	alela 2	alela 1	alela 2	alela 1	alela 2	alela 1	alela 2	alela 1	alela 2	
489	F	R34	289	175	168	171	161	161	255	290	251	255	141	141	248	252	117	133	148	152	6
297	F	R34	440	67	168	226	161	161	255	271	263	263	141	141	239	243	117	117	148	152	4
460	F	R35	459	275	168	175	153	161	255	271	263	263	153	169	239	252	133	133	152	152	5
461	P	R36	414	412	164	168	153	161	239	239	259	263	139	145	239	321	133	133	152	152	6
359	F	M	97		168	230	161	161	271	271	255	263	141	145	252	325	117	133	148	152	6
104	P	M	97		175	226	161	161	271	271	251	259	153	169	239	325	117	133	148	152	6
97	P	M	100		168	226	161	161	255	271	251	255	145	153	239	252	117	117	148	152	6
478	P	M	100		226	226	153	161	239	298	255	263	153	165	239	325	117	129	152	152	6
134	F	M	101		175	230	161	161	271	271	255	263	145	145	239	329	117	117	152	152	3
135	F	M	101		175	230	161	161	271	271	251	263	145	145	239	325	117	138	148	152	5
136	F	M	101		175	226	153	161	271	271	255	263	145	145	239	325	117	117	152	152	4
137	P	M	101		168	230	153	161	271	271	251	263	145	145	239	325	117	117	148	148	4
91	P	M	114		168	168	149	153	271	290	263	263	145	145	239	312	117	138	148	148	4
178	P	M	114		168	168	149	149	290	298	263	263	145	145	239	248	117	117	148	152	4
349	P	M	114		226	226	149	161	271	271	263	263	145	145	239	248	117	117	148	148	2
92	F	M	115		168	168	157	161	271	271	251	263	145	165	239	239	117	133	152	152	4
111	F	M	115		168	226	161	161	271	298	263	263	145	169	248	312	133	133	148	152	5
117	F	M	115		168	226	149	161	271	290	263	263	141	145	239	239	117	117	148	152	5
120	F	M	115		226	230	149	161	271	271	259	263	145	169	239	239	117	138	148	152	6
121	F	M	115		168	230	161	161	271	298	263	263	145	169	239	308	117	129	148	152	6
187	F	M	115		226	230	157	161	271	271	251	263	165	169	239	248	117	117	148	152	6

Tabulka 10: Genetická příbuznost hodnocených jedinců a detekované alely SSR lokusů – 5. část, červenou barvou jsou vyznačeni jedinci s neodpovídající paternitou, modrou barvou je označen potomek jedince s neodpovídající paternitou

Č.	Pohlaví	Rodina	Matka	Otec	SSR-multiplex I								SSR-multiplex II								Počet heteroz. lokusů
					FH2004		FH2010		FH3210		FH3241		C38		FH2361		FH4012		REN214L11		
					alela 1	alela 2	alela 1	alela 2	alela 1	alela 2	alela 1	alela 2	alela 1	alela 2	alela 1	alela 2	alela 1	alela 2	alela 1	alela 2	
459	F	M	115		168	168	153	161	271	298	259	263	145	169	252	312	133	133	152	152	5
118	P	M	115		168	168	157	161	239	271	263	263	141	169	239	239	117	133	148	152	5
119	P	M	115		168	230	153	161	271	271	251	263	165	169	239	239	117	133	148	152	6
161	P	M	115		168	226	149	161	271	271	259	263	141	145	239	239	117	133	148	152	6
417	P	M	115		168	230	157	161	239	271	251	263	145	165	248	252	117	133	152	152	7
145	F	M	116		171	226	149	161	255	290	251	263	145	153	239	239	117	117	148	148	5
165	F	M	116		168	226	157	161	239	271	259	263	141	145	239	239	117	133	148	148	6
122	P	M	116		168	226	157	161	239	271	259	263	141	145	239	239	117	117	152	152	5
146	F	M	117		168	230	149	153	271	294	263	263	141	145	239	325	117	117	152	152	5
147	P	M	117		168	230	149	153	271	290	263	263	141	145	239	329	117	117	152	152	5
463	P	M	117		168	168	149	153	255	290	263	263	141	145	239	325	117	138	148	152	6
150	P	M	120		168	226	157	161	239	271	263	263	141	145	239	239	117	133	148	152	6
151	P	M	120		168	230	157	161	239	271	259	263	169	169	239	239	117	138	148	152	6
419	P	M	120		168	230	149	157	239	271	259	263	141	145	239	239	133	138	152	152	6
420	P	M	120		168	230	153	161	239	271	259	263	141	169	239	239	117	129	152	152	6
125	F	M	121		175	230	161	161	290	298	263	263	141	169	239	243	117	129	148	148	5
152	F	M	121		175	230	149	161	271	298	255	263	145	145	239	312	117	117	148	148	5
153	F	M	121		168	175	149	161	298	298	255	263	141	145	239	316	117	117	148	152	6
155	F	M	121		168	226	149	161	298	298	263	263	141	169	308	312	117	117	152	152	4
124	P	M	121		168	175	161	161	290	298	259	263	141	145	243	308	117	117	148	152	6
154	P	M	121		168	175	149	161	271	298	255	263	149	169	239	312	117	129	148	152	8

Tabulka 10: Genetická příbuznost hodnocených jedinců a detekované alely SSR lokusů – 6. část, červenou barvou jsou vyznačeni jedinci s neodpovídající paternitou, modrou barvou je označen potomek jedince s neodpovídající paternitou

Č.	Pohlaví	Rodina	Matka	Otec	SSR-multiplex I								SSR-multiplex II								Počet heteroz. lokusů
					FH2004		FH2010		FH3210		FH3241		C38		FH2361		FH4012		REN214L11		
					alela 1	alela 2	alela 1	alela 2	alela 1	alela 2	alela 1	alela 2	alela 1	alela 2	alela 1	alela 2	alela 1	alela 2	alela 1	alela 2	
416	P	M	121		168	226	149	161	255	271	255	263	141	169	308	312	117	117	152	152	6
127	F	M	126		168	168	149	161	239	306	263	263	141	145	252	312	117	133	152	152	5
246	F	M	206		226	230	153	161	255	290	263	263	135	169	304	325	129	133	148	152	7
112	F	M	218		226	226	149	149	271	283	263	263	141	145	239	329	117	117	148	152	4
294	F	M	218		168	226	157	161	271	298	251	251	141	145	239	321	117	117	148	152	7
342	P	M	218		226	226	149	157	283	290	263	263	141	145	321	325	117	117	148	152	6
215	F	M	226		168	168	153	161	271	290	263	263	145	153	239	316	133	133	148	148	5
231	F	M	229		168	168	161	161	271	283	251	255	165	169	239	252	117	133	148	152	6
230	F	M	229		171	175	149	161	271	271	251	255	145	165	239	252	117	133	148	148	6
206	F	M	267		168	230	153	161	239	290	263	263	135	141	304	321	117	129	152	152	8
252	F	M	267		226	226	149	161	239	271	255	263	141	145	243	325	117	133	148	148	6
432	F	M	267		226	226	157	161	271	290	263	263	145	145	239	321	117	133	148	148	4
243	P	M	267		168	230	149	161	271	290	263	263	145	145	321	325	117	117	148	152	5
245	P	M	267		226	230	149	161	290	290	263	263	141	145	239	321	117	133	148	148	5
228	F	M	270		168	168	153	161	271	298	259	263	141	153	239	248	117	133	148	152	7
232	F	M	270		168	168	153	161	255	298	251	263	141	153	239	248	117	117	152	152	6
293	F	M	281		175	230	153	161	255	271	263	263	141	165	248	248	117	129	152	152	5
376	F	M	283		168	230	153	161	255	283	251	263	141	161	248	321	117	133	152	152	7
422	F	M	283		175	226	153	161	271	302	263	263	145	161	248	321	117	133	148	152	7
292	F	M	284		168	226	153	157	271	283	263	263	141	165	308	321	117	133	152	152	6
451	F	M	289		168	168	149	157	255	290	255	263	141	169	248	312	117	133	148	152	7

Tabulka 10: Genetická příbuznost hodnocených jedinců a detekované alely SSR lokusů – 7. část, červenou barvou jsou vyznačeni jedinci s neodpovídající paternitou, modrou barvou je označen potomek jedince s neodpovídající paternitou

Č.	Pohlaví	Rodina	Matka	Otec	SSR-multiplex I								SSR-multiplex II								Počet heteroz. lokusů
					FH2004		FH2010		FH3210		FH3241		C38		FH2361		FH4012		REN214L11		
					alela 1	alela 2	alela 1	alela 2	alela 1	alela 2	alela 1	alela 2	alela 1	alela 2	alela 1	alela 2	alela 1	alela 2	alela 1	alela 2	
452	F	M	289		168	168	149	157	290	290	255	263	141	145	248	312	117	133	148	152	6
487	F	M	289		168	175	149	161	255	290	263	263	141	141	248	333	117	133	148	152	6
450	P	M	289		168	175	149	157	255	255	251	255	141	165	316	321	117	133	148	152	7
453	P	M	289		168	175	149	157	255	290	251	255	145	169	248	312	117	133	148	156	8
327	F	M	303		168	230	161	161	290	298	255	263	145	153	239	248	117	117	148	152	6
310	F	M	305		168	226	149	161	255	255	259	263	145	169	248	325	117	133	148	152	7
260	P	M	305		168	230	149	161	255	255	259	263	145	145	248	312	117	117	148	152	5
311	P	M	312		168	226	157	161	255	290	251	263	145	165	239	325	133	133	148	152	7
174	F	M	335		168	226	153	153	271	298	255	263	141	169	252	321	117	133	148	152	7
256	F	M	335		226	226	153	161	271	287	255	259	141	169	248	329	133	133	148	152	6
336	F	M	335		226	226	149	161	271	290	255	259	141	169	239	252	133	133	148	152	6
255	P	M	335		168	226	153	161	271	271	255	263	141	169	248	256	117	117	152	152	5
321	P	M	360		226	230	157	161	239	290	263	263	141	169	312	316	129	133	148	152	7
372	P	M	373		168	226	149	153	255	255	251	255	141	145	239	325	117	138	148	152	7
381	P	M	376		168	230	161	161	255	283	263	263	141	165	239	321	117	133	148	152	6
107	F	M	382		168	168	157	161	271	271	263	263	141	169	248	308	117	117	148	152	4
380	F	M	382		168	230	161	161	239	271	263	263	141	169	308	325	117	133	148	148	5
282	P	M	382		168	168	157	161	271	271	263	263	141	165	248	308	117	129	148	152	5
328	F	M	383		175	226	149	153	255	271	251	255	169	169	239	248	117	117	148	148	5
177	P	M	383		168	175	153	161	271	271	259	263	145	169	248	325	117	133	148	148	6
361	P	M	383		168	226	149	153	255	271	251	255	141	169	239	239	117	138	148	152	7

Tabulka 10: Genetická příbuznost hodnocených jedinců a detekované alely SSR lokusů – 8. část, červenou barvou jsou vyznačeni jedinci s neodpovídající paternitou, modrou barvou je označen potomek jedince s neodpovídající paternitou

Č.	Pohlaví	Rodina	Matka	Otec	SSR-multiplex I								SSR-multiplex II								Počet heteroz. lokusů
					FH2004		FH2010		FH3210		FH3241		C38		FH2361		FH4012		REN214L11		
					alela 1	alela 2	alela 1	alela 2	alela 1	alela 2	alela 1	alela 2	alela 1	alela 2	alela 1	alela 2	alela 1	alela 2	alela 1	alela 2	
366	P	M	383		168	226	153	161	271	271	251	263	141	169	239	248	117	117	148	152	6
423	F	M	422		175	226	157	161	271	298	263	263	141	161	248	304	117	117	148	152	6
291	P	M	422		168	175	157	161	239	302	263	263	141	161	304	321	133	133	148	152	6
357	F	M	429		175	226	149	153	255	271	259	263	141	145	248	329	133	133	152	152	6
428	F	M	429		168	226	149	161	255	271	255	259	169	169	248	325	117	133	148	152	7
355	P	M	429		168	168	149	153	255	271	263	263	145	169	248	312	117	133	148	152	7
427	P	M	429		175	226	149	161	255	302	255	259	141	169	248	321	117	133	148	152	8
227	P	M	433		168	175	153	161	239	302	255	263	165	165	248	252	117	133	148	156	7
362	P	M	440		226	230	153	161	271	298	259	263	153	165	304	312	117	129	148	152	8
446	F	M	447		175	226	153	161	271	271	259	263	141	141	304	312	117	117	148	152	5
1	P	M	466		226	226	153	161	283	287	263	263	145	145	252	325	117	117	152	152	3
477	P	M	479		168	226	149	157	255	271	263	267	141	153	239	248	117	129	152	152	7
73	F	O		67	168	230	157	157	255	290	255	263	141	141	239	312	117	133	148	152	6
387	P	O		74	226	226	149	149	271	290	251	255	141	145	239	248	117	133	148	148	6
276	F	O		118	168	168	153	161	239	298	259	263	141	169	239	256	117	133	148	152	7
418	F	O		118	168	226	157	161	239	271	263	263	141	141	239	248	133	138	152	152	5
185	P	O		118	168	168	157	161	239	271	263	263	141	141	239	308	133	133	148	148	4
64	P	O		161	168	168	149	153	255	271	255	259	145	165	239	321	117	133	148	152	7
63	F	O		175	168	226	157	161	255	290	255	259	141	145	239	252	117	133	148	148	7
84	F	O		175	226	226	161	161	255	298	263	263	141	141	325	329	117	117	148	152	3
192	F	O		175	168	171	161	161	271	298	259	263	145	145	308	325	117	117	148	152	5

Tabulka 10: Genetická příbuznost hodnocených jedinců a detekované alely SSR lokusů – 9. část, červenou barvou jsou vyznačeni jedinci s neodpovídající paternitou, modrou barvou je označen potomek jedince s neodpovídající paternitou

Č.	Pohlaví	Rodina	Matka	Otec	SSR-multiplex I								SSR-multiplex II								Počet heteroz. lokusů
					FH2004		FH2010		FH3210		FH3241		C38		FH2361		FH4012		REN214L11		
					alela 1	alela 2	alela 1	alela 2	alela 1	alela 2	alela 1	alela 2	alela 1	alela 2	alela 1	alela 2	alela 1	alela 2	alela 1	alela 2	
341	F	O		175	168	226	157	157	239	298	263	263	135	141	252	304	117	133	148	152	6
87	P	O		175	171	226	157	161	255	298	255	263	141	145	239	325	117	117	148	152	7
331	P	O		175	226	226	157	157	255	298	255	263	141	145	239	252	117	117	148	152	5
101	F	O		195	168	175	161	161	271	271	251	255	145	145	239	321	117	117	148	152	4
223	P	O		195	175	226	153	161	239	271	251	263	145	145	239	248	117	138	148	148	6
323	F	O		212	168	226	153	157	239	255	259	263	141	165	248	337	117	133	152	152	7
205	F	O		243	168	168	149	161	271	290	263	263	145	153	239	325	117	117	148	152	5
208	P	O		243	168	168	149	161	290	298	263	263	145	153	239	321	117	133	152	152	5
325	P	O		243	226	230	161	161	271	290	263	263	145	153	325	333	117	117	152	152	4
202	F	O		255	168	171	149	161	255	271	255	259	169	169	239	256	117	133	148	152	7
259	P	O		255	168	171	149	161	271	290	251	263	141	169	248	252	117	138	148	152	8
363	F	O		275	168	226	157	161	271	271	251	263	135	141	304	239	117	129	148	156	7
71	P	O		275	175	226	161	161	255	255	251	263	141	153	248	325	117	129	148	152	7
113	P	O		275	168	175	157	161	271	271	255	263	153	153	239	325	117	133	148	156	6
431	P	O		275	168	168	153	161	255	271	255	263	141	153	239	248	133	133	148	156	6
458	P	O		275	168	230	161	161	255	271	255	263	141	165	325	325	117	133	148	152	6
244	F	O		285	164	164	149	153	255	271	251	255	153	165	248	308	133	133	152	156	6
286	P	O		285	168	226	153	153	271	309	255	255	141	165	239	248	133	138	148	152	6
164	F	O		329	168	226	161	161	255	298	263	263	141	141	239	248	117	133	152	152	4
191	F	O		348	168	226	149	153	271	271	263	263	141	153	308	329	117	117	152	156	5
346	P	O		348	168	168	149	153	271	306	263	263	135	145	248	248	117	117	148	152	4

Tabulka 10: Genetická příbuznost hodnocených jedinců a detekované alely SSR lokusů – 10. část, červenou barvou jsou vyznačeni jedinci s neodpovídající paternitou, modrou barvou je označen potomek jedince s neodpovídající paternitou

Č.	Pohlaví	Rodina	Matka	Otec	SSR-multiplex I								SSR-multiplex II								Počet heteroz. lokusů
					FH2004		FH2010		FH3210		FH3241		C38		FH2361		FH4012		REN214L11		
					alela 1	alela 2	alela 1	alela 2	alela 1	alela 2	alela 1	alela 2	alela 1	alela 2	alela 1	alela 2	alela 1	alela 2	alela 1	alela 2	
201	F	O		350	168	168	161	161	271	283	255	263	145	165	239	248	117	117	148	148	4
219	F	O		350	168	168	149	149	271	271	251	255	145	169	248	325	117	133	152	152	5
344	F	O		352	168	168	153	161	255	271	251	263	145	145	239	248	117	117	148	148	4
247	P	O		352	168	168	149	161	271	294	259	263	145	145	239	239	117	117	148	152	4
315	P	O		352	168	168	149	161	283	294	259	263	141	145	239	321	117	133	148	152	7
69	F	O		371	168	168	161	161	255	271	263	263	141	141	239	239	117	133	152	152	2
401	F	O		371	168	175	153	161	239	271	255	263	141	169	239	252	117	133	152	152	7
375	P	O		371	168	226	149	161	271	283	259	263	141	141	239	248	117	117	152	152	5
404	P	O		387	164	168	153	153	255	309	251	251	139	141	239	325	114	133	148	152	6
414	P	O		387	164	168	153	153	239	271	251	255	139	165	239	325	117	133	148	148	6
68	F	O		404	164	168	153	161	255	309	251	251	139	161	239	325	114	133	148	148	6
115	F	O		430	168	230	161	161	271	271	263	263	145	169	239	252	117	133	148	152	5
126	F	O		430	168	230	153	161	239	271	263	263	145	145	239	252	117	133	148	152	6
473	P	O		463	168	168	149	153	271	290	251	263	145	165	239	248	117	133	148	152	7
474	P	O		463	168	230	153	153	255	271	251	263	145	163	248	325	117	133	148	152	7
9	F				168	175	149	153	255	290	255	259	145	145	239	304	117	133	148	152	7
11	F				168	168	157	157	255	271	255	263	141	169	239	248	117	117	148	148	4
12	F				168	168	157	157	255	275	259	263	145	165	239	312	117	117	148	148	4
62	F				226	226	161	161	255	290	259	263	141	145	243	252	117	117	148	148	4
65	F				168	230	153	157	271	283	251	255	145	169	239	248	117	117	148	148	6
70	F				168	226	149	153	255	271	259	263	141	145	239	248	117	133	152	152	7

Tabulka 10: Genetická příbuznost hodnocených jedinců a detekované alely SSR lokusů – 11. část, červenou barvou jsou vyznačeni jedinci s neodpovídající paternitou, modrou barvou je označen potomek jedince s neodpovídající paternitou

Č.	Pohlaví	Rodina	Matka	Otec	SSR-multiplex I								SSR-multiplex II								Počet heteroz. lokusů
					FH2004		FH2010		FH3210		FH3241		C38		FH2361		FH4012		REN214L11		
					alela 1	alela 2	alela 1	alela 2	alela 1	alela 2	alela 1	alela 2	alela 1	alela 2	alela 1	alela 2	alela 1	alela 2	alela 1	alela 2	
79	F				168	168	149	157	239	306	263	263	141	145	248	252	133	133	152	156	5
94	F				168	168	157	161	290	302	263	263	153	169	248	329	117	138	148	156	6
100	F				226	226	153	161	255	298	255	259	141	153	239	248	117	133	152	152	7
103	F				168	168	149	149	255	271	263	263	141	165	239	239	117	133	148	152	4
109	F				226	226	157	161	239	271	255	263	141	153	239	248	117	117	152	152	5
114	F				168	226	149	149	271	298	263	263	145	165	248	312	117	117	148	148	4
116	F				175	226	161	161	255	271	251	259	145	153	239	321	117	117	148	152	6
128	F				168	168	149	161	271	271	251	263	141	165	239	248	117	133	152	152	5
130	F				168	168	149	161	255	302	251	255	161	165	239	248	117	129	152	152	6
156	F				168	168	149	153	255	271	251	263	141	145	239	252	117	117	148	152	6
166	F				168	226	157	161	239	271	251	263	141	145	239	239	117	133	148	152	7
171	F				175	230	161	161	255	298	255	263	153	165	325	325	117	133	148	152	6
176	F				168	226	153	157	239	290	263	263	141	141	239	239	117	117	148	148	4
180	F				226	230	153	153	283	290	251	259	141	145	248	321	117	133	148	152	7
181	F				226	230	157	161	283	290	251	263	141	145	252	321	117	133	148	148	7
189	F				168	171	153	153	255	271	251	263	141	145	248	321	117	133	148	152	7
193	F				168	168	149	161	255	271	259	259	141	169	312	321	117	138	148	156	6
209	F				168	226	149	153	271	298	263	263	145	169	239	252	117	117	148	152	6
210	F				168	171	161	161	271	271	263	263	141	145	248	304	133	138	148	148	4
218	F				168	226	149	161	283	298	251	263	141	141	321	329	117	117	152	152	5
226	F				168	226	149	153	271	283	251	263	145	169	239	316	117	133	148	148	7

Tabulka 10: Genetická příbuznost hodnocených jedinců a detekované alely SSR lokusů – 12. část, červenou barvou jsou vyznačeni jedinci s neodpovídající paternitou, modrou barvou je označen potomek jedince s neodpovídající paternitou

Č.	Pohlaví	Rodina	Matka	Otec	SSR-multiplex I								SSR-multiplex II								Počet heteroz. lokusů
					FH2004		FH2010		FH3210		FH3241		C38		FH2361		FH4012		REN214L11		
					alela 1	alela 2	alela 1	alela 2	alela 1	alela 2	alela 1	alela 2	alela 1	alela 2	alela 1	alela 2	alela 1	alela 2	alela 1	alela 2	
234	F				168	230	157	161	239	290	263	263	141	169	243	252	117	133	152	152	6
235	F				168	171	153	161	271	283	263	263	165	169	248	325	117	138	148	152	7
249	F				175	226	161	161	255	271	255	263	145	169	239	325	117	133	148	148	6
254	F				168	230	153	161	239	271	259	263	145	169	239	252	117	117	152	152	6
257	F				168	168	149	161	271	290	263	263	141	145	321	329	117	117	148	152	5
258	F				168	226	149	161	271	283	263	263	141	169	239	239	117	117	148	148	4
267	F				226	230	153	161	239	290	259	263	141	145	243	321	117	133	148	152	8
268	F				168	226	153	161	239	290	259	263	135	141	248	304	133	133	148	152	7
270	F				168	168	149	161	255	271	251	259	141	153	248	248	117	133	148	152	6
278	F				168	226	149	153	290	302	263	263	141	169	239	239	117	133	152	156	6
283	F				226	230	157	161	255	302	255	263	161	165	248	325	117	133	148	152	8
284	F				168	226	153	161	239	283	259	263	141	141	248	321	133	133	148	152	6
289	F				168	168	157	161	255	290	251	263	141	169	248	321	133	138	148	152	7
295	F				168	175	149	157	290	290	263	263	141	145	312	329	117	117	148	156	5
298	F				168	226	153	157	255	255	255	263	145	169	248	252	117	129	152	156	7
299	F				168	230	149	153	290	298	255	255	141	153	248	329	117	133	148	152	7
303	F				168	226	149	161	271	290	259	263	141	145	239	304	117	133	148	152	8
305	F				168	226	157	161	255	271	263	263	145	169	248	321	117	133	148	156	7
309	F				168	175	153	153	271	271	263	263	145	165	239	248	117	133	148	152	5
312	F				171	226	153	157	271	290	263	263	165	165	239	239	133	133	148	152	4
314	F				168	175	161	161	271	271	259	263	141	153	248	248	117	117	148	152	4

Tabulka 10: Genetická příbuznost hodnocených jedinců a detekované alely SSR lokusů – 13. část, červenou barvou jsou vyznačeni jedinci s neodpovídající paternitou, modrou barvou je označen potomek jedince s neodpovídající paternitou

Č.	Pohlaví	Rodina	Matka	Otec	SSR-multiplex I								SSR-multiplex II								Počet heteroz. lokusů
					FH2004		FH2010		FH3210		FH3241		C38		FH2361		FH4012		REN214L11		
					alela 1	alela 2	alela 1	alela 2	alela 1	alela 2	alela 1	alela 2	alela 1	alela 2	alela 1	alela 2	alela 1	alela 2	alela 1	alela 2	
317	F				168	168	149	153	239	271	259	263	145	145	239	304	117	133	152	152	5
333	F				168	168	149	161	255	271	251	259	153	169	239	252	117	133	148	152	7
338	F				168	168	153	157	271	306	263	263	141	153	312	329	117	133	148	152	6
339	F				168	230	153	157	255	271	263	263	141	145	252	321	117	133	148	152	7
340	F				175	230	149	161	255	271	255	259	141	145	325	333	117	133	148	152	8
347	F				168	226	149	157	239	239	259	263	141	141	239	248	117	117	148	148	4
356	F				168	226	149	149	239	271	259	263	141	141	239	333	129	133	148	152	6
360	F				226	226	149	161	271	290	251	263	157	169	252	316	117	133	148	148	6
369	F				168	226	153	161	239	239	259	263	145	169	312	312	117	129	148	152	6
374	F				168	168	149	153	255	271	251	255	141	145	252	325	133	138	148	152	7
382	F				168	168	157	161	271	271	263	263	141	169	248	308	117	133	148	148	4
383	F				168	175	153	161	239	271	251	263	141	169	239	248	117	133	148	148	7
390	F				168	168	149	149	255	271	263	263	141	165	239	248	117	117	148	152	4
395	F				168	168	149	151	255	271	251	263	165	165	239	252	117	117	148	152	5
405	F				168	168	153	161	255	271	251	263	145	169	325	325	117	117	148	152	5
406	F				168	230	153	161	239	239	259	263	145	145	304	321	117	129	152	152	5
412	F				168	226	153	161	251	255	263	263	145	145	312	316	117	133	152	156	6
415	F				168	226	153	161	251	271	251	263	145	165	239	312	117	117	148	148	6
429	F				168	226	149	149	271	302	259	263	141	169	248	248	133	138	148	152	6
433	F				168	226	149	161	271	302	255	255	141	165	239	252	117	117	148	152	6
440	F				168	226	149	161	271	298	263	263	141	165	243	312	117	117	152	152	5

Tabulka 10: Genetická příbuznost hodnocených jedinců a detekované alely SSR lokusů – 14. část, červenou barvou jsou vyznačeni jedinci s neodpovídající paternitou, modrou barvou je označen potomek jedince s neodpovídající paternitou

Č.	Pohlaví	Rodina	Matka	Otec	SSR-multiplex I								SSR-multiplex II								Počet heteroz. lokusů
					FH2004		FH2010		FH3210		FH3241		C38		FH2361		FH4012		REN214L11		
					alela 1	alela 2	alela 1	alela 2	alela 1	alela 2	alela 1	alela 2	alela 1	alela 2	alela 1	alela 2	alela 1	alela 2	alela 1	alela 2	
442	F				168	168	153	157	255	306	263	263	141	145	312	329	117	133	152	152	5
447	F				175	226	153	161	271	271	259	263	141	169	248	304	117	133	148	152	7
456	F				168	230	153	161	239	271	251	263	145	145	252	321	117	117	148	152	6
464	F				168	226	153	161	283	302	259	263	141	141	248	321	133	133	152	152	5
467	F				168	226	157	161	290	302	259	263	141	141	312	321	117	117	152	152	5
471	F				168	168	153	161	271	271	259	263	153	153	239	325	117	117	148	152	4
472	F				168	175	149	153	271	294	251	255	145	169	239	321	117	117	148	152	7
475	F				168	168	149	153	239	255	255	263	165	165	248	248	117	117	148	148	3
476	F				168	168	149	149	271	306	259	263	141	145	239	248	117	117	148	152	5
479	F				226	226	149	153	239	271	259	263	141	141	239	239	117	129	152	152	4
10	P				168	168	149	161	255	271	255	259	141	153	239	248	117	133	148	152	7
66	P				168	171	153	161	239	290	255	263	141	141	239	325	117	133	148	148	6
67	P				168	230	157	161	255	290	255	263	141	165	239	312	117	117	148	152	7
72	P				168	226	149	153	255	271	251	255	141	169	239	239	117	117	148	152	6
74	P				226	226	149	153	271	290	255	263	141	169	239	248	117	133	148	148	6
82	P				168	168	149	153	290	298	263	263	141	157	248	248	117	138	148	148	4
85	P				168	171	153	161	239	290	255	263	141	145	252	333	117	117	148	148	6
88	P				168	226	149	153	271	287	255	263	141	145	243	248	117	129	148	148	7
89	P				226	226	149	149	271	287	255	263	141	145	239	325	138	138	152	152	4
90	P				175	226	153	153	239	271	263	263	141	169	239	243	133	138	152	152	5
93	P				175	226	157	161	255	287	259	263	141	141	248	252	117	133	148	148	7

Tabulka 10: Genetická příbuznost hodnocených jedinců a detekované alely SSR lokusů – 15. část, červenou barvou jsou vyznačeni jedinci s neodpovídající paternitou, modrou barvou je označen potomek jedince s neodpovídající paternitou

Č.	Pohlaví	Rodina	Matka	Otec	SSR-multiplex I								SSR-multiplex II								Počet heteroz. lokusů
					FH2004		FH2010		FH3210		FH3241		C38		FH2361		FH4012		REN214L11		
					alela 1	alela 2	alela 1	alela 2	alela 1	alela 2	alela 1	alela 2	alela 1	alela 2	alela 1	alela 2	alela 1	alela 2	alela 1	alela 2	
95	P				168	171	149	157	239	283	263	263	141	141	248	325	117	133	148	152	7
96	P				168	226	153	161	255	255	251	263	141	165	239	239	117	117	148	152	6
99	P				175	226	149	161	239	271	255	263	135	169	248	325	117	133	148	152	8
106	P				168	175	153	161	255	255	263	263	141	145	239	308	117	133	148	152	6
129	P				168	168	149	161	255	302	251	263	145	161	239	248	117	129	152	152	6
157	P				168	226	149	161	271	283	259	263	153	153	248	248	117	117	152	152	4
168	P				168	226	157	161	271	271	251	259	141	145	243	321	117	133	148	148	6
170	P				226	230	149	153	255	271	251	263	141	165	243	321	117	117	148	152	7
172	P				226	226	149	149	239	271	259	263	141	169	239	239	117	138	148	152	5
173	P				168	226	149	157	271	298	251	263	141	165	248	312	117	133	148	152	8
175	P				171	226	157	161	290	298	255	263	141	145	252	325	117	117	148	148	6
182	P				168	226	149	161	255	290	259	263	141	145	243	252	117	138	148	152	8
184	P				226	226	149	153	255	271	255	263	141	145	248	321	117	117	148	148	5
190	P				168	226	153	153	255	271	251	263	141	141	312	321	117	133	148	152	6
195	P				168	226	149	161	271	294	251	263	145	145	239	239	117	133	148	152	6
196	P				168	175	153	153	239	255	259	263	145	169	243	325	117	138	148	152	7
198	P				168	168	149	153	271	271	263	263	145	169	239	321	117	133	148	148	4
200	P				168	171	157	161	290	306	263	263	145	153	248	329	117	117	148	156	6
207	P				168	168	149	153	290	306	251	263	145	145	325	329	117	133	148	148	5
211	P				168	168	161	161	283	306	251	263	141	141	248	321	133	133	148	152	4
212	P				226	230	149	153	255	302	255	259	141	145	325	337	117	133	148	152	8

Tabulka 10: Genetická příbuznost hodnocených jedinců a detekované alely SSR lokusů – 16. část, červenou barvou jsou vyznačeni jedinci s neodpovídající paternitou, modrou barvou je označen potomek jedince s neodpovídající paternitou

Č.	Pohlaví	Rodina	Matka	Otec	SSR-multiplex I								SSR-multiplex II								Počet heteroz. lokusů
					FH2004		FH2010		FH3210		FH3241		C38		FH2361		FH4012		REN214L11		
					alela 1	alela 2	alela 1	alela 2	alela 1	alela 2	alela 1	alela 2	alela 1	alela 2	alela 1	alela 2	alela 1	alela 2	alela 1	alela 2	
213	P				226	226	149	161	271	271	263	263	145	165	239	321	117	117	148	152	4
216	P				168	168	149	149	271	306	255	263	141	169	248	248	117	129	148	152	5
233	P				168	226	153	161	271	294	255	263	145	145	239	248	117	117	148	152	6
236	P				168	168	153	161	255	271	263	263	141	153	239	308	133	133	148	152	5
239	P				168	168	149	161	271	271	263	263	135	145	239	248	117	117	152	152	3
241	P				168	226	149	161	290	290	263	263	139	145	239	329	117	133	148	156	6
248	P				168	168	161	161	283	294	259	263	141	141	239	316	133	133	148	152	4
250	P				168	171	149	153	271	271	259	263	145	165	239	248	117	138	148	148	6
251	P				168	230	149	153	255	290	255	263	135	141	248	304	117	133	148	152	8
264	P				168	168	149	161	271	271	255	263	145	169	239	248	117	133	148	152	6
265	P				175	230	149	161	255	290	255	259	141	153	239	248	117	133	148	152	8
274	P				226	226	153	157	271	290	251	263	141	145	239	243	117	117	148	152	6
275	P				168	175	161	161	255	271	263	263	141	153	239	325	117	133	152	156	6
285	P				164	168	153	153	271	309	251	255	139	165	239	308	114	133	148	152	7
287	P				164	168	153	153	239	271	255	255	139	141	239	308	114	117	148	152	6
296	P				168	230	153	153	271	298	263	267	153	169	239	239	117	117	152	152	4
302	P				168	226	149	161	239	271	259	263	135	153	248	248	117	117	152	152	5
313	P				168	230	149	161	255	271	251	263	141	145	239	321	117	129	152	152	7
316	P				168	168	161	161	271	271	263	263	141	153	239	239	117	133	152	152	2
326	P				175	226	157	161	255	271	255	263	141	145	243	321	117	133	148	148	7
329	P				168	226	161	161	271	298	263	263	141	153	239	239	117	133	152	152	4

Tabulka 10: Genetická příbuznost hodnocených jedinců a detekované alely SSR lokusů – 17. část, červenou barvou jsou vyznačeni jedinci s neodpovídající paternitou, modrou barvou je označen potomek jedince s neodpovídající paternitou

Č.	Pohlaví	Rodina	Matka	Otec	SSR-multiplex I								SSR-multiplex II								Počet heteroz. lokusů
					FH2004		FH2010		FH3210		FH3241		C38		FH2361		FH4012		REN214L11		
					alela 1	alela 2	alela 1	alela 2	alela 1	alela 2	alela 1	alela 2	alela 1	alela 2	alela 1	alela 2	alela 1	alela 2	alela 1	alela 2	
332	P				168	226	149	149	255	271	251	259	153	169	248	252	117	117	152	152	5
337	P				168	230	153	161	255	271	263	263	141	145	252	333	133	133	148	152	6
345	P				168	168	153	161	239	239	251	263	145	165	248	252	117	117	148	152	6
348	P				168	168	149	161	271	306	263	263	135	153	248	329	117	117	148	156	5
350	P				168	168	153	161	271	283	255	263	145	165	248	325	117	129	148	152	7
352	P				168	168	149	161	255	294	259	263	145	145	239	239	117	133	148	148	4
353	P				168	226	149	157	255	271	259	263	145	169	239	252	133	138	152	152	7
354	P				168	168	153	161	255	306	263	263	141	141	312	329	117	133	152	152	4
370	P				168	226	153	161	239	239	259	263	135	141	304	321	117	129	148	152	7
371	P				168	226	149	161	255	271	263	263	141	165	239	248	117	117	152	152	5
386	P				168	168	149	149	239	255	251	263	169	169	252	325	133	133	148	148	3
392	P				175	226	149	153	255	271	251	263	145	169	252	325	133	138	148	152	8
393	P				168	226	149	149	271	271	263	263	141	141	239	329	117	117	148	148	2
402	P				168	168	149	153	271	290	255	263	145	165	239	252	114	117	148	152	7
408	P				168	175	149	161	239	255	255	259	141	169	243	325	117	117	148	156	7
411	P				168	230	153	157	255	290	255	263	145	145	248	325	133	138	148	148	6
424	P				168	168	153	161	239	271	251	251	135	141	304	321	117	129	152	152	5
441	P				168	226	149	153	271	298	263	263	145	145	243	312	117	117	152	152	4
443	P				168	230	153	161	239	255	263	263	145	153	312	329	133	133	152	152	5
445	P				168	230	153	157	255	255	263	263	141	145	252	329	133	133	148	152	5
454	P				168	168	153	157	271	290	251	251	135	135	239	321	117	138	152	152	4

Tabulka 10: Genetická příbuznost hodnocených jedinců a detekované alely SSR lokusů – 18. část, červenou barvou jsou vyznačeni jedinci s neodpovídající paternitou, modrou barvou je označen potomek jedince s neodpovídající paternitou

Č.	Pohlaví	Rodina	Matka	Otec	SSR-multiplex I								SSR-multiplex II								Počet heteroz. lokusů
					FH2004		FH2010		FH3210		FH3241		C38		FH2361		FH4012		REN214L11		
					alela 1	alela 2	alela 1	alela 2	alela 1	alela 2	alela 1	alela 2	alela 1	alela 2	alela 1	alela 2	alela 1	alela 2	alela 1	alela 2	
455	P				168	168	153	161	255	271	263	263	145	169	239	256	117	117	148	148	4
457	P				168	168	153	161	239	271	259	263	135	141	239	316	117	129	152	152	6
462	P				171	175	157	161	271	271	259	263	141	145	248	248	133	133	148	152	5
470	P				168	230	153	153	255	271	263	263	153	169	239	248	117	117	148	152	5
480	P				168	230	157	161	283	290	251	263	141	145	243	308	117	117	148	148	6
486	P				168	226	153	161	255	271	251	263	141	165	239	239	117	117	148	152	6
490	P				168	168	153	157	255	271	255	263	165	169	248	321	117	133	148	152	7

5.1.4. Bioinformatické a populačně genetické vyhodnocení variability mikrosatelitních lokusů populace československého vlčáka

Alelické frekvence uvedené v tabulce 10 byly zpracovány pomocí programu CERVUS 3.0.3 (Kalinowski et al. 2007). Výsledky tohoto hodnocení jsou uvedeny v tabulce 11. Protože v diskuzi získané výsledky jsou porovnány s van Asch et al. (2009) uvádím hned v následující tabulce parametry populace plemene Cão de Gado Transmontano, které bylo shodnými mikrosatelitními markery hodnoceno autorským kolektivem van Asch et al. (2009).

Tabulka 11: Populační parametry mikrosatelitních lokusů u plemene československý vlčák získané při řešení diplomové práce

Lokus	Počet alel	H _O	H _E	PIC
FH3210	13	0,7820	0.770	0.743
FH3241	5	0,6560	0.605	0.563
FH2004	6	0,6620	0.650	0.598
REN214L11	3	0,5920	0.532	0.421
FH4012	5	0,5810	0.551	0.480
FH2010	5	0,7600	0.715	0.664
FH2361	15	0,8300	0.826	0.807
C38	11	0,7650	0.755	0.716

Tabulka 12: Populační parametry mikrosatelitních lokusů u plemene Cão de Gado Transmontano publikované van Asch et al. (2009)

Lokus	Počet alel	H _O	H _E
FH3210	20	0,8304	0,8780
FH3241	5	0,6549	0,6634
FH2004	13	0,7611	0,8183
REN214L11	3	0,4956	0,5648
FH4012	6	0,7080	0,7658
FH2010	4	0,6637	0,6543
FH2361	23	0,8393	0,8795
C38	19	0,9027	0,9050

Z tabulky 11 vyplývá, že u plemen československý vlčák byly hodnoty heterozygotností H_O a H_E pro všechny hodnocené lokusy velice podobné. Programem CERVUS 3.0.3 (Kalinowski et al. 2007) bylo následně potvrzeno, že distribuce alel všech osmi hodnocených mikrosatelitních lokusů odpovídá distribuci alel při platnosti

Hardy-Weinbergova zákona. Získané výsledky budou dále diskutovány v kapitole 6 Diskuze, kde budou porovnávány se závěry van Asch et al. (2009), kteří pro hodnocení polymorfismu genomu psa použili zcela shodné markery. Z tabulky 11 rovněž vyplývá, že nejvyšší PIC dosáhl lokus FH2361 (0,807), u kterého byl detekován současně nejvyšší počet alel. Tento lokus je z hlediska potenciálních informací o variabilitě nejvhodnější pro testování polymorfismu. Naopak hodnota PIC lokusu REN214L11 byla nejnižší (0,421). Tento lokus současně vykazoval nejmenší počet detekovaných alel.

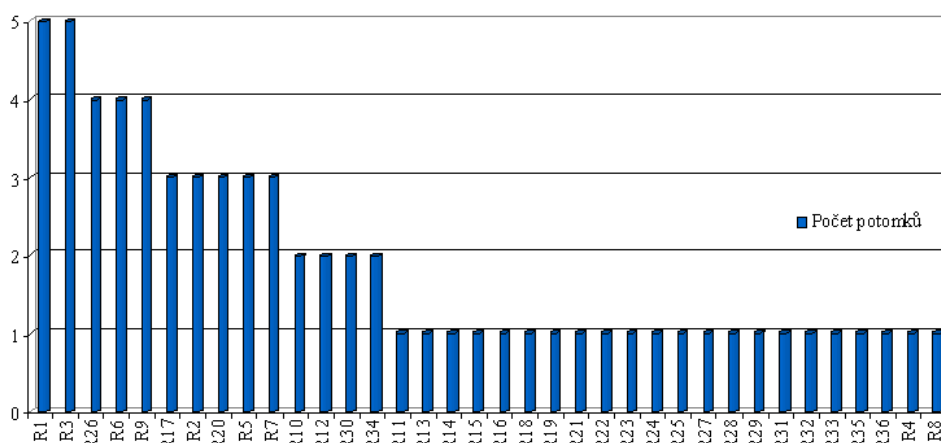
5.2. Vyhodnocení paternity

5.2.1. Vyhodnocení paternity v úplných rodinách

Z tabulky 10 vyplývá rovněž zařazení hodnocených jedinců plemene československý vlčák do rodin. Termín rodina v diplomové práci představuje takovou situaci, kdy hodnocenému jedinci byli k dispozici rovněž DNA vzorky jeho obou rodičů. Pomocí mikrosatelitních markerů byli tudíž hodnoceni rodiče i se svými potomky.

Z grafu 1 vyplývá, že nejvyšší počet potomků u dvou kompletních rodin byl 5 a naopak nejnižší počet potomků byl 1. Zároveň z grafu 1 vyplývá, že nejběžnější úplnou rodinou byla taková situace, kdy u rodičovského páru byl hodnocen pouze jeden jejich potomek. Rodin s jediným potomkem bylo analyzováno celkem 21.

Graf 1: Počty potomků v hodnocených úplných rodinách plemene československý vlčák.

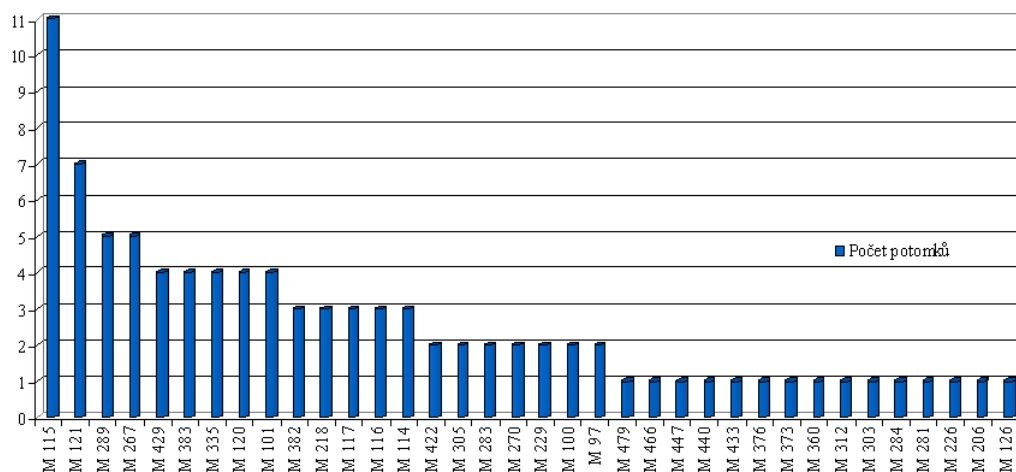


5.2.2. Vyhodnocení paternity v neúplných rodinách

Z tabulky 10 vyplývá rovněž zařazení hodnocených jedinců plemene československý vlčák do neúplných rodin, což znamená, že u některých jedinců v modelové populaci byly k dispozici pouze vzorky DNA jednoho z jejich rodičů. Z pohledu genetiky se jednalo o skupiny sourozenců a polosourozenců. Mikrosatelitní markery byly tudíž použity jak na potomky, tak na jednoho rodiče – matku nebo otce.

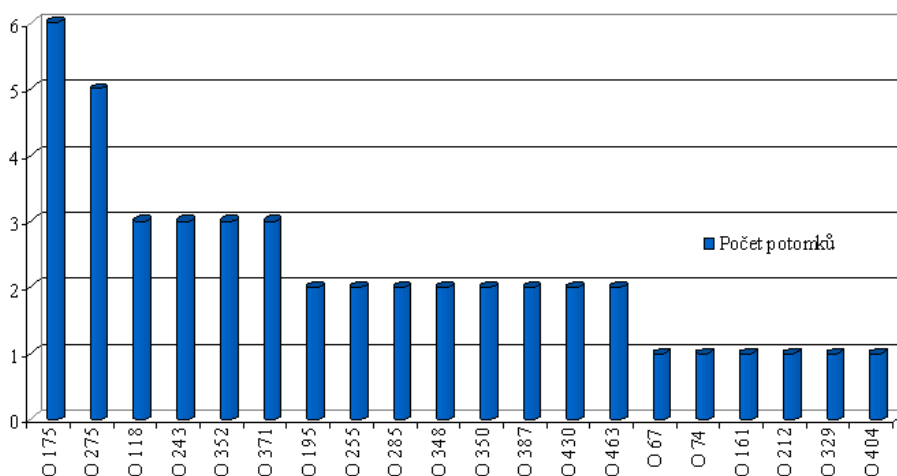
Z grafu 2 vyplývá, že nejvyšší počet polosourozenců po společných matkách bylo 11 a naopak nejnižší počet potomků byl 1. Z grafu 2 zároveň vyplývá, že nejběžnější neúplnou rodinou se společnými matkami byla taková situace, kdy u matek byl hodnocen pouze jeden jejich potomek. Matek s jediným potomkem bylo analyzováno celkem 15.

Graf 2: Počty potomků v hodnocených neúplných rodinách plemene československý vlčák po společných matkách.



Z grafu 3 vyplývá, že nejvyšší počet polosourozenců po společných otcích byl 6 a naopak nejnižší počet potomků byl 1. Z grafu 3 současně vyplývá, že nejběžnější neúplnou rodinou se společnými otci byla taková situace, kdy u otců byli hodnoceni dva jejich potomci. Otců se dvěma potomky bylo analyzováno celkem 8.

Graf 3: Počty potomků v hodnocených neúplných rodinách plemene československý vlčák po společných otcích.



5.2.3. Vyhodnocení konkrétních případů nepotvrzené paternity

Během řešení diplomové práce bylo zjištěno několik jedinců, u kterých výsledky molekulární analýzy nepotvrdily předpokládanou paternitu podle rodokmenů těchto zvířat. Vzhledem k tomu, že tato zvířata s nepotvrzenou paternitou v některých případech byla propojena pomocí rodokmenů, byla tato problematika rozdělena do 3 nezávislých případů.

Případ 1

Psi 404 a 414 jsou dle rodokmene sourozenci z jednoho vrhu. Jejich předpokládaným otcem je pes 387, který má odpovídající paternitu. Mikrosatelitní analýzou bylo prokázáno, že tento pes nemůže být jejich otcem. Tato hypotéza byla potvrzena nesouladem alel v lokusech FH2004, FH2010 a FH3210 u psa 404 a v lokusech FH2004, FH2010 a C38 u psa 414. Pes 414 byl teoreticky zařazen do plemenitby a s fenou 412 měl zplodit potomka – psa 461 (rodina 36). Mikrosatelitní analýzou však bylo potvrzeno, že skutečnými rodiči psa 461 nemůže být ani pes 414 a ani fena 412. Alelické neshody mezi psem 461 a jeho potenciálním otcem – psem 414 se týkaly lokusů FH3210 a REN214L11. Alelické neshody mezi psem 461 a jeho potenciální matkou – fenou 412 se vyskytly v lokusech FH3241 a FH2361. Pes 404 je podle rodokmenu otcem feny 68. Tento výsledek byl jednoznačně potvrzen rovněž pomocí mikrosatelitní analýzy. Fenu 68 však bylo nutno vyřadit z následujících

populačně genetických analýz, protože její otec – pes 404 neměl potvrzenou paternitu pomocí SSR markerů.

Případ 2

Fena 140, náležící do rodiny 3, by měla být podle rodokmenu dcerou psa 67 a feny 111. Mikrosatelitní analýzou bylo prokázáno, že tato fena nemůže být teoreticky její matkou. Tato hypotéza byla potvrzena nesouladem alel v lokusu FH2361. Příčiny tohoto nesouladu budou diskutovány v další části diplomové práce.

Případ 3

Fena 230 by měla být podle rodokmenu dcerou feny 229. Mikrosatelitní analýzou bylo prokázáno, že tato fena teoreticky nemůže být její matkou. Tato hypotéza byla potvrzena nesouladem alel v lokusu FH2004. V diskuzi diplomové práce se pokusím objasnit příčiny tohoto nesouladu.

5.3. Posouzení variability vybraných šlechtitelsky významných parametrů

5.3.1. Výsledky testování normality rozdělení a transformace dat

Šlechtitelsky významné parametry (podíl krve vlka, F_{x5} , F_{x8} , AVK5, AVK8) byly vyhodnoceny s cílem porovnat jejich variabilitu s variabilitou alel mikrosatelitních lokusů. U těchto dat byla provedena deskriptivní statistika a vyhodnocení, zda data svou distribucí odpovídají normálnímu rozdělení. Statistická analýza byla provedena pomocí programu STATISTICA 9.1. (StatSoft). Normalita rozdělení byla posuzována na základě parametrů špičatosti a šikmosti. V případě normálního rozdělení se hodnota špičatosti musí blížit 0 a hodnota šikmosti se musí blížit 3. Výsledky této analýzy jsou prezentovány v tabulkách 13, 14 a 15, ze kterých vyplývá, že ani u jednoho znaku se oba dva testované parametry (špičatost a šikmost) požadované hodnotě neblížily. Z tohoto hodnocení vyplývá, že ani jeden ze šlechtitelsky důležitých parametrů neodpovídal normálnímu rozdělení.

Tabulka 13: Deskriptivní statistika hodnot podíl krve vlka, F_x5, F_x8, AVK5 a AVK8 u celé hodnocené populace

Kategorie	Popisné statistiky											
	Počet jedinců	Dolní kvartil	Horní kvartil	Směr. odchylka	Šikmost	Špičatost	Průměr	Medián	Modus	Četnost modu	Minimum	Maximum
Krev vlka	358	27,4502	29,1713	1,3554	0,16493	0,794903	28,3175	28,2224	27,8	6	22,9492	32,1434
F_x5	358	3,748	10,1562	5,7550	1,39851	1,745668	7,73393	6,21255	0,79	6	0,6412	28,0976
F_x8	358	17,1006	22,269	5,1581	2,11477	6,655313	20,3459	18,9309	13,3	6	12,864	48,1754
AVK5	358	75,8065	90,3226	10,8552	-1,41975	3,709125	82,6535	85,4839	90,3	34	21,9355	98,3871
AVK8	358	26,0784	30,1961	3,4504	0,72902	2,668003	28,4171	28,2353	28,2	17	19,6078	47,451

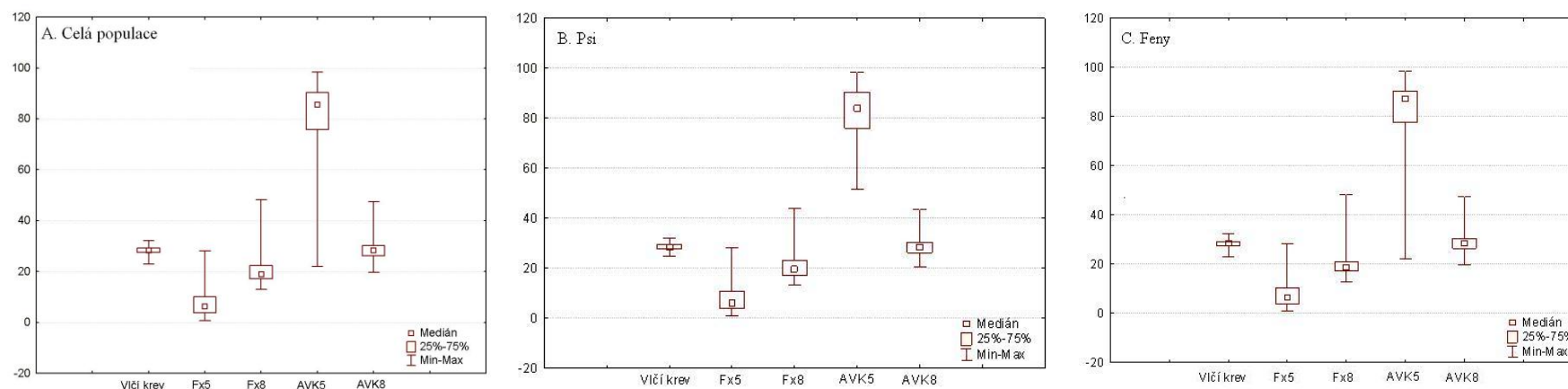
Tabulka 14: Deskriptivní statistika hodnot podíl krve vlka, F_x5, F_x8, AVK5 a AVK8 u psů

Kategorie	Popisné statistiky											
	Počet jedinců	Dolní kvartil	Horní kvartil	Směr. odchylka	Šikmost	Špičatost	Průměr	Medián	Modus	Četnost modu	Minimum	Maximum
Krev vlka	173	27,4958	29,2459	1,39416	0,31078	0,300072	28,3981	28,2224	28,5898	4	24,5514	32,0191
F_x5	173	3,7737	10,572	6,14145	1,247244	0,975804	8,03879	6,136	4,0804	4	0,7855	27,987
F_x8	173	17,1491	22,9864	5,30478	1,50561	2,866915	20,7333	19,3411	19,6058	4	13,0934	43,7559
AVK5	173	75,8065	90,3226	10,0466	-0,71233	0,200812	82,2988	83,871	87,0968	15	51,6129	98,3871
AVK8	173	26,0784	30,1961	3,35802	0,671912	1,477454	28,3407	28,2353	Vícenás.	9	20,5882	43,3333

Tabulka 15: Deskriptivní statistika hodnot podíl krve vlka, F_x5, F_x8, AVK5 a AVK8 u fen

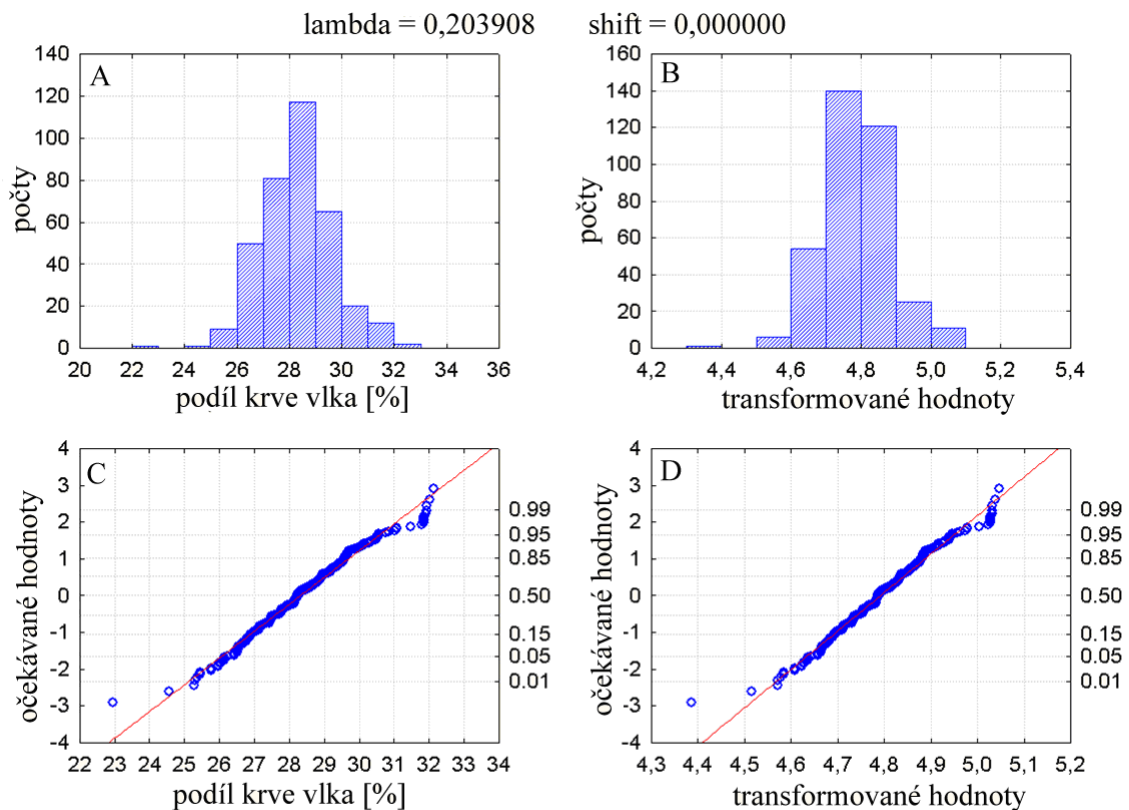
Kategorie	Popisné statistiky											
	Počet jedinců	Dolní kvartil	Horní kvartil	Směr. odchylka	Šikmost	Špičatost	Průměr	Medián	Modus	Četnost modu	Minimum	Maximum
Krev vlka	185	27,4204	29,1077	1,31741	-0,01448	1,33086	28,24209	28,2224	Vícenás.	3	22,9492	32,1434
F_x5	185	3,6946	10,0926	5,36961	1,56554	2,82244	7,44884	6,2538	Vícenás.	3	0,6412	28,0976
F_x8	185	17,0632	20,8901	5,00428	2,81459	11,74811	19,98361	18,626	13,2846	4	12,864	48,1754
AVK5	185	77,4194	90,3226	11,57782	-1,8691	5,64315	82,98518	87,0968	90,3226	22	21,9355	98,3871
AVK8	185	26,2745	30,3921	3,54228	0,77327	3,61933	28,48862	28,2353	28,2353	8	19,6078	47,451

Graf 4: Krabicové grafy vyjadřující variabilitu podílu krve vlka, F_x5, F_x8, AVK5 a AVK8 v celé populaci, u psů a u fen

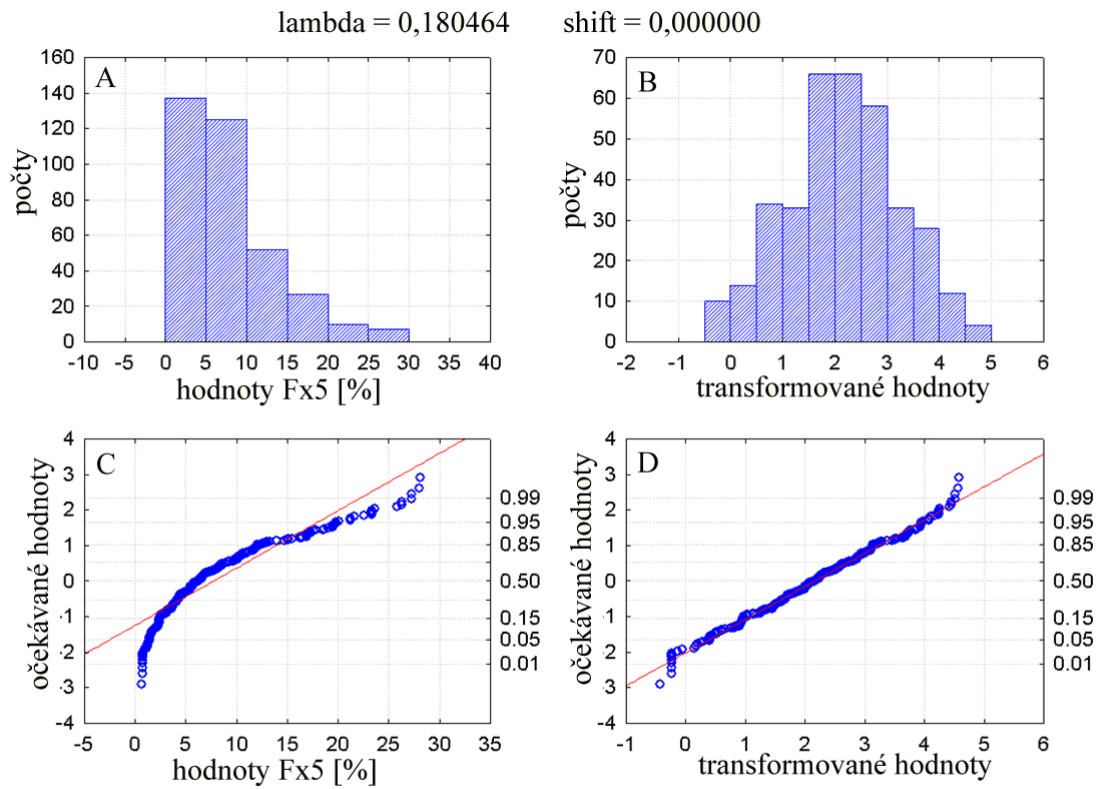


Z důvodů neshody distribuce vstupních dat s normálním rozdělením byla pomocí programu STATISTICA 9.1. (StatSoft) provedena Cox-Boxova transformace. Rozdíly mezi rozdělením netransformovaných a transformovaných dat jsou patrné rovněž z grafů 5 – 9. Histogram netransformovaných dat je označen písmenem A, transformovaných dat písmenem B. Q-Q graf netransformovaných dat je označen písmenem C, transformovaných dat písmenem D. Z histogramů i Q-Q grafu vyplývá, že transformace u všech parametrů výrazně přiblížila rozdělení dat normálnímu rozdělení.
..

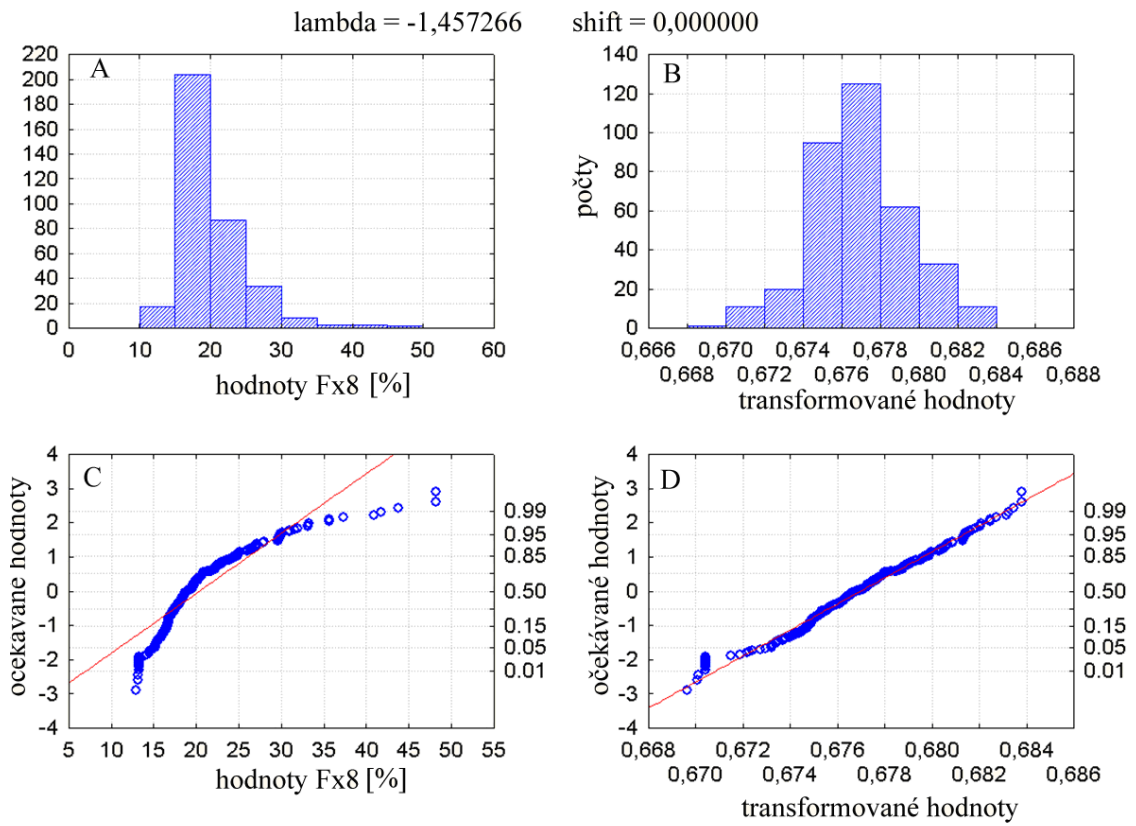
Graf 5: Histogramy a Q-Q grafy původních a transformovaných hodnot podílu krve vlka v plemeni československý vlčák



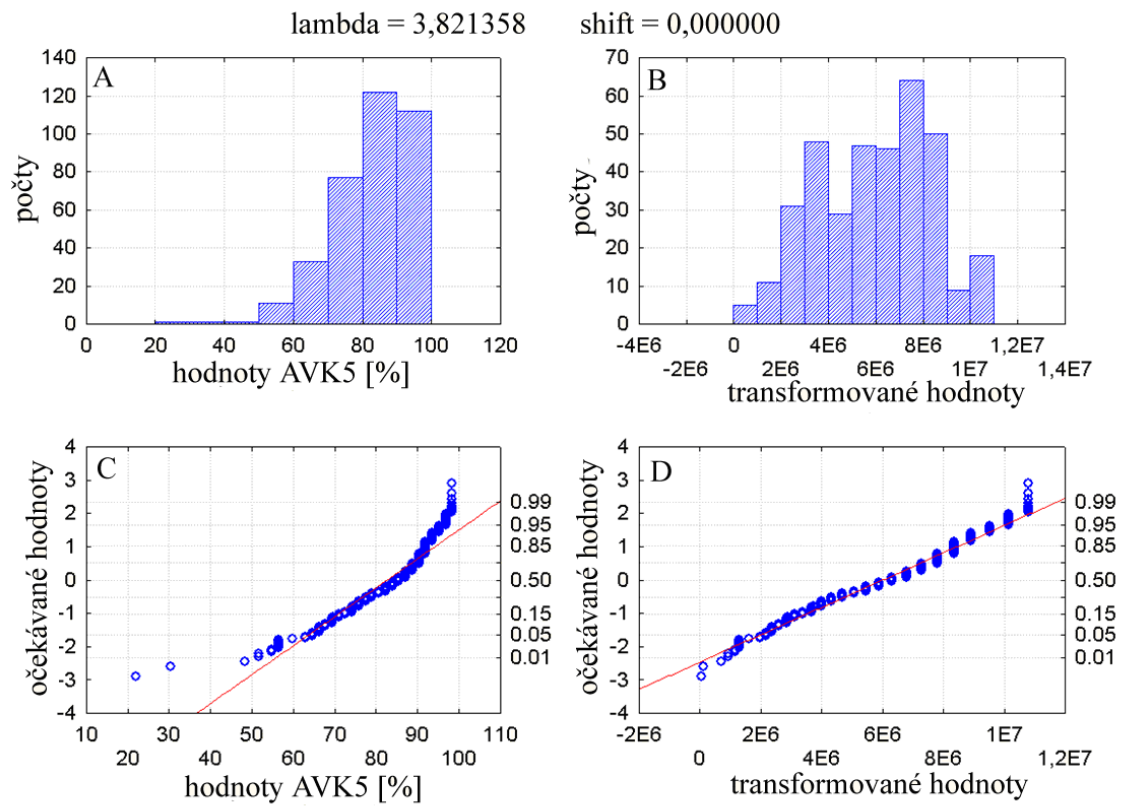
Graf 6: Histogramy a Q-Q grafy původních a transformovaných hodnot F_{x5} u plemene československý vlčák



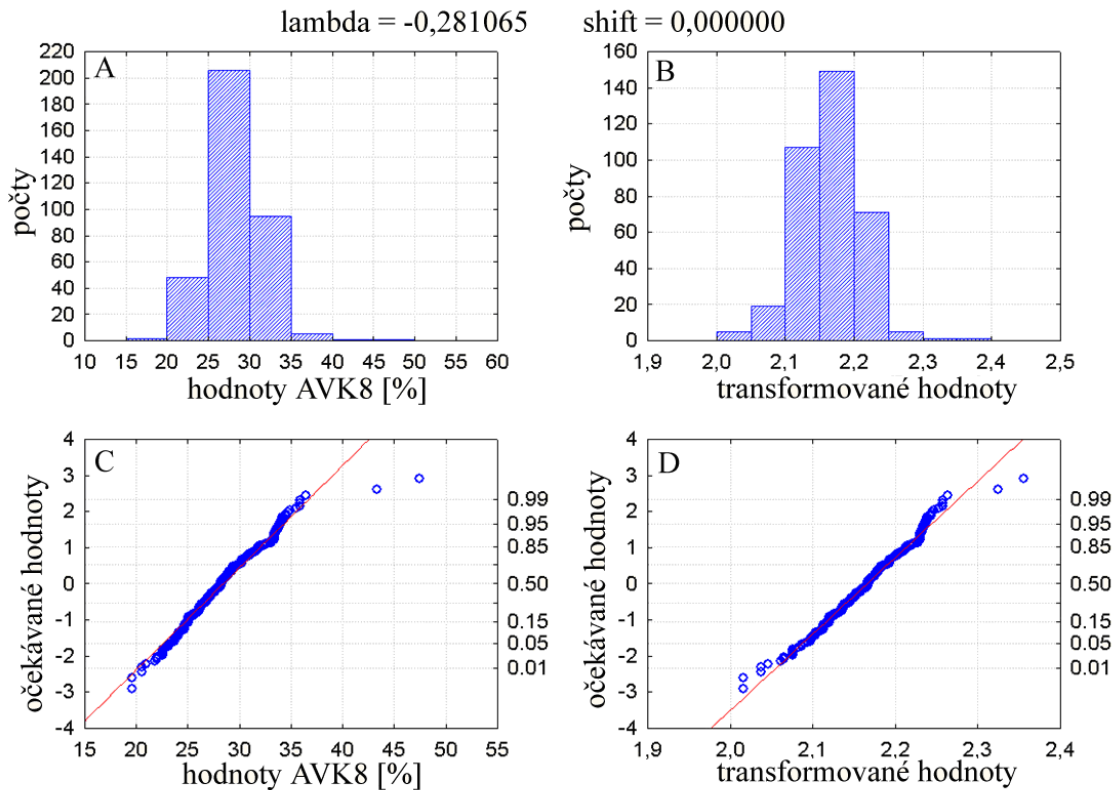
Graf 7: Histogramy a Q-Q grafy původních a transformovaných hodnot F_{x8} u plemene československý vliček



Graf 8: Histogramy a Q-Q grafy původních a transformovaných hodnot AVK5 u plemene československý vlčák



Graf 9: Histogramy a Q-Q grafy původních a transformovaných hodnot AVK8 u plemene československý vlčák



5.3.2. Rozdělení populace do skupin vytvořených na základě úrovní hodnocených parametrů

Vzhledem k tomu, že transformovaná data odpovídala normálnímu rozdělení, byla na základě směrodatných odchylek a aritmetických průměrů transformovaných dat vytvořeny u hodnocených parametrů podíl krve vlka, F_{x5} , F_{x8} , AVK5 a AVK8 vždy 3 skupiny (A, B, C). Rozsahy hodnot těchto skupin jsou popsány v metodické části práce. Do skupiny A byli zařazeni na základě transformovaných dat jedinci s nízkými hodnotami, do skupiny B s průměrnými hodnotami a do skupiny C s vysokými hodnotami parametrů. Zařazení jedinců do těchto skupin je barevně vyznačené v následujících tabulkách: Jedinci zařazení do skupiny A jsou označeni žlutě, do skupiny B zeleně a do skupiny C modře.

Tabulka 16: Původní a Box-Coxovy transformované hodnoty parametrů F_x , AVK a podílu krve vlka v hodnocené populaci - 1.část

Jedinec	Pohlaví	Parametr									
		F_x 5 [%]		F_x 8 [%]		AVK5 [%]		AVK8 [%]		Podíl krve vlka [%]	
		původní	trans.	původní	trans.	původní	trans.	původní	trans.	původní	trans.
1	pes	4,5232	1,73475	22,2662	0,67877	87,0968	6779939	30,1961	2,19259	29,2459	4,85714
9	fena	2,4023	0,94954	16,3918	0,67458	91,9355	8335953	28,6275	2,17196	28,0424	4,77386
10	pes	3,8048	1,51115	16,0371	0,6742	87,0968	6779939	28,4313	2,16928	26,787	4,68389
11	fena	10,1453	2,87663	27,9028	0,68086	77,4194	4322690	22,549	2,0758	30,1009	4,91466
12	fena	10,1453	2,87663	27,9028	0,68086	77,4194	4322690	22,549	2,0758	30,1009	4,91466
13	pes	12,5418	3,20502	27,1305	0,68064	75,8065	3988541	28,0392	2,16385	29,0647	4,84478
62	fena	10,2333	2,88976	27,123	0,68064	79,0323	4677068	28,9314	2,17607	29,3846	4,86656
63	fena	5,2085	1,92236	18,84	0,67672	95,1613	9510168	33,1373	2,22779	28,2917	4,79134
64	pes	5,7014	2,04515	18,4723	0,67644	77,4194	4322690	24,902	2,11658	27,7126	4,75054
65	fena	5,7459	2,0558	21,3165	0,67828	87,0968	6779939	27,6471	2,15832	28,7188	4,82101
66	pes	11,8786	3,11969	24,8451	0,67987	79,0323	4677068	25,4902	2,126	28,3174	4,79313
67	pes	7,4652	2,42329	24,1031	0,67959	87,0968	6779939	28,2353	2,16658	30,0129	4,9088
69	fena	26,2852	4,4545	48,1754	0,68381	56,4516	1292900	19,6078	2,01642	31,8368	5,02756
70	fena	25,8444	4,42404	31,8615	0,68181	48,3871	717361	32,3529	2,21881	31,4697	5,0041
71	pes	8,3202	2,58068	22,9864	0,67911	82,2581	5449619	28,4314	2,16928	29,6185	4,88237
72	pes	19,4736	3,92781	29,6784	0,68132	67,7419	2595041	24,5098	2,11013	30,4878	4,94027
73	fena	6,2538	2,17282	22,2247	0,67875	88,7097	7272401	28,4314	2,16928	29,4475	4,87082
74	pes	15,4661	3,54216	18,7858	0,67668	62,9032	1955038	43,3333	2,3244	28,1555	4,7818
77	fena	2,3809	0,93907	18,333	0,67633	96,7742	10141009	33,3333	2,23	28,5804	4,81143
79	fena	3,1585	1,27815	16,5873	0,67478	93,5484	8908784	27,8431	2,1611	27,5677	4,74022
80	pes	1,6341	0,51351	16,6904	0,67488	91,9355	8335953	29,6078	2,18502	27,1481	4,71011

Tabulka 16: Původní a Box-Coxovy transformované hodnoty parametrů F_x , AVK a podílu krve vlka v hodnocené populaci - 2.část

Jedinec	Pohlaví	Parametr									
		F_x 5 [%]		F_x 8 [%]		AVK5 [%]		AVK8 [%]		Podíl krve vlka [%]	
		původní	trans.	původní	trans.	původní	trans.	původní	trans.	původní	trans.
82	pes	17,5822	3,75482	24,4153	0,67971	74,1935	3673841	25,098	2,11975	27,9037	4,76408
84	fena	5,2085	1,92236	18,84	0,67672	95,1613	9510168	33,3333	2,23	28,2917	4,79134
85	pes	11,8786	3,11969	24,8451	0,67987	79,0323	4677068	25,6863	2,12908	28,3174	4,79313
87	pes	5,2085	1,92236	18,84	0,67672	95,1613	9510168	33,3333	2,23	28,2917	4,79134
88	pes	18,5672	3,84672	29,556	0,6813	75,8065	3988541	24,3137	2,10686	29,9355	4,90364
89	pes	22,5266	4,17998	31,5345	0,68174	69,3548	2839195	25,2941	2,12289	30,8334	4,96292
90	pes	4,2605	1,65661	17,5997	0,67572	87,0968	6779939	29,2157	2,17986	27,424	4,72995
91	pes	6,369	2,19827	19,1926	0,67697	91,9355	8335953	29,0196	2,17725	28,3283	4,79389
92	fena	9,8809	2,83661	22,5018	0,67889	74,1935	3673841	34,1176	2,23865	30,5603	4,94504
93	pes	6,7304	2,27574	19,0379	0,67686	80,6452	5052449	25,8824	2,13213	26,6363	4,67287
94	fena	6,3713	2,19878	17,7505	0,67585	21,9355	34897	26,6667	2,14405	25,9655	4,62319
95	pes	10,1747	2,88103	15,433	0,67351	75,8064	3988521	33,5294	2,23218	24,5514	4,51502
96	pes	27,2128	4,51725	33,0908	0,68204	51,6129	918005	35,8823	2,25722	31,8542	5,02867
97	pes	9,9864	2,85269	17,5398	0,67567	72,5806	3377881	25,2941	2,12289	27,2537	4,71772
99	pes	16,9489	3,69348	29,9043	0,68138	67,7419	2595041	33,9215	2,23651	31,9221	5,03298
100	fena	10,1562	2,87827	16,7782	0,67497	75,8065	3988541	34,098	2,23844	28,4515	4,80248
101	fena	5,435	1,97992	18,84	0,67672	93,5483	8908748	25,8823	2,13213	29,2709	4,85884
103	fena	8,3292	2,58227	18,2574	0,67627	69,3548	2839195	24,3137	2,10686	28,9173	4,83467
104	pes	4,5076	1,73021	16,6892	0,67488	88,7097	7272401	27,0588	2,14984	27,4681	4,73311
105	fena	1,7519	0,59005	17,4434	0,67559	88,7097	7272401	26,0784	2,13515	29,5743	4,87939
106	pes	11,294	3,04116	24,8231	0,67987	74,1935	3673841	23,1372	2,08649	28,1467	4,78119

Tabulka 16: Původní a Box-Coxovy transformované hodnoty parametrů F_x , AVK a podílu krve vlka v hodnocené populaci - 3.část

Jedinec	Pohlaví	Parametr									
		F_x 5 [%]		F_x 8 [%]		AVK5 [%]		AVK8 [%]		Podíl krve vlka [%]	
		původní	trans.	původní	trans.	původní	trans.	původní	trans.	původní	trans.
107	fena	23,3377	4,24224	35,5815	0,68246	66,129	2366749	21,9607	2,06475	30,4787	4,93967
109	fena	10,1222	2,87317	21,7364	0,67851	79,0323	4677068	31,7647	2,21188	28,8406	4,8294
110	fena	2,3809	0,93907	18,4074	0,67639	96,7742	10141009	33,3333	2,23	28,5804	4,81143
111	fena	5,4587	1,98583	15,183	0,6732	88,7097	7272401	31,5686	2,20954	26,432	4,65784
112	fena	2,3253	0,91149	17,4136	0,67556	96,7742	10141009	28,6274	2,17196	27,8191	4,75809
113	pes	12,0488	3,14195	24,9164	0,6799	74,1935	3673841	24,1176	2,10355	28,6552	4,81661
114	fena	12,6943	3,22412	12,864	0,66964	79,0323	4677068	28,2353	2,16658	26,9493	4,69571
115	fena	10,5098	2,93043	16,7113	0,6749	69,3548	2839195	25,098	2,11975	26,1414	4,63631
116	fena	11,8429	3,11498	18,1483	0,67618	69,3548	2839195	34,1176	2,23865	27,5116	4,73622
117	fena	6,8868	2,30822	16,2656	0,67445	83,8709	5869354	33,3333	2,23	27,1484	4,71013
118	pes	7,9047	2,50594	18,3218	0,67632	85,4839	6312545	26,4706	2,14111	28,046	4,77411
119	pes	9,8809	2,83661	22,5018	0,67889	74,1935	3673841	33,9216	2,23651	30,5603	4,94504
120	fena	6,2815	2,17897	18,4511	0,67642	85,4839	6312545	26,0784	2,13515	28,2211	4,7864
121	fena	5,4587	1,98583	15,183	0,6732	88,7097	7272401	31,7647	2,21188	26,432	4,65784
122	pes	8,6144	2,63177	20,8901	0,67805	83,871	5869380	28,2353	2,16658	27,7788	4,75524
124	pes	4,8621	1,83024	18,2686	0,67628	90,3226	7790784	30	2,19009	27,444	4,73138
125	fena	4,8621	1,83024	18,2925	0,6763	90,3226	7790784	30	2,19009	27,444	4,73138
126	fena	10,5098	2,93043	16,7305	0,67492	69,3548	2839195	25,098	2,11975	26,1414	4,63631
127	fena	1,3246	0,28836	15,183	0,6732	95,1613	9510168	30,3921	2,19507	26,9523	4,69593
128	fena	5,8091	2,07081	20,6469	0,67791	82,2581	5449619	25,098	2,11975	29,1664	4,85172
129	pes	5,8091	2,07081	20,6469	0,67791	82,2581	5449619	25,098	2,11975	29,1664	4,85172

Tabulka 16: Původní a Box-Coxovy transformované hodnoty parametrů F_x , AVK a podílu krve vlka v hodnocené populaci - 4.část

Jedinec	Pohlaví	Parametr									
		F_x 5 [%]		F_x 8 [%]		AVK5 [%]		AVK8 [%]		Podíl krve vlka [%]	
		původní	trans.	původní	trans.	původní	trans.	původní	trans.	původní	trans.
130	fena	5,8091	2,07081	20,6469	0,67791	82,2581	5449619	25,098	2,11975	29,1664	4,85172
131	fena	4,4277	1,70678	19,6013	0,67725	87,0968	6779939	28,8235	2,17462	29,5879	4,88031
132	fena	4,4277	1,70678	19,6013	0,67725	87,0968	6779939	28,8235	2,17462	29,5879	4,88031
133	fena	4,4277	1,70678	19,6013	0,67725	87,0968	6779939	28,8235	2,17462	29,5879	4,88031
134	fena	4,3633	1,68764	19,888	0,67744	90,3226	7790784	26,8627	2,14695	29,216	4,8551
135	fena	4,3633	1,68764	19,888	0,67744	90,3226	7790784	26,8627	2,14695	29,216	4,8551
136	fena	4,3633	1,68764	19,888	0,67744	90,3226	7790784	26,8627	2,14695	29,216	4,8551
137	pes	4,3633	1,68764	19,9072	0,67745	90,3226	7790784	26,8627	2,14695	29,216	4,8551
139	pes	3,0998	1,25511	17,1596	0,67533	96,7742	10141009	31,9608	2,21421	28,2224	4,78649
141	fena	3,0998	1,25511	17,1596	0,67533	96,7742	10141009	31,9608	2,21421	28,2224	4,78649
142	pes	3,0998	1,25511	17,1596	0,67533	96,7742	10141009	31,9608	2,21421	28,2224	4,78649
143	fena	3,0998	1,25511	17,2532	0,67542	96,7742	10141009	31,9608	2,21421	28,2224	4,78649
145	fena	2,2967	0,8971	17,4551	0,6756	30,3226	120266	31,9608	2,21421	28,2254	4,7867
146	fena	9,1852	2,72695	22,0294	0,67866	82,2581	5449619	26,6667	2,14405	28,1547	4,78175
147	pes	9,1852	2,72695	22,0294	0,67866	82,2581	5449619	26,6667	2,14405	28,1547	4,78175
150	pes	4,0804	1,60072	19,6058	0,67725	82,2581	5449619	30	2,19009	28,5898	4,81208
151	pes	4,0804	1,60072	19,6058	0,67725	82,2581	5449619	30,1961	2,19259	28,5898	4,81208
152	fena	1,4608	0,39225	16,9084	0,67509	91,9355	8335953	32,9412	2,22557	28,1498	4,7814
153	fena	1,4608	0,39225	16,9084	0,67509	91,9355	8335953	33,1373	2,22779	28,1498	4,7814
154	pes	1,4608	0,39225	16,9084	0,67509	91,9355	8335953	33,1373	2,22779	28,1498	4,7814
155	fena	1,4608	0,39225	16,9084	0,67509	91,9355	8335953	33,1373	2,22779	28,1498	4,7814

Tabulka 16: Původní a Box-Coxovy transformované hodnoty parametrů F_x , AVK a podílu krve vlka v hodnocené populaci - 5.část

Jedinec	Pohlaví	Parametr									
		F_x 5 [%]		F_x 8 [%]		AVK5 [%]		AVK8 [%]		Podíl krve vlka [%]	
		původní	trans.	původní	trans.	původní	trans.	původní	trans.	původní	trans.
156	fena	7,0408	2,33961	18,7011	0,67661	77,4194	4322690	27,4509	2,15552	28,818	4,82785
157	pes	3,8048	1,51115	16,1786	0,67435	87,0968	6779939	28,4314	2,16928	26,787	4,68389
158	pes	2,3775	0,9374	17,493	0,67563	91,9355	8335953	26,0784	2,13515	28,8086	4,8272
159	pes	2,1688	0,83086	16,3026	0,67448	93,5484	8908784	28,4313	2,16928	27,9156	4,76492
160	pes	2,5624	1,02555	17,1414	0,67531	95,1613	9510168	33,7255	2,23436	27,7657	4,75431
161	pes	6,2815	2,17897	18,4723	0,67644	85,4839	6312545	26,0784	2,13515	28,2211	4,7864
162	fena	2,5624	1,02555	17,1414	0,67531	95,1613	9510168	33,7255	2,23436	27,7657	4,75431
163	pes	2,5624	1,02555	17,1491	0,67532	95,1613	9510168	33,7255	2,23436	27,7657	4,75431
164	fena	2,9537	1,19615	17,0598	0,67524	90,3226	7790784	27,2549	2,15269	27,4204	4,72969
165	fena	8,6144	2,63177	20,8901	0,67805	83,871	5869380	28,2353	2,16658	27,7788	4,75524
166	fena	4,2472	1,65255	19,4101	0,67712	90,3226	7790784	27,2549	2,15269	29,4028	4,86779
167	fena	2,4521	0,97362	18,56	0,67651	93,5484	8908784	30,1961	2,19259	28,8154	4,82767
168	pes	5,7014	2,04515	18,4723	0,67644	77,4194	4322690	25,098	2,11975	27,7126	4,75054
170	pes	5,7014	2,04515	18,56	0,67651	77,4194	4322690	25,098	2,11975	27,7126	4,75054
171	fena	5,797	2,06795	16,5387	0,67473	82,2581	5449619	31,3725	2,20718	28,185	4,78387
172	pes	10,3769	2,91099	27,9854	0,68089	74,4194	3716770	25,4901	2,126	29,5228	4,87591
173	pes	2,1612	0,82683	13,1285	0,67013	85,4839	6312545	34,5098	2,24288	26,9634	4,69673
174	fena	6,5499	2,23749	20,0197	0,67752	87,0968	6779939	29,4118	2,18245	27,1482	4,71011
175	pes	17,77	3,77266	24,3424	0,67968	69,6548	2886413	30,9804	2,20239	27,7527	4,75338
176	fena	13,9057	3,36949	20,7955	0,67799	75,8065	3988541	26,8627	2,14695	28,8823	4,83227
177	pes	19,4736	3,92781	29,6784	0,68132	67,7419	2595041	24,5098	2,11013	30,4878	4,94027

Tabulka 16: Původní a Box-Coxovy transformované hodnoty parametrů F_x , AVK a podílu krve vlka v hodnocené populaci - 6.část

Jedinec	Pohlaví	Parametr									
		F_x 5 [%]		F_x 8 [%]		AVK5 [%]		AVK8 [%]		Podíl krve vlka [%]	
		původní	trans.	původní	trans.	původní	trans.	původní	trans.	původní	trans.
178	pes	6,369	2,19827	19,2869	0,67704	91,9355	8335953	29,2157	2,17986	28,3283	4,79389
180	fena	1,1863	0,1735	16,0176	0,67418	87,0968	6779939	31,7647	2,21188	28,8975	4,83331
181	fena	7,5287	2,43548	19,6875	0,67731	72,5806	3377881	27,0588	2,14984	27,1976	4,71368
182	pes	10,2333	2,88976	27,123	0,68064	79,0323	4677068	29,0196	2,17725	29,3846	4,86656
184	pes	12,4047	3,18769	20,5871	0,67787	70,9677	3099906	24,1176	2,10355	29,4273	4,86945
185	pes	6,0008	2,11554	19,3411	0,67707	90,3226	7790784	26,0784	2,13515	27,4958	4,73509
187	fena	8,063	2,53479	19,8797	0,67743	77,4194	4322690	29,0196	2,17725	28,8727	4,83161
189	fena	10,572	2,93945	20,3383	0,67772	75,8065	3988541	22,549	2,0758	26,5434	4,66605
190	pes	10,572	2,93945	20,3383	0,67772	75,8065	3988541	22,549	2,0758	26,5434	4,66605
191	fena	5,7369	2,05365	18,6148	0,67655	90,3226	7790784	25,8824	2,13213	28,8042	4,8269
192	fena	1,6341	0,51351	16,6904	0,67488	91,9355	8335953	30	2,19009	27,148	4,7101
193	fena	2,0413	0,76157	19,1926	0,67697	91,9355	8335953	29,4118	2,18245	29,0717	4,84526
194	pes	2,1688	0,83086	16,3609	0,67455	93,5484	8908784	28,4313	2,16928	27,9156	4,76492
195	pes	9,8525	2,83226	19,6875	0,67731	75,8065	3988541	28,2353	2,16658	31,0737	4,97855
196	pes	1,2851	0,2566	14,8299	0,67275	88,7097	7272401	27,451	2,15552	28,0402	4,7737
198	pes	4,8956	1,83938	20,8244	0,67801	85,4839	6312545	25,4902	2,126	28,1647	4,78245
200	pes	6,3713	2,19878	17,793	0,67589	91,9354	8335918	26,8627	2,14695	25,965	4,62315
201	fena	3,6391	1,45471	17,7435	0,67585	93,5484	8908784	29,0196	2,17725	26,9905	4,6987
202	fena	5,4605	1,98627	20,3315	0,67772	88,7097	7272401	28,8235	2,17462	28,1866	4,78398
203	pes	6,5499	2,23749	20,0233	0,67753	87,0968	6779939	29,6078	2,18502	27,1482	4,71011
205	fena	3,748	1,49204	17,1491	0,67532	88,7097	7272401	33,5294	2,23218	28,2371	4,78752

Tabulka 16: Původní a Box-Coxovy transformované hodnoty parametrů F_x , AVK a podílu krve vlka v hodnocené populaci - 7.část

Jedinec	Pohlaví	Parametr									
		F_x 5 [%]		F_x 8 [%]		AVK5 [%]		AVK8 [%]		Podíl krve vlka [%]	
		původní	trans.	původní	trans.	původní	trans.	původní	trans.	původní	trans.
206	fena	11,8062	3,11014	20,9264	0,67807	77,4193	4322669	28,0391	2,16385	28,8651	4,83109
207	pes	1,1543	0,14537	14,5781	0,67241	96,7742	10141009	31,5686	2,20954	27,5959	4,74223
208	pes	3,748	1,49204	17,1491	0,67532	88,7097	7272401	33,5294	2,23218	28,2371	4,78752
209	fena	3,3583	1,35406	18,0236	0,67608	88,7097	7272401	30,3921	2,19507	27,2308	4,71607
210	fena	3,6946	1,47385	19,9072	0,67745	91,9355	8335953	29,6078	2,18502	28,9152	4,83453
211	pes	5,3273	1,9528	17,1414	0,67531	87,0968	6779939	24,1176	2,10355	26,7605	4,68196
212	pes	10,1562	2,87827	16,8075	0,675	75,8065	3988541	34,1176	2,23865	28,4515	4,80248
213	pes	3,0834	1,2486	16,445	0,67463	91,9355	8335953	29,2157	2,17986	27,2898	4,72032
214	fena	6,5835	2,24468	18,2239	0,67624	90,3226	7790784	27,6471	2,15832	28,6583	4,81682
215	fena	4,6824	1,78031	20,2104	0,67764	87,0968	6779939	27,2549	2,15269	28,3382	4,79459
216	pes	3,3447	1,34901	17,4701	0,67561	90,3226	7790784	28,8235	2,17462	27,185	4,71277
218	fena	10,0926	2,86873	16,5885	0,67478	72,5806	3377881	25,098	2,11975	26,8692	4,68988
219	fena	3,6391	1,45471	17,7435	0,67585	93,5484	8908784	29,0196	2,17725	26,9905	4,6987
223	pes	8,1715	2,55429	22,6565	0,67896	79,0323	4677068	23,7255	2,09684	30,1174	4,91576
226	fena	7,2752	2,38632	18,626	0,67656	90,3226	7790784	24,7059	2,11337	28,2204	4,78635
227	pes	3,5788	1,43365	19,5504	0,67722	90,3226	7790784	28,2353	2,16658	28,7916	4,82603
228	fena	7,6873	2,46554	19,4101	0,67712	83,871	5869380	30,5882	2,19753	26,5295	4,66503
229	fena	3,6391	1,45471	17,7505	0,67585	93,5484	8908784	29,0196	2,17725	26,9905	4,6987
231	fena	3,6612	1,46236	16,5885	0,67478	91,9355	8335953	29,4118	2,18245	27,321	4,72256
232	fena	7,6873	2,46554	19,5086	0,67719	83,871	5869380	30,5882	2,19753	26,5295	4,66503
233	pes	2,7845	1,12481	15,3181	0,67337	93,5484	8908784	31,1765	2,20479	26,1267	4,63522

Tabulka 16: Původní a Box-Coxovy transformované hodnoty parametrů F_x , AVK a podílu krve vlka v hodnocené populaci - 8.část

Jedinec	Pohlaví	Parametr									
		F_x 5 [%]		F_x 8 [%]		AVK5 [%]		AVK8 [%]		Podíl krve vlka [%]	
		původní	trans.	původní	trans.	původní	trans.	původní	trans.	původní	trans.
234	fena	6,6373	2,25612	18,2574	0,67627	91,9355	8335953	27,2549	2,15269	26,4992	4,6628
235	fena	3,0834	1,2486	16,5127	0,6747	91,9355	8335953	29,2157	2,17986	27,2899	4,72033
236	pes	1,5382	0,44779	14,4744	0,67226	95,1613	9510168	32,3529	2,21881	26,6001	4,67021
239	pes	2,7845	1,12481	15,3623	0,67342	93,5484	8908784	31,3725	2,20718	26,1267	4,63522
240	fena	3,4766	1,39727	19,853	0,67742	87,0968	6779939	27,0588	2,14984	30,3124	4,92869
241	pes	6,6355	2,25574	22,5816	0,67892	88,7097	7272401	28,6275	2,17196	29,4273	4,86945
243	pes	5,4694	1,98849	22,269	0,67877	88,7096	7272370	29,4118	2,18245	28,9383	4,83612
244	fena	8,5378	2,61861	25,0358	0,67994	77,4194	4322690	23,9216	2,10021	29,5147	4,87537
245	pes	5,4694	1,98849	22,269	0,67877	88,7096	7272370	29,4118	2,18245	28,9383	4,83612
246	fena	4,9882	1,86438	18,2239	0,67624	88,7097	7272401	27,6471	2,15832	28,288	4,79108
247	pes	4,3136	1,67271	20,2288	0,67765	88,7097	7272401	26,8627	2,14695	29,6471	4,8843
248	pes	3,9312	1,55287	15,5748	0,67368	91,9355	8335953	31,3725	2,20718	27,3422	4,72408
249	fena	6,1713	2,15436	20,5009	0,67782	85,4839	6312545	27,6471	2,15832	27,8446	4,7599
250	pes	3,6946	1,47385	19,9253	0,67746	91,9355	8335953	29,6078	2,18502	28,9152	4,83453
251	pes	3,892	1,54005	19,8797	0,67743	91,9355	8335953	27,2549	2,15269	29,3476	4,86405
252	fena	5,4694	1,98849	22,269	0,67877	88,7096	7272370	29,4118	2,18245	28,9383	4,83612
254	fena	6,6373	2,25612	18,2686	0,67628	91,9355	8335953	27,2549	2,15269	26,4992	4,6628
255	pes	9,6194	2,79616	20,2014	0,67764	77,4194	4322690	29,2157	2,17986	28,1189	4,77923
256	fena	6,7916	2,28852	20,7135	0,67794	88,7097	7272401	28,0392	2,16385	28,1467	4,78119
257	fena	10,0926	2,86873	16,5942	0,67478	72,5806	3377881	25,098	2,11975	26,8692	4,68988
258	fena	7,2752	2,38632	18,626	0,67656	90,3226	7790784	24,7059	2,11337	28,2204	4,78635

Tabulka 16: Původní a Box-Coxovy transformované hodnoty parametrů F_x , AVK a podílu krve vlka v hodnocené populaci - 9.část

Jedinec	Pohlaví	Parametr									
		F_x 5 [%]		F_x 8 [%]		AVK5 [%]		AVK8 [%]		Podíl krve vlka [%]	
		původní	trans.	původní	trans.	původní	trans.	původní	trans.	původní	trans.
259	pes	4,6563	1,77293	16,9084	0,67509	82,2581	5449619	26,2745	2,13815	26,7047	4,67788
260	pes	0,875	-0,1319	13,0934	0,67006	98,3871	10802221	32,549	2,22108	28,1567	4,78189
261	pes	4,4277	1,70678	19,6058	0,67725	87,0968	6779939	28,8235	2,17462	29,5879	4,88031
262	fena	6,5835	2,24468	18,2239	0,67624	90,3226	7790784	27,6471	2,15832	28,6583	4,81682
264	pes	7,2752	2,38632	18,6732	0,67659	90,3225	7790751	24,7059	2,11337	28,2204	4,78635
265	pes	11,7375	3,10103	18,5889	0,67653	74,1935	3673841	31,3725	2,20718	28,3066	4,79238
267	fena	12,7797	3,23473	19,5211	0,6772	66,129	2366749	33,9216	2,23651	29,1077	4,84772
268	fena	16,9489	3,69348	29,9043	0,68138	67,7419	2595041	33,7255	2,23436	31,9221	5,03298
270	fena	5,0696	1,88604	16,0176	0,67418	87,0968	6779939	27,8431	2,1611	26,6521	4,67403
273	fena	2,4521	0,97362	18,56	0,67651	93,5484	8908784	30,1961	2,19259	28,8154	4,82767
274	pes	17,3355	3,73114	30,902	0,68161	69,3548	2839195	28,4314	2,16928	29,7104	4,88855
275	pes	21,6115	4,1075	26,267	0,68037	56,4516	1292900	34,902	2,24705	29,4067	4,86806
276	fena	5,0894	1,89127	18,626	0,67656	88,7096	7272370	25,6863	2,12908	27,7725	4,75479
278	fena	7,9932	2,52213	23,4809	0,67933	80,6452	5052449	23,5294	2,09342	29,4937	4,87395
279	fena	8,206	2,56045	23,9348	0,67952	83,871	5869380	28,8235	2,17462	29,3612	4,86497
280	fena	4,1352	1,61793	19,143	0,67694	85,4839	6312545	27,8431	2,1611	28,2543	4,78872
281	fena	5,5809	2,01596	16,8614	0,67505	85,4839	6312545	27,8431	2,1611	29,4155	4,86866
282	pes	23,3377	4,24224	35,5814	0,68246	66,129	2366749	21,9608	2,06475	30,4787	4,93967
283	fena	8,455	2,60427	13,2846	0,6704	74,1935	3673841	35,8824	2,25722	28,3524	4,79558
284	fena	11,2718	3,03812	20,5018	0,67782	74,1935	3673841	23,9215	2,10021	26,03	4,62801
285	pes	27,987	4,5683	40,9294	0,68316	56,4516	1292900	26,2745	2,13815	31,7787	5,02386

Tabulka 16: Původní a Box-Coxovy transformované hodnoty parametrů F_x , AVK a podílu krve vlka v hodnocené populaci - 10.část

Jedinec	Pohlaví	Parametr									
		F_x 5 [%]		F_x 8 [%]		AVK5 [%]		AVK8 [%]		Podíl krve vlka [%]	
		původní	trans.	původní	trans.	původní	trans.	původní	trans.	původní	trans.
286	pes	9,2065	2,73041	27,1648	0,68065	80,6452	5052449	30,7834	2,19996	30,7447	4,95713
287	pes	20,1125	3,98314	33,2498	0,68207	66,129	2366749	23,7255	2,09684	31,0127	4,97459
289	fena	6,2744	2,1774	17,493	0,67563	85,4839	6312545	27,8432	2,1611	25,2907	4,57217
290	pes	3,6904	1,47241	16,7305	0,67492	90,3226	7790784	30,1961	2,19259	26,5217	4,66445
291	pes	4,1154	1,61174	17,5398	0,67567	90,3226	7790784	30,7843	2,19997	28,4587	4,80298
292	fena	5,6322	2,02845	18,333	0,67633	77,4194	4322690	23,1373	2,08649	27,4185	4,72956
293	fena	4,8391	1,82393	20,6469	0,67791	83,871	5869380	25,8824	2,13213	29,0189	4,84164
294	fena	2,3253	0,91149	17,4136	0,67556	96,7742	10141009	28,6275	2,17196	27,8191	4,75809
295	fena	11,8786	3,11969	26,5801	0,68047	74,1935	3673841	23,9216	2,10021	28,6811	4,8184
296	pes	17,007	3,69919	26,9379	0,68058	69,3548	2839195	25,098	2,11975	27,7176	4,75089
297	fena	3,6904	1,47241	16,7305	0,67492	90,3226	7790784	30,1961	2,19259	26,5217	4,66445
298	fena	16,2643	3,62502	23,3249	0,67926	74,1935	3673841	30,5882	2,19753	30,2994	4,92783
299	fena	13,25	3,29215	15,9286	0,67408	64,5161	2153637	36,4706	2,26315	22,9492	4,38629
301	pes	4,0732	1,59844	18,0672	0,67612	75,8065	3988541	27,6471	2,15832	27,9413	4,76673
302	pes	4,0732	1,59844	18,0872	0,67613	75,8065	3988541	27,6471	2,15832	27,9413	4,76673
303	fena	18,6269	3,85216	26,0677	0,6803	66,129	2366749	25,4902	2,126	30,0461	4,91102
304	fena	4,4635	1,71732	17,0632	0,67524	91,9355	8335953	26,2745	2,13815	27,4703	4,73326
305	fena	8,6511	2,63805	16,5387	0,67473	85,4838	6312516	28,4314	2,16928	25,3601	4,57747
306	pes	6,5835	2,24468	18,2239	0,67624	90,3226	7790784	27,6471	2,15832	28,6583	4,81682
307	fena	4,4635	1,71732	17,0632	0,67524	91,9355	8335953	26,2745	2,13815	27,4703	4,73326
308	fena	4,4635	1,71732	17,1006	0,67527	91,9355	8335953	26,2745	2,13815	27,4703	4,73326

Tabulka 16: Původní a Box-Coxovy transformované hodnoty parametrů F_x , AVK a podílu krve vlka v hodnocené populaci - 11.část

Jedinec	Pohlaví	Parametr									
		F_x 5 [%]		F_x 8 [%]		AVK5 [%]		AVK8 [%]		Podíl krve vlka [%]	
		původní	trans.	původní	trans.	původní	trans.	původní	trans.	původní	trans.
309	fena	9,7316	2,81363	25,0566	0,67995	90,3226	7790784	23,3334	2,08998	29,1847	4,85297
310	fena	5,6149	2,02425	17,4047	0,67555	90,3226	7790784	28,6275	2,17196	28,6293	4,81482
311	pes	3,978	1,56804	18,3165	0,67632	80,6452	5052449	28,2353	2,16658	28,5257	4,80764
312	fena	19,0162	3,88729	26,7001	0,68051	66,129	2366749	26,2745	2,13815	28,1914	4,78432
313	pes	5,8091	2,07081	20,6999	0,67794	82,2581	5449619	25,098	2,11975	29,1664	4,85172
314	fena	12,9628	3,25729	21,5716	0,67842	74,1935	3673841	24,7059	2,11337	28,1959	4,78463
315	pes	2,3775	0,9374	17,5309	0,67566	91,9355	8335953	26,0784	2,13515	28,8086	4,8272
316	pes	9,2874	2,74348	18,4074	0,67639	82,258	5449594	26,8627	2,14695	25,4371	4,58333
317	fena	7,0746	2,34642	20,2288	0,67765	80,6452	5052449	32,7451	2,22334	29,6768	4,88629
318	fena	12,0361	3,1403	22,3752	0,67883	79,0323	4677068	30,7843	2,19997	29,5417	4,87719
319	pes	12,0361	3,1403	22,3752	0,67883	79,0323	4677068	30,9804	2,20239	29,5417	4,87719
320	pes	12,0361	3,1403	22,3752	0,67883	79,0323	4677068	30,9804	2,20239	29,5417	4,87719
321	pes	4,3638	1,68779	16,2656	0,67445	90,3226	7790784	31,5686	2,20954	26,8849	4,69103
322	pes	12,0361	3,1403	22,3752	0,67883	79,0323	4677068	30,9804	2,20239	29,5417	4,87719
323	fena	4,2927	1,66639	15,8802	0,67403	91,9355	8335953	28,0392	2,16385	27,058	4,70359
324	fena	12,0361	3,1403	22,3752	0,67883	79,0323	4677068	30,9804	2,20239	29,5417	4,87719
325	pes	3,748	1,49204	17,1596	0,67533	88,7097	7272401	33,5294	2,23218	28,2371	4,78752
326	pes	10,5399	2,9348	18,702	0,67661	79,0322	4677045	24,7059	2,11337	27,8549	4,76063
327	fena	7,6357	2,45582	19,8369	0,67741	88,7097	7272401	25,2941	2,12289	29,1763	4,8524
328	fena	19,4736	3,92781	29,6784	0,68132	67,7419	2595041	24,5098	2,11013	30,4878	4,94027
329	pes	9,2874	2,74348	18,4511	0,67642	82,258	5449594	26,8627	2,14695	25,4371	4,58333

Tabulka 16: Původní a Box-Coxovy transformované hodnoty parametrů F_x , AVK a podílu krve vlka v hodnocené populaci - 12.část

Jedinec	Pohlaví	Parametr									
		F_x 5 [%]		F_x 8 [%]		AVK5 [%]		AVK8 [%]		Podíl krve vlka [%]	
		původní	trans.	původní	trans.	původní	trans.	původní	trans.	původní	trans.
331	pes	5,2085	1,92236	19,0218	0,67685	95,1613	9510168	33,3333	2,23	28,2917	4,79134
332	pes	3,2337	1,30717	15,975	0,67413	87,0968	6779939	28,2353	2,16658	26,8035	4,6851
333	fena	3,8876	1,53861	15,6043	0,67371	87,0968	6779939	24,7059	2,11337	26,6853	4,67646
334	fena	6,5835	2,24468	18,2362	0,67625	90,3226	7790784	27,6471	2,15832	28,6583	4,81682
335	fena	6,8868	2,30822	16,3026	0,67448	83,8709	5869354	33,5294	2,23218	27,1484	4,71013
336	fena	6,7916	2,28852	20,7332	0,67796	88,7097	7272401	28,0392	2,16385	28,1467	4,78119
337	pes	0,7855	-0,2363	13,2846	0,6704	98,3871	10802221	33,3333	2,23	27,7761	4,75504
338	fena	0,7855	-0,2363	13,2846	0,6704	98,3871	10802221	33,3333	2,23	27,7761	4,75504
339	fena	0,7855	-0,2363	13,2846	0,6704	98,3871	10802221	33,3333	2,23	27,7761	4,75504
340	fena	11,7375	3,10103	18,6018	0,67654	74,1935	3673841	31,3725	2,20718	28,3066	4,79238
341	fena	10,535	2,93409	20,7135	0,67794	82,2581	5449619	30,9804	2,20239	28,1875	4,78405
342	pes	2,3253	0,91149	17,4319	0,67558	96,7742	10141009	28,6275	2,17196	27,8191	4,75809
343	fena	3,2333	1,30702	19,5538	0,67722	93,5484	8908784	26,0784	2,13515	29,1713	4,85206
344	fena	4,3136	1,67271	20,2602	0,67767	88,7097	7272401	26,8627	2,14695	29,6471	4,8843
345	pes	11,5023	3,06952	17,7435	0,67585	70,9677	3099906	25,098	2,11975	26,889	4,69133
346	pes	7,531	2,43592	20,7768	0,67798	72,5806	3377881	23,1373	2,08649	26,7604	4,68195
347	fena	16,9437	3,69297	24,785	0,67985	74,1935	3673841	26,6667	2,14405	26,6757	4,67576
348	pes	6,3448	2,19296	15,8486	0,67399	80,6451	5052425	26,6667	2,14405	26,9775	4,69776
349	pes	5,6126	2,02369	18,3075	0,67631	93,5484	8908784	29,2157	2,17986	27,911	4,76459
350	pes	12,9852	3,26003	20,0197	0,67752	74,1935	3673841	27,0588	2,14984	25,7607	4,60782
351	pes	2,4521	0,97362	18,56	0,67651	93,5484	8908784	30,1961	2,19259	28,8154	4,82767

Tabulka 16: Původní a Box-Coxovy transformované hodnoty parametrů F_x , AVK a podílu krve vlka v hodnocené populaci - 13.část

Jedinec	Pohlaví	Parametr									
		F_x 5 [%]		F_x 8 [%]		AVK5 [%]		AVK8 [%]		Podíl krve vlka [%]	
		původní	trans.	původní	trans.	původní	trans.	původní	trans.	původní	trans.
352	pes	9,8525	2,83226	19,7149	0,67733	75,8065	3988541	28,2353	2,16658	31,0737	4,97855
353	pes	7,1412	2,35977	19,1036	0,67691	82,2581	5449619	24,7059	2,11337	26,914	4,69314
354	pes	0,7855	-0,2363	13,2846	0,6704	98,3871	10802221	33,3333	2,23	27,7761	4,75504
355	pes	2,3354	0,91654	15,2257	0,67325	87,0968	6779939	26,0784	2,13515	27,1463	4,70998
356	fena	8,3546	2,58673	15,3875	0,67345	85,4838	6312516	33,9216	2,23651	27,4246	4,72999
357	fena	2,3353	0,91649	15,3181	0,67337	87,0968	6779939	26,0784	2,13515	27,1463	4,70998
358	pes	3,2333	1,30702	19,6013	0,67725	93,5484	8908784	26,0784	2,13515	29,1713	4,85206
359	fena	4,9698	1,85944	17,8553	0,67594	83,871	5869380	26,2745	2,13815	28,3346	4,79433
360	fena	1,4908	0,41405	14,425	0,67219	88,7097	7272401	34,5098	2,24288	25,7664	4,60825
361	pes	21,2559	4,07865	29,897	0,68138	64,5161	2153637	28,8235	2,17462	29,7951	4,89424
362	pes	6,7379	2,27732	16,6903	0,67488	80,6452	5052449	26,6667	2,14405	27,5429	4,73845
363	fena	8,3202	2,58068	22,9864	0,67911	82,2581	5449619	28,4314	2,16928	29,6185	4,88237
364	pes	8,0728	2,53656	25,0308	0,67994	85,4839	6312545	28,0392	2,16385	29,7067	4,88831
365	fena	8,0728	2,53656	25,0308	0,67994	85,4839	6312545	28,0392	2,16385	29,7067	4,88831
366	pes	21,2559	4,07865	29,897	0,68138	64,5161	2153637	28,8235	2,17462	29,7951	4,89424
367	pes	8,0728	2,53656	25,0308	0,67994	85,4839	6312545	28,0392	2,16385	29,7067	4,88831
369	fena	4,237	1,64942	18,1081	0,67615	90,3226	7790784	31,7647	2,21188	28,6489	4,81617
370	pes	11,2516	3,03534	21,2855	0,67827	74,1935	3673841	26,2745	2,13815	26,7719	4,68279
371	pes	19,7036	3,9479	37,2815	0,68271	64,5161	2153637	20,9804	2,04546	31,8949	5,03126
372	pes	6,136	2,14639	25,9616	0,68027	88,7097	7272401	28,6275	2,17196	30,3524	4,93134
373	fena	8,206	2,56045	23,9348	0,67952	83,871	5869380	28,9314	2,17607	29,3612	4,86497

Tabulka 16: Původní a Box-Coxovy transformované hodnoty parametrů F_x , AVK a podílu krve vlka v hodnocené populaci - 14.část

Jedinec	Pohlaví	Parametr									
		F_x 5 [%]		F_x 8 [%]		AVK5 [%]		AVK8 [%]		Podíl krve vlka [%]	
		původní	trans.	původní	trans.	původní	trans.	původní	trans.	původní	trans.
374	fena	16,4727	3,64611	24,4679	0,67973	70,9677	3099906	26,0784	2,13515	28,9169	4,83465
375	pes	1,8615	0,65756	19,3769	0,6771	85,4839	6312545	25,4902	2,126	29,2192	4,85532
376	fena	10,9727	2,99658	17,7314	0,67584	70,9677	3099906	28,0392	2,16385	27,2041	4,71415
378	pes	16,9681	3,69537	30,1593	0,68144	66,129	2366749	21,7647	2,06098	29,9552	4,90495
379	pes	6,4466	2,21521	20,2104	0,67764	83,871	5869380	23,7255	2,09684	28,9408	4,83629
380	fena	6,4466	2,21521	20,2265	0,67765	83,871	5869380	23,7255	2,09684	28,9408	4,83629
381	pes	11,0346	3,00525	22,5871	0,67893	70,9677	3099906	23,7255	2,09684	28,0607	4,77514
382	fena	19,4402	3,92488	26,9287	0,68058	64,5161	2153637	28,2353	2,16658	29,8782	4,89981
383	fena	23,3264	4,24138	29,7872	0,68135	54,8387	1157330	30,3921	2,19507	28,7094	4,82036
386	pes	5,7196	2,04951	18,1081	0,67615	87,0968	6779939	26,0784	2,13515	27,5896	4,74178
387	pes	23,597	4,26177	29,6816	0,68133	59,6774	1598778	35,4901	2,25319	30,5481	4,94423
390	fena	26,2852	4,4545	48,1754	0,68381	56,4516	1292900	19,6078	2,01642	31,8368	5,02756
392	pes	16,4727	3,64611	24,4679	0,67973	70,9677	3099906	26,0784	2,13515	28,9169	4,83465
393	pes	15,1309	3,50631	22,9913	0,67911	69,3548	2839195	24,7059	2,11337	27,4948	4,73502
395	fena	28,0976	4,5755	41,698	0,68324	54,8387	1157330	25,098	2,11975	32,1434	5,04699
396	fena	8,4953	2,61127	21,9485	0,67862	91,9355	8335953	24,1196	2,10359	28,2059	4,78534
397	fena	8,4953	2,61127	21,9485	0,67862	91,9355	8335953	24,1196	2,10359	28,2059	4,78534
398	pes	4,8531	1,82777	20,7542	0,67797	83,871	5869380	29,2157	2,17986	27,9287	4,76584
399	pes	21,2532	4,07843	43,7559	0,68344	66,129	2366749	20,5882	2,03742	32,0191	5,03913
401	fena	2,5888	1,03771	19,3714	0,67709	91,9355	8335953	28,2353	2,16658	26,6815	4,67618
402	pes	6,9529	2,32176	26,6939	0,68051	83,871	5869380	27,0588	2,14984	30,0702	4,91262

Tabulka 16: Původní a Box-Coxovy transformované hodnoty parametrů F_x , AVK a podílu krve vlka v hodnocené populaci - 15.část

Jedinec	Pohlaví	Parametr									
		F_x 5 [%]		F_x 8 [%]		AVK5 [%]		AVK8 [%]		Podíl krve vlka [%]	
		původní	trans.	původní	trans.	původní	trans.	původní	trans.	původní	trans.
403	pes	1,7588	0,5944	19,1589	0,67695	87,0968	6779939	28,6275	2,17196	28,1612	4,7822
405	fena	5,7196	2,04951	18,1445	0,67618	87,0968	6779939	26,0784	2,13515	27,5896	4,74178
406	fena	17,3355	3,73114	30,902	0,68161	69,3548	2839195	28,4314	2,16928	29,7104	4,88855
407	pes	2,4521	0,97362	18,5889	0,67653	93,5484	8908784	30,1961	2,19259	28,8154	4,82767
408	pes	2,1094	0,79901	14,199	0,67186	87,0968	6779939	30,1961	2,19259	27,1204	4,70811
409	fena	7,9403	2,51247	23,8309	0,67948	83,871	5869380	25,6863	2,12908	29,6474	4,88432
411	pes	17,1635	3,71447	23,5142	0,67934	80,7097	5067908	27,2549	2,15269	28,4557	4,80277
412	fena	8,9211	2,68354	22,5562	0,67891	70,9677	3099906	20,5882	2,03742	27,9236	4,76548
413	fena	0,6412	-0,4271	16,3918	0,67458	88,7097	7272401	32,549	2,22108	29,4868	4,87348
415	fena	0,9399	-0,0616	18,6227	0,67655	82,2581	5449619	27,451	2,15552	29,5623	4,87858
416	pes	1,4608	0,39225	17,0192	0,6752	91,9355	8335953	33,1373	2,22779	28,1498	4,7814
417	pes	8,063	2,53479	19,888	0,67744	77,4194	4322690	29,0196	2,17725	28,8727	4,83161
418	fena	6,0681	2,13097	19,9766	0,6775	87,0968	6779939	29,4118	2,18245	28,7233	4,82132
419	pes	4,0804	1,60072	19,6058	0,67725	82,2581	5449619	30,1961	2,19259	28,5898	4,81208
420	pes	4,0804	1,60072	19,6063	0,67725	82,2581	5449619	30,1961	2,19259	28,5898	4,81208
422	fena	8,5096	2,61374	17,4136	0,67556	83,8709	5869354	29,2157	2,17986	28,73	4,82178
423	fena	4,1154	1,61174	17,5465	0,67568	90,3226	7790784	30,7843	2,19997	28,4587	4,80298
424	pes	5,1734	1,91326	23,4837	0,67933	79,0322	4677045	26,4705	2,14111	30,2549	4,92489
427	pes	5,4789	1,99084	17,8553	0,67594	85,4839	6312545	24,9019	2,11657	26,889	4,69133
428	fena	5,4789	1,99084	17,8697	0,67595	85,4839	6312545	24,902	2,11658	26,889	4,69133
429	fena	11,0079	3,00152	18,0525	0,67611	75,8065	3988541	47,451	2,35547	26,8661	4,68966
431	pes	8,3202	2,58068	22,9864	0,67911	82,2581	5449619	28,4314	2,16928	29,6185	4,88237

Tabulka 16: Původní a Box-Coxovy transformované hodnoty parametrů F_x , AVK a podílu krve vlka v hodnocené populaci - 16.část

Jedinec	Pohlaví	Parametr									
		F_x 5 [%]		F_x 8 [%]		AVK5 [%]		AVK8 [%]		Podíl krve vlka [%]	
		původní	trans.	původní	trans.	původní	trans.	původní	trans.	původní	trans.
432	fena	5,4694	1,98849	22,269	0,67877	88,7096	7272370	29,4118	2,18245	28,9383	4,83612
433	fena	1,222	0,20416	15,5639	0,67366	90,3226	7790784	29,6078	2,18502	28,9608	4,83766
440	fena	19,745	3,9515	26,0428	0,6803	56,4516	1292900	29,0196	2,17725	28,1166	4,77907
441	pes	19,745	3,9515	26,0428	0,6803	56,4516	1292900	29,0196	2,17725	28,1166	4,77907
442	fena	0,7855	-0,2363	13,2846	0,6704	98,3871	10802221	33,3333	2,23	27,7761	4,75504
443	pes	0,7855	-0,2363	13,2847	0,6704	98,3871	10802221	33,3333	2,23	27,7761	4,75504
445	pes	0,7856	-0,2361	13,958	0,6715	98,3871	10802221	33,3333	2,23	27,7762	4,75505
446	fena	11,6072	3,08364	25,1436	0,67998	70,9677	3099906	22,9412	2,08297	27,549	4,73889
447	fena	11,6786	3,09319	20,5865	0,67787	79,0323	4677068	28,2353	2,16658	27,4864	4,73442
450	pes	2,4199	0,9581	16,5942	0,67478	90,3226	7790784	28,2353	2,16658	27,4502	4,73183
451	fena	2,4199	0,9581	16,5942	0,67478	90,3226	7790784	28,2353	2,16658	27,4502	4,73183
452	fena	2,4199	0,9581	16,5942	0,67478	90,3226	7790784	28,2353	2,16658	27,4502	4,73183
453	pes	2,4199	0,9581	16,5942	0,67478	90,3226	7790784	28,2353	2,16658	27,4502	4,73183
454	pes	5,9727	2,10906	21,9562	0,67862	85,4839	6312545	27,2549	2,15269	29,2768	4,85924
455	pes	5,0233	1,87376	18,0672	0,67612	79,0323	4677068	26,8627	2,14695	26,8414	4,68786
456	fena	6,661	2,26114	20,3315	0,67772	75,8065	3988541	26,6667	2,14405	28,8822	4,83226
457	pes	6,661	2,26114	20,3383	0,67772	75,8065	3988541	26,6667	2,14405	28,8822	4,83226
458	pes	5,7971	2,06797	16,5388	0,67473	75,8065	3988541	26,6667	2,14405	28,1851	4,78388
459	fena	5,4587	1,98583	15,2257	0,67325	88,7097	7272401	31,7647	2,21188	26,432	4,65784
460	fena	6,5518	2,2379	18,1585	0,67619	83,8709	5869354	30,1961	2,19259	27,9194	4,76519
462	pes	6,9027	2,31149	17,0632	0,67524	87,0968	6779939	28,0392	2,16385	25,2693	4,57053

Tabulka 16: Původní a Box-Coxovy transformované hodnoty parametrů F_x , AVK a podílu krve vlka v hodnocené populaci - 17.část

Jedinec	Pohlaví	Parametr									
		F_x 5 [%]		F_x 8 [%]		AVK5 [%]		AVK8 [%]		Podíl krve vlka [%]	
		původní	trans.	původní	trans.	původní	trans.	původní	trans.	původní	trans.
463	pes	11,0136	3,00231	24,0239	0,67955	75,8065	3988541	30,1961	2,19259	29,7073	4,88835
464	fena	10,572	2,93945	20,3658	0,67774	75,8064	3988521	22,549	2,0758	26,5434	4,66605
465	pes	1,6341	0,51351	16,6904	0,67488	91,9355	8335953	30	2,19009	27,1481	4,71011
466	fena	1,6341	0,51351	16,7113	0,6749	91,9355	8335953	30	2,19009	27,1481	4,71011
467	fena	1,7864	0,61167	17,3801	0,67553	93,5484	8908784	29,2157	2,17986	28,2782	4,79039
468	pes	8,9254	2,68425	19,5538	0,67722	90,3226	7790784	27,0588	2,14984	28,6732	4,81786
470	pes	17,007	3,69919	26,9379	0,68058	69,3548	2839195	25,098	2,11975	27,7176	4,75089
471	fena	8,9002	2,68006	22,9198	0,67908	79,0323	4677068	27,2549	2,15269	29,3022	4,86097
472	fena	2,4024	0,94959	16,445	0,67463	91,9355	8335953	28,8235	2,17462	28,0424	4,77386
473	pes	3,7737	1,50072	16,6892	0,67488	88,7097	7272401	27,2549	2,15269	28,4557	4,80277
474	pes	3,7737	1,50072	16,6902	0,67488	88,7097	7272401	27,2549	2,15269	28,4557	4,80277
475	fena	11,791	3,10812	15,6787	0,6738	62,9032	1955038	34,7059	2,24497	27,4719	4,73338
476	fena	15,1309	3,50631	22,9913	0,67911	69,3548	2839195	24,7059	2,11337	27,4948	4,73502
477	pes	14,7626	3,46617	24,2485	0,67964	74,1935	3673841	24,7059	2,11337	26,2093	4,64136
478	pes	6,6666	2,26232	16,2065	0,67438	83,871	5869380	26,2745	2,13815	26,7792	4,68332
479	fena	14,9716	3,48905	23,0929	0,67916	69,3548	2839195	27,451	2,15552	26,0117	4,62664
480	pes	1,1863	0,1735	16,0371	0,6742	87,0968	6779939	31,7647	2,21188	28,8975	4,83331
486	pes	27,2128	4,51725	33,0908	0,68204	51,6129	918005	35,8824	2,25722	31,8542	5,02867
487	fena	2,4199	0,9581	16,6343	0,67482	90,3226	7790784	28,2353	2,16658	27,4502	4,73183
489	fena	3,6904	1,47241	16,7782	0,67497	90,3226	7790784	30,1961	2,19259	26,5217	4,66445
490	pes	1,5038	0,42339	14,9737	0,67293	83,871	5869372	27,2549	2,15269	28,8464	4,8298

5.3.3. Statistické vyhodnocení rozdílů mezi vytvořenými skupinami

Pro porovnání statistické významnosti rozdílů aritmetických průměrů hodnocených parametrů vytvořených skupin A, B, C, psů, fen a celkové populace bylo provedeno pomocí dvouvýběrových t-testů. Pro statistickou analýzu byl použit program STATISTICA 9.1. (StatSoft).

V tabulce 17 je uvedeno hodnocení pro parametr procentuální zastoupení krve vlka v plemeni československý vlčák. Z této tabulky vyplývá, že rozdíl průměrného procentuálního zastoupení vlčí krve mezi hodnocenými psy a fenami byl na hladině významnosti $\alpha = 0,05$ statisticky neprůkazný. Na stejné hladině významnosti α nebyly statisticky průkazné rovněž rozdíly průměrných hodnot psů vůči průměru celé populace a fen vůči průměru celé populace. Statisticky významné rozdíly na hladině významnosti $\alpha=0,05$ nebyly zjištěny také mezi průměrem skupiny B a průměrem celé populace. Naopak rozdíly mezi průměry skupin A a C a průměrem celé populace byly statisticky významné. Rovněž byly potvrzeny statisticky významné rozdíly ($\alpha = 0,05$) mezi všemi vytvořenými skupinami (A, B, C) navzájem.

Naprosto stejné statisticky významné průkaznosti respektive neprůkaznosti rozdílů mezi kategoriemi, jako jsou popsány pro podíl krve vlka, byly získány rovněž pro parametr AVK8. Tyto výsledky jsou prezentovány v tabulce 21, kde červenou barvou a hvězdičkou jsou zvýrazněny rozdíly průměrných hodnot, které se na hladině významnosti $\alpha = 0,05$ statisticky významně odlišují.

Pro hodnocené parametry F_{x5} , F_{x8} a AVK5 byly získány obdobné statisticky významné průkaznosti respektive neprůkaznosti jako u předchozích dvou parametrů s výjimkou rozdílů mezi průměrem skupiny B a průměrem celé populace. Pro parametry F_{x5} , F_{x8} a AVK5 bylo statistickou analýzou zjištěno, že průměr skupiny B se na hladině významnosti $\alpha = 0,05$ lišil od průměru celé populace. Výsledky těchto analýz dokumentují tabulky 18, 19 a 20.

Z provedených statistických analýz u všech hodnocených parametrů vyplývá, že průměrné hodnoty psů a fen se vzájemně neodlišují. Proto pro následující statistická šetření, ve kterých bude sledován vztah mezi hodnotou šlechtitelsky významných parametrů a variabilitou, nebudou prováděny analýzy zvlášť pro psy a pro feny. Z tabulek 17 - 21 rovněž vyplývá, že průměry skupin A, B a C se u všech parametrů vzájemně statisticky významně lišily. Tento výsledek svědčí o tom, že do skupin A a C byli skutečně zařazeni jedinci s extrémními hodnotami zkoumaných parametrů.

Tabulka 17: Porovnání průměrných procentuálních zastoupení krve vlka mezi skupinami hodnocených jedinců

Kategorie I	Kategorie II	Průměr		Směrodatná odchylka		Hodnota t	Stupně volnosti	Pravděpodobnost
		Kategorie I	Kategorie II	Kategorie I	Kategorie II			
všichni	psi	28,3175	28,3981	1,35539	1,39416	-0,637	529	0,52472
všichni	feny	28,3175	28,2421	1,35539	1,31741	0,62	541	0,53535
všichni	skupina A	28,3175	26,35	1,35539	0,69529	10,729*	413	0
všichni	skupina B	28,3175	28,3428	1,35539	0,73187	-0,271	611	0,78669
všichni	skupina C	28,3175	30,6155	1,35539	0,80268	-11,241*	402	0
psi	feny	28,3981	28,2421	1,39416	1,31741	1,089	356	0,27699
skupina A	skupina B	26,35	28,3428	0,69529	0,73187	-18,75*	310	0
skupina A	skupina C	26,35	30,6155	0,69529	0,80268	-28,885*	101	0
skupina B	skupina C	28,3428	30,6155	0,73187	0,80268	-19,096*	299	0

Tabulka 18: Porovnání průměrných hodnot koeficientů inbreedingu stanovených z 5 generací (F_{x5})

Kategorie I	Kategorie II	Průměr		Směrodatná odchylka		Hodnota t	Stupně volnosti	Pravděpodobnost
		Kategorie I	Kategorie II	Kategorie I	Kategorie II			
všichni	psi	7,73393	8,03879	5,75497	6,14145	-0,56	529	0,57598
všichni	feny	7,73393	7,44884	5,75497	5,36961	0,56	541	0,57602
všichni	skupina A	7,73393	1,80554	5,75497	0,61858	8,095*	418	0
všichni	skupina B	7,73393	6,83034	5,75497	2,68006	2,293*	601	0,0222
všichni	skupina C	7,73393	19,2818	5,75497	4,16596	-13,817*	407	0
psi	feny	8,03879	7,44884	6,14145	5,36961	0,969	356	0,33312
skupina A	skupina B	1,80554	6,83034	0,61858	2,68006	-14,648*	305	0
skupina A	skupina C	1,80554	19,2818	0,61858	4,16596	-32,628*	111	0
skupina B	skupina C	6,83034	19,2818	2,68006	4,16596	-27,098*	294	0

Tabulka 19: Porovnání průměrných hodnot koeficientů inbreedingu stanovených z 8 generací (F_{x8})

Kategorie I	Kategorie II	Průměr		Směrodatná odchylka		Hodnota t	Stupně volnosti	Pravděpodobnost
		Kategorie I	Kategorie I	Kategorie I	Kategorie II			
všichni	psi	20,3459	20,7333	5,1581	5,30478	-0,804	529	0,42199
všichni	feny	20,3459	19,9836	5,1581	5,00428	0,784	541	0,43367
všichni	skupina A	20,3459	14,817	5,1581	1,07138	6,756*	396	0
všichni	skupina B	20,3459	19,099	5,1581	2,0301	3,682*	614	0,00025
všichni	skupina C	20,3459	29,3935	5,1581	5,61312	-12,413*	416	0
psi	feny	20,7333	19,9836	5,30478	5,00428	1,376	356	0,16972
skupina A	skupina B	14,817	19,099	1,07138	2,0301	-13,048*	296	0
skupina A	skupina C	14,817	29,3935	1,07138	5,61312	-16,202*	98	0
skupina B	skupina C	19,099	29,3935	2,0301	5,61312	-23,636*	316	0

Tabulka 20: Porovnání průměrných hodnot koeficientů ztráty předků stanovených z 5 generací (AVK5)

Kategorie I	Kategorie II	Průměr		Směrodatná odchylka		Hodnota t	Stupně volnosti	Pravděpodobnost
		Kategorie I	Kategorie II	Kategorie I	Kategorie II			
všichni	psi	82,6535	82,2988	10,8552	10,0466	0,361	529	0,71793
všichni	feny	82,6535	82,9852	10,8552	11,5778	-0,33	541	0,74165
všichni	skupina A	82,6535	64,3437	10,8552	9,40443	12,311*	416	0
všichni	skupina B	82,6535	84,7548	10,8552	5,69744	-2,821*	610	0,00494
všichni	skupina C	82,6535	95,4912	10,8552	1,85959	-7,822*	400	0
psi	feny	82,2988	82,9852	10,0466	11,5778	-0,597	356	0,55066
skupina A	skupina B	64,3437	84,7548	9,40443	5,69744	-21,673*	312	0
skupina A	skupina C	64,3437	95,4912	9,40443	1,85959	-21,635*	102	0
skupina B	skupina C	84,7548	95,4912	5,69744	1,85959	-12,371*	296	0

Tabulka 21: Porovnání průměrných hodnot koeficientů ztráty předků stanovených z 8 generací (AVK8)

Kategorie I	Kategorie II	Průměr		Směrodatná odchylka		Hodnota t	Stupně volnosti	Pravděpodobnost
		Kategorie I	Kategorie II	Kategorie I	Kategorie II			
všichni	psi	28,4171	28,3407	3,45044	3,35802	0,241	529	0,80937
všichni	feny	28,4171	28,4886	3,45044	3,54228	-0,227	541	0,82071
všichni	skupina A	28,4171	23,4785	3,45044	1,38586	10*	406	0
všichni	skupina B	28,4171	28,133	3,45044	1,79627	1,196	607	0,2323
všichni	skupina C	28,4171	34,0003	3,45044	2,43829	-11,752*	413	0
psi	feny	28,3407	28,4886	3,35802	3,54228	-0,405	356	0,68579
skupina A	skupina B	23,4785	28,133	1,38586	1,79627	-17,316*	299	0
skupina A	skupina C	23,4785	34,0003	1,38586	2,43829	-26,927*	105	0
skupina B	skupina C	28,133	34,0003	1,79627	2,43829	-20,722*	306	0

5.4. Statistické vyhodnocení vlivu počtu heterozygotních SSR lokusů jedinců na zařazení do jednotlivých skupin šlechtitelsky významných parametrů

U každého hodnoceného jedince byl stanoven počet heterozygotních lokusů vzhledem k tomu, že bylo testováno celkem 8 mikrosatelitních lokusů, tak maximální hodnota tohoto parametru byla 8 u jedince, který by teoreticky vykazoval heterozygotní kombinace ve všech lokusech. Minimální hodnota tohoto parametru představuje číslo 0, která odpovídá teoretickému jedinci, který je ve všech lokusech homozygotních. Počty detekovaných heterozygotních lokusů jsou souhrnně zpracovány v tabulce 10.

Pomocí t-testů byly hodnoceny statisticky významné rozdíly průměrů počtu heterozygotních SSR-lokusů mezi psy a fenami, psy a celkovou populací a fenami a celkovou populací. Ani jedna z výše porovnávaných dvojic průměrů nebyla statisticky významná na hladině významnosti $\alpha = 0,05$ – tabulka 22.

Dále byly sledovány rozdíly průměrných počtů heterozygotních lokusů mezi skupinami A, B a C vytvořenými na základě hodnot parametrů podíl krve vlka, F_x5 , F_x8 , AVK5 a AVK8. U parametrů podíl krve vlka F_x5 a AVK8 t-test neodhalil žádné statisticky významné rozdíly mezi porovnávanými průměry na hladině významnosti $\alpha=0,05$. Tyto výsledky jsou dokumentovány tabulkami 23, 24, 27.

U hodnoceného parametru F_x8 byly zjištěny na hladině významnosti $\alpha = 0,05$ statisticky významné rozdíly mezi průměrným počtem heterozygotních genů jedinců zařazených do skupiny A a C. Tyto rozdíly byly předpokládány, protože se jedná o dvě extrémní skupiny jedinců. Výsledky t-testu jsou doloženy v tabulce 25.

U parametru AVK5 byly zjištěny statisticky významné rozdíly na hladině významnosti $\alpha = 0,05$ mezi průměrem skupiny C a průměrem celé populace. I tento rozdíl odpovídá předpokladu, kdy do skupiny C jsou zařazeni jedinci s nejvyšším počtem heterozygotních lokusů. Na hladině významnosti $\alpha = 0,05$ byly zjištěny statisticky významné rozdíly rovněž mezi průměry skupin B a C. Výsledky plynoucí z této statistické analýzy budou podrobně diskutovány v samostatné kapitole diplomové práce.

Tabulka 22: Porovnání průměrných počtů heterozygotních lokusů jednoho jedince mezi všemi jedinci, psy a fenami t-testem

Kategorie I	Kategorie II	Průměr		Směrodatná odchylka		Hodnota t	Stupně volnosti	Pravděpodobnost
		Kategorie I	Kategorie II	Kategorie I	Kategorie II			
všichni	psi	5,698324	5,757225	1,262938	1,306966	-0,49798	529	0,618707
všichni	feny	5,698324	5,643243	1,262938	1,22131	0,48707	541	0,626409
psi	feny	5,757225	5,643243	1,306966	1,22131	0,85302	356	0,394224

Tabulka 23: Porovnání průměrných počtů heterozygotních lokusů jednoho jedince v závislosti na zařazení jedinců do skupin podle procentuálního zastoupení krve vlka

Kategorie I	Kategorie II	Průměr		Směrodatná odchylka		Hodnota t	Stupně volnosti	Pravděpodobnost
		Kategorie I	Kategorie II	Kategorie I	Kategorie II			
všichni	skupina A	5,698324	5,77193	1,262938	1,309547	-0,40662	413	0,684502
všichni	skupina B	5,698324	5,698039	1,262938	1,251376	0,002762	611	0,997797
všichni	skupina C	5,698324	5,608696	1,262938	1,29062	0,45198	402	0,651528
skupina A	skupina B	5,77193	5,698039	1,309547	1,251376	0,399606	310	0,689722
skupina A	skupina C	5,77193	5,608696	1,309547	1,29062	0,632969	101	0,528185
skupina B	skupina C	5,698039	5,608696	1,251376	1,29062	0,443577	299	0,657669

Tabulka 24: Porovnání průměrných počtů heterozygotních lokusů jednoho jedince v závislosti na zařazení jedinců do skupin podle hodnoty koeficientu inbreedingu stanoveného z 5 generací (F_{x5})

Kategorie I	Kategorie II	Průměr		Směrodatná odchylka		Hodnota t	Stupně volnosti	Pravděpodobnost
		Kategorie I	Kategorie II	Kategorie I	Kategorie II			
všichni	skupina A	5,698324	5,741935	1,262938	1,227225	-0,25206	418	0,801118
všichni	skupina B	5,698324	5,710204	1,262938	1,232125	-0,11458	601	0,908819
všichni	skupina C	5,698324	5,588235	1,262938	1,458444	0,570828	407	0,568432
skupina A	skupina B	5,741935	5,710204	1,227225	1,232125	0,181296	305	0,856255
skupina A	skupina C	5,741935	5,588235	1,227225	1,458444	0,608415	111	0,544156
skupina B	skupina C	5,710204	5,588235	1,232125	1,458444	0,622281	294	0,534239

Tabulka 25: Porovnání průměrných počtů heterozygotních lokusů jednoho jedince v závislosti na zařazení jedinců do skupin podle hodnoty koeficientu inbreedingu stanoveného z 8 generací (F_{x8})

Kategorie I	Kategorie II	Průměr		Směrodatná odchylka		Hodnota t	Stupně volnosti	Pravděpodobnost
		Kategorie I	Kategorie II	Kategorie I	Kategorie II			
všichni	skupina A	5,698324	5,35	1,262938	1,311683	1,64799	396	0,100147
všichni	skupina B	5,698324	5,693798	1,262938	1,264311	0,04386	614	0,965031
všichni	skupina C	5,698324	5,95	1,262938	1,185005	-1,4408	416	0,150393
skupina A	skupina B	5,35	5,693798	1,311683	1,264311	-1,59224	296	0,112398
skupina A	skupina C	5,35	5,95	1,311683	1,185005	-2,37627*	98	0,019432
skupina B	skupina C	5,693798	5,95	1,264311	1,185005	-1,43016	316	0,15366

Tabulka 26: Porovnání průměrných počtů heterozygotních lokusů jednoho jedince v závislosti na zařazení jedinců do skupin podle hodnoty koeficientu ztracených předků stanoveného z 5 generací (AVK5)

Kategorie I	Kategorie II	Průměr		Směrodatná odchylka		Hodnota t	Stupně volnosti	Pravděpodobnost
		Kategorie I	Kategorie II	Kategorie I	Kategorie II			
všichni	skupina A	5,698324	5,533333	1,262938	1,346265	0,92757	416	0,354166
všichni	skupina B	5,698324	5,834646	1,262938	1,217551	-1,33542	610	0,182238
všichni	skupina C	5,698324	5,136364	1,262938	1,249947	2,78841*	400	0,00555
skupina A	skupina B	5,533333	5,834646	1,346265	1,217551	-1,6889	312	0,092238
skupina A	skupina C	5,533333	5,136364	1,346265	1,249947	1,53082	102	0,128909
skupina B	skupina C	5,834646	5,136364	1,217551	1,249947	3,49852*	296	0,00054

Tabulka 27: Porovnání průměrných počtů heterozygotních lokusů jednoho jedince v závislosti na zařazení jedinců do skupin podle hodnoty koeficientu ztracených předků stanoveného z 8 generací (AVK8)

Kategorie I	Kategorie II	Průměr		Směrodatná odchylka		Hodnota t	Stupně volnosti	Pravděpodobnost
		Kategorie I	Kategorie II	Kategorie I	Kategorie II			
všichni	skupina A	5,698324	5,56	1,262938	1,327265	0,72093	406	0,471369
všichni	skupina B	5,698324	5,697211	1,262938	1,247378	0,01076	607	0,99142
všichni	skupina C	5,698324	5,824561	1,262938	1,28345	-0,69936	413	0,484723
skupina A	skupina B	5,56	5,697211	1,327265	1,247378	-0,70271	299	0,482783
skupina A	skupina C	5,56	5,824561	1,327265	1,28345	-1,04701	105	0,297497
skupina B	skupina C	5,697211	5,824561	1,247378	1,28345	-0,69212	306	0,489387

5.5. Statistické vyhodnocení vlivu průměrné heterozygotnosti jednoho SSR lokusu na zařazení jedince do jednotlivých skupin šlechtitelsky významných parametrů

Program CERVUS 3.0.3 (Kalinowski et al. 2007) byl použit pro stanovení průměrné heterozygotnosti jednotlivých mikrosatelitních lokusů. Za tento parametr zpracovaný pro celkovou populaci je označen H_O – pozorovaná heterozygotnost. Tyto celopopulační údaje jsou uvedeny v tabulce 11.

Pomocí programu STATISTICA 9.1. (StatSoft) bylo provedeno hodnocení rozdílů průměrné heterozygotnosti mezi celkovou populací, psy a fenami. Pro tuto analýzu byla použita metoda dvouvýběrového t-testu. Její výsledky jsou znázorněny v tabulce 28. Z této tabulky vyplývá, že na hladině významnosti $\alpha = 0,05$ nebyly zjištěny statisticky významné rozdíly ani mezi jednou z porovnávaných kategorií dvojic.

Analogicky jako v kapitole 5.4 bylo provedeno vyhodnocení významnosti rozdílů průměrných heterozygotností skupin jedinců A, B, C vytvořených na základě transformovaných hodnot parametrů podíl krve vlka, F_{x5} , F_{x8} , AVK5 a AVK8.

U parametrů F_{x5} , F_{x8} , AVK5 a AVK8 nebyly zjištěny na hladině významnosti $\alpha=0,05$ žádné statisticky významné rozdíly mezi všemi porovnávanými skupinami. Výsledky jsou shrnuty v tabulkách 30, 31, 32 a 33.

Jediným šlechtitelsky významným parametrem u kterého byly prokázány statisticky významné rozdíly byl procentuální podíl krve vlka v genomu československého vlčáka. T-testem bylo u tohoto parametru na hladině významnosti $\alpha=0,05$ potvrzeno, že průměrná heterozygotnost jedinců zařazených do skupiny A se odlišovala od průměru celé populace. Skupina A se na hladině významnosti $\alpha = 0,05$ odlišovala rovněž od průměrné heterozygotnosti skupiny B a skupiny C. Jinými slovy lze konstatovat, že průměrná heterozygotnost skupiny A se na hladině významnosti $\alpha=0,05$ odlišovala od všech ostatních skupin. Výsledky statistické analýzy pro podíl krve vlka v plemeni československý vlčák jsou prezentovány v tabulce 29.

Výsledky uvedené v této kapitole budou podrobně diskutovány v samostatné části diplomové práce.

Tabulka 28: Porovnání průměrné heterozygotnosti jednoho lokusu mezi všemi jedinci, psy a fenami t-testem

Kategorie I	Kategorie II	Průměr		Směrodatná odchylka		Hodnota t	Stupně volnosti	Pravděpodobnost
		Kategorie I	Kategorie II	Kategorie I	Kategorie II			
všichni	psi	0,7035	0,709	0,09301	0,08966	-0,1204	14	0,90586
všichni	feny	0,7035	0,69863	0,09301	0,09822	0,1019	14	0,92025
psi	feny	0,709	0,69863	0,08966	0,09822	0,2207	14	0,82854

Tabulka 29: Porovnání průměrné heterozygotnosti jednoho lokusu v závislosti na zařazení jedinců do skupin podle procentuálního zastoupení krve vlka

Kategorie I	Kategorie II	Průměr		Směrodatná odchylka		Hodnota t	Stupně volnosti	Pravděpodobnost
		Kategorie I	Kategorie II	Kategorie I	Kategorie II			
všichni	skupina A	0,7035	1	0,09301	0	-9,0165*	14	0
všichni	skupina B	0,7035	0,70325	0,09301	0,10054	0,0052	14	0,99595
všichni	skupina C	0,7035	0,69288	0,09301	0,06895	0,2596	14	0,79898
skupina A	skupina B	1	0,70325	0	0,10054	8,3484*	14	0
skupina A	skupina C	1	0,69288	0	0,06895	12,5979*	14	0
skupina B	skupina C	0,70325	0,69288	0,10054	0,06895	0,2407	14	0,81327

Tabulka 30: Porovnání průměrné heterozygotnosti jednoho lokusu v závislosti na zařazení jedinců do skupin podle hodnoty koeficientu inbreedingu stanoveného z 5 generací (F_{x5})

Kategorie I	Kategorie II	Průměr		Směrodatná odchylka		Hodnota t	Stupně volnosti	Pravděpodobnost
		Kategorie I	Kategorie II	Kategorie I	Kategorie II			
všichni	skupina A	0,7035	0,70963	0,09301	0,14128	-0,1024	14	0,91988
všichni	skupina B	0,7035	0,7045	0,09301	0,08161	-0,0229	14	0,98209
všichni	skupina C	0,7035	0,69125	0,09301	0,10162	0,2515	14	0,80507
skupina A	skupina B	0,70963	0,7045	0,14128	0,08161	0,0888	14	0,93046
skupina A	skupina C	0,70963	0,69125	0,14128	0,10162	0,2986	14	0,7696
skupina B	skupina C	0,7045	0,69125	0,08161	0,10162	0,2875	14	0,7779

Tabulka 31: Porovnání průměrné heterozygotnosti jednoho lokusu v závislosti na zařazení jedinců do skupin podle hodnoty koeficientu inbreedingu stanoveného z 8 generací (F_{x8})

Kategorie I	Kategorie II	Průměr		Směrodatná odchylka		Hodnota t	Stupně volnosti	Pravděpodobnost
		Kategorie I	Kategorie II	Kategorie I	Kategorie II			
všichni	skupina A	0,7035	0,7125	0,09301	0,16475	-0,1346	14	0,89488
všichni	skupina B	0,7035	0,70563	0,09301	0,08706	-0,0472	14	0,96304
všichni	skupina C	0,7035	0,68963	0,09301	0,08873	0,3053	14	0,76463
skupina A	skupina B	0,7125	0,70563	0,16475	0,08706	0,1044	14	0,91837
skupina A	skupina C	0,7125	0,68963	0,16475	0,08873	0,3458	14	0,73466
skupina B	skupina C	0,70563	0,68963	0,08706	0,08873	0,3641	14	0,72126

Tabulka 32: Porovnání průměrné heterozygotnosti jednoho SSR-lokusu v závislosti na zařazení jedinců do skupin podle hodnoty koeficientu ztracených předků stanoveného z 5 generací (AVK5)

Kategorie I	Kategorie II	Průměr		Směrodatná odchylka		Hodnota t	Stupně volnosti	Pravděpodobnost
		Kategorie I	Kategorie II	Kategorie I	Kategorie II			
všichni	skupina A	0,7035	0,6855	0,09301	0,10815	0,3569	14	0,72648
všichni	skupina B	0,7035	0,72063	0,09301	0,08011	-0,3946	14	0,6991
všichni	skupina C	0,7035	0,63063	0,09301	0,16656	1,0805	14	0,29819
skupina A	skupina B	0,6855	0,72063	0,10815	0,08011	-0,7382	14	0,47261
skupina A	skupina C	0,6855	0,63063	0,10815	0,16656	0,7816	14	0,44749
skupina B	skupina C	0,72063	0,63063	0,08011	0,16656	1,3773	14	0,19004

Tabulka 33: Porovnání průměrné heterozygotnosti jednoho lokusu v závislosti na zařazení jedinců do skupin podle hodnoty koeficientu ztracených předků stanoveného z 8 generací (AVK8)

Kategorie I	Kategorie II	Průměr		Směrodatná odchylka		Hodnota t	Stupně volnosti	Pravděpodobnost
		Kategorie I	Kategorie II	Kategorie I	Kategorie II			
všichni	skupina A	0,7035	0,7125	0,09301	0,16475	-0,1346	14	0,89488
všichni	skupina B	0,7035	0,70563	0,09301	0,08706	-0,0472	14	0,96304
všichni	skupina C	0,7035	0,68963	0,09301	0,08873	0,3053	14	0,76463
skupina A	skupina B	0,7125	0,70563	0,16475	0,08706	0,1044	14	0,91837
skupina A	skupina C	0,7125	0,68963	0,16475	0,08873	0,3458	14	0,73466
skupina B	skupina C	0,70563	0,68963	0,08706	0,08873	0,3641	14	0,72126

5.6. Statistické vyhodnocení vlivu průměrného počtu alel jednoho SSR lokusu na zařazení jedinců do jednotlivých skupin šlechtitelsky významných parametrů

Výstupem programu CERVUS 3.0.3 (Kalinowski et al. 2007) byly hodnoty průměrných počtů alel jednotlivých mikrosatelitních lokusů. Tyto výsledky zpracované pro celou hodnocenou populaci plemene jsou uvedeny v tabulce 10. I pro tyto údaje byla provedena statistická analýza analogickým způsobem, jako je popsáno v kapitole 5.4.

Úvodním krokem statistické analýzy provedené pomocí programu STATISTICA 9.1. (StatSoft) byly t-testy zaměřené na zjištění statistické významnosti rozdílů mezi průměrným počtem alel jednoho mikrosatelitního lokusu u psů, fen a celkové populace. Z tabulky 34 vyplývá, že na hladině významnosti $\alpha = 0,05$ nebyly mezi těmito kategoriemi zjištěny žádné statisticky významné rozdíly.

Získaná data byla vyhodnocena analogicky jako v případě údajů v kapitole 5.4. Z celkového pohledu je možné konstatovat, že u hodnocených skupin vytvořených podle parametrů F_{x5} , F_{x8} , $AVK5$ a $AVK8$ nebyly na hladině významnosti $\alpha = 0,05$ zjištěny žádné statisticky významné rozdíly. Výsledky provedených t-testů jsou uvedeny v tabulkách 36, 37, 38 a 39.

Jedinou výjimku z hodnocených parametrů představoval procentický podíl krve vlka v plemeni československý vlčák. U tohoto parametru byly zjištěny na hladině významnosti $\alpha = 0,05$ statisticky významné rozdíly průměrného počtu alel jednoho mikrosatelitního lokusu mezi skupinami A a C. Tento výsledek odpovídá předpokladu, že rozdíly byly zjištěny mezi skupinami, které v sobě zahrnovaly jedince s extrémně nízkými a extrémně vysokými počty alel mikrosatelitních lokusů. Zjištěný výsledek je dokumentován tabulkou 35.

Tabulka 34: Porovnání průměrného počtu alel jednoho lokusu mezi všemi jedinci, psy a fenami t-testem

Kategorie I	Kategorie II	Průměr		Směrodatná odchylka		Hodnota t	Stupně volnosti	Pravděpodobnost
		Kategorie I	Kategorie II	Kategorie I	Kategorie II			
všichni	psi	7,875	7,375	0,23535	14	0,81734	4,45413	4,03334
všichni	feny	7,875	7,25	0,28444	14	0,78024	4,45413	4,33425
psi	feny	7,375	7,25	0,05972	14	0,95323	4,03334	4,33425

Tabulka 35: Porovnání průměrného počtu alel jednoho lokusu v závislosti na zařazení jedinců do skupin podle procentuálního zastoupení krve vlka

Kategorie I	Kategorie II	Průměr		Směrodatná odchylka		Hodnota t	Stupně volnosti	Pravděpodobnost
		Kategorie I	Kategorie II	Kategorie I	Kategorie II			
všichni	skupina A	7,875	9,625	-0,8475	14	0,41095	4,45413	3,77728
všichni	skupina B	7,875	7,375	0,22656	14	0,82404	4,45413	4,37321
všichni	skupina C	7,875	5,75	1,2112	14	0,24587	4,45413	2,18763
skupina A	skupina B	9,625	7,375	1,10129	14	0,28935	3,77728	4,37321
skupina A	skupina C	9,625	5,75	2,51089	14	0,02494*	3,77728	2,18763
skupina B	skupina C	7,375	5,75	0,93994	14	0,36318	4,37321	2,18763

Tabulka 36: Porovnání průměrného počtu alel jednoho lokusu v závislosti na zařazení jedinců do skupin podle hodnoty koeficientu inbreedingu stanoveného z 5 generací (F_{x5})

Kategorie I	Kategorie II	Průměr		Směrodatná odchylka		Hodnota t	Stupně volnosti	Pravděpodobnost
		Kategorie I	Kategorie II	Kategorie I	Kategorie II			

všichni	skupina A	7,875	6,5	0,68313	14	0,50567	4,45413	3,54562
všichni	skupina B	7,875	7,375	0,22331	14	0,82652	4,45413	4,50198
všichni	skupina C	7,875	6,375	0,83958	14	0,41525	4,45413	2,38672
skupina A	skupina B	6,5	7,375	-0,4319	14	0,67241	3,54562	4,50198
skupina A	skupina C	6,5	6,375	0,08272	14	0,93525	3,54562	2,38672
skupina B	skupina C	7,375	6,375	0,55508	14	0,5876	4,50198	2,38672

Tabulka 37: Porovnání průměrného počtu alel jednoho lokusu v závislosti na zařazení jedinců do skupin podle hodnoty koeficientu inbreedingu stanoveného z 8 generací (F_{x8})

Kategorie I	Kategorie II	Průměr		Směrodatná odchylka		Hodnota t	Stupně volnosti	Pravděpodobnost
		Kategorie I	Kategorie II	Kategorie I	Kategorie II			
všichni	skupina A	7,875	6,125	0,90423	14	0,38117	4,45413	3,18198
všichni	skupina B	7,875	7,125	0,34046	14	0,73856	4,45413	4,35685
všichni	skupina C	7,875	6,375	0,83034	14	0,42028	4,45413	2,50357
skupina A	skupina B	6,125	7,125	-0,5243	14	0,6083	3,18198	4,35685
skupina A	skupina C	6,125	6,375	-0,1747	14	0,86386	3,18198	2,50357
skupina B	skupina C	7,125	6,375	0,42216	14	0,67932	4,35685	2,50357

Tabulka 38: Porovnání průměrného počtu alel jednoho lokusu v závislosti na zařazení jedinců do skupin podle hodnoty koeficientu ztracených předků stanoveného z 5 generací (AVK5)

Kategorie I	Kategorie II	Průměr		Směrodatná odchylka		Hodnota t	Stupně volnosti	Pravděpodobnost
		Kategorie I	Kategorie II	Kategorie I	Kategorie II			
všichni	skupina A	7,875	6,75	0,59474	14	0,56151	4,45413	2,96407
všichni	skupina B	7,875	7,75	0,05547	14	0,95655	4,45413	4,55914

všichni	skupin a C	7,875	5,375	1,3405 9	14	0,2014	4,454 13	2,82527
skupin a A	skupin a B	6,75	7,75	-0,5201	14	0,6111	2,964 07	4,55914
skupin a A	skupin a C	6,75	5,375	0,9497 5	14	0,3583 5	2,964 07	2,82527
skupin a B	skupin a C	7,75	5,375	1,2524 3	14	0,2309 3	4,559 14	2,82527

Tabulka 39: Porovnání průměrného počtu alel jednoho lokusu v závislosti na zařazení jedinců do skupin podle hodnoty koeficientu ztracených předků stanoveného z 8 generací (AVK8)

Kategorie I	Kategorie II	Průměr		Směrodatná odchylka		Hodnota t	Stupně volnosti	Pravděpodobnost
		Kategorie I	Kategorie II	Kategorie I	Kategorie II			
všichni	skupin a A	7,875	6,375	0,8043 5	14	0,4346 4	4,454 13	2,82527
všichni	skupin a B	7,875	7,625	0,1154 2	14	0,9097 6	4,454 13	4,20671
všichni	skupin a C	7,875	6,625	0,6028 7	14	0,5562 4	4,454 13	3,81491
skupin a A	skupin a B	6,375	7,625	-0,6977	14	0,4967 9	2,825 27	4,20671
skupin a A	skupin a C	6,375	6,625	-0,149	14	0,8837 2	2,825 27	3,81491
skupin a B	skupin a C	7,625	6,625	0,4980 6	14	0,6261 8	4,206 71	3,81491

6. Diskuze

6.1. Polymorfismus optimalizovaných multiplex-SSR markerů

Již v metodické části diplomové práce bylo uvedeno, že pro experimenty byly použity mikrosatelitní markery, které navrhli van Asch et al. (2009). Tento kolektiv autorů vyvinul systém 9 mikrosatelitních lokusů, které byly použity pro hodnocení málopočetného portugalského plemene Cão de Gado Transmontano.

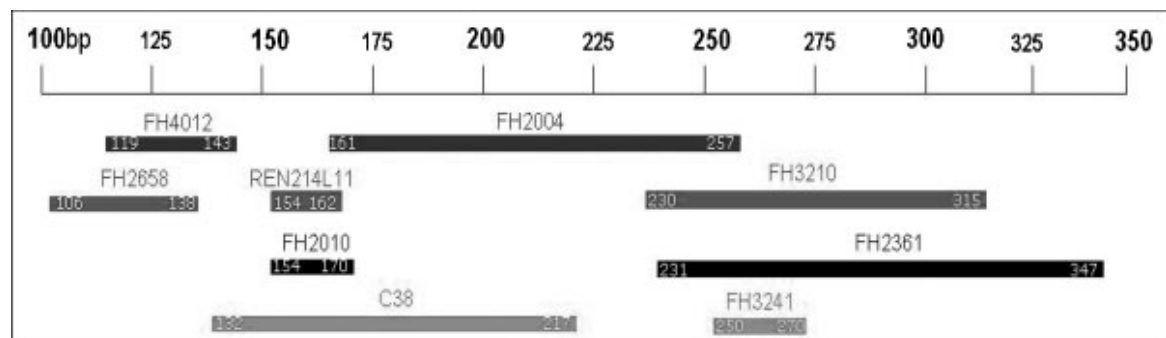
6.1.1. Optimalizace postupu detekce polymorfismů mikrosatelitních lokusů

Při řešení diplomové práce jsem zjistila, že při amplifikaci všech devíti mikrosatelitních lokusů, tak jak to popisují van Asch et al. (2009), docházelo k amplifikacím jednotlivých mikrosatelitních lokusů s velice variabilní intenzitou. Z výstupů fragmentační analýzy provedené pomocí Eggleston et. al. (2002) vyplývalo, že fluorescence signály alel některých lokusů byly extrémně silné a signály jiných lokusů byly velice slabé, nedetekovatelné. Typickým mikrosatelitním lokusem, který vykazoval velice slabou amplifikaci, kterou nebylo možné detekovat, byl lokus FH2658. Z výše uvedených důvodů byl při řešení diplomové práce navržen modifikovaný postup, ve kterém byly primery navržené podle van Asch (2009) rozděleny do dvou multiplex-SSR markerů, kdy v každém markeru byly amplifikovány 4 různé mikrosatelitní lokusy. Eggleston et al. (2002) uvádějí, že zavedení systémů multiplex-SSR markerů výrazně urychlí a zjednoduší proces genotypizace. Na systém speciálně určených multiplex - SSR markerů pro genotypizaci psů se zaměřili některé komerční firmy. Například Olschyna et al. (2011) popisují, jak pro firmu QIAGEN vyvinula multiplex-SSR marker, který umožňuje současně amplifikovat 10 mikrosatelitních lokusů. Firma QIAGEN na základě experimentů vyvinula kit, který je určen pro následnou fragmentační analýzu pomocí kapilární elektroforézy.

Během řešení diplomové práce jsem se zabývala dvěma multiplex-SSR markery, které hodnotily polymorfismy vždy pouze čtyř mikrosatelitních lokusů. Z praktického hlediska to znamená dvojnásobné prodloužení času oproti multiplex-SSR markerů, které používali van Asch et al. (2009) a Olschyna et al. (2011). Tuto pomalejší strategii jsem zvolila zejména z důvodů požadavků kladených na specifčnost a reprodukovatelnost výsledků.

Jako hlavní cíl diplomové práce jsem si zadala navrhnout takovou metodu, která bude jednoznačně a reprodukovatelně poskytovat výsledky – specifické alely mikrosatelitních lokusů s opakovatelně stanovenou velikostí. Tento cíl jsem si vytkla také z důvodu toho, že získané výsledky budou následně statisticky hodnoceny nejen pomocí základní bioinformatických deskriptivních parametrů, ale rovněž bude studován jejich vztah k některým šlechtitelsky důležitým parametrům. Příčiny, proč van Asch (2009) nebo Olschyna et al. (2011) úspěšně amplifikovali současně větší počet lokusů, je možné hledat zřejmě ve specifčnosti použité termostabilní DNA polymerázy. Například van Asch et al. (2009) typ použité polymerázy nespecifikuje a uvádí, že pro analýzy byl použit PCR Master Mix vyráběný firmou QIAGENE a určený speciálně pro amplifikaci mikrosatelitních lokusů. Olschyna et al. (2011), kteří se věnovali přímo vývoji multiplex-SSR kitu pro firmu QIAGENE, používali vysoce specifickou a citlivou HotStartTaq[®] Plus DNA polymerázu. Pro své experimenty jsem použila standardní rekombinantní *Taq* polymerázu (Fermentas), která při amplifikaci dvou navržených multiplex-SSR markerů pracovala zcela spolehlivě. Při amplifikaci nevznikaly nespecifické PCR produkty a z porovnání velikostí alel osmi hodnocených mikrosatelitních lokusů uvedených v tabulce 10 s následujícím obrázkem je patrné, že velikosti alel odpovídaly velikostem publikovaných van Asch et al. (2009).

Obrázek 14: Předpokládané velikosti alel mikrosatelitních markerů – upraveno podle van Asch et al. (2009)



Má diplomová práce je zaměřena na plemeno československý vlačák, které zcela jistě nepatří mezi velmi početná psí plemena a to jak z pohledu Evropy tak i v celosvětovém měřítku. Původ tohoto plemene a jeho vztah k České a Slovenské republice jsem detailně popsala v literární rešerši diplomové práce. Po prostudování databází vědecké literatury zaměřené na mikrosatelitní analýzy plemen psů jsem zjistila,

že toto plemeno doposud nebylo pomocí autosomálních mikrosatelitních markerů zkoumáno. Jediné molekulární analýzy zaměřené na polymorfismy mikrosatelitních markerů lokalizované na gonosomech X a Y u plemene československý vlčák publikovali pouze Čílová et al. (2011). Tyto analýzy však měly za hlavní cíl identifikovat vlčí nebo psí původ gonosomu Y. Nebyly však zaměřeny na hodnocení širší genetické variability tohoto plemene. Ze studia vědecké literatury rovněž vyplývá, že hodnocení variability uvnitř populací psích plemen i mezi různými plemeny byly publikovány řadou autorů. Obecně lze shrnout, že modelovými plemeny byla obvykle málopočetná plemena, jako je například Cão de Gado Transmontano hodnocené van Asch et al. (2009) pomocí shodných mikrosatelitních lokusů.

6.1.2. Zjištěné polymorfismy hodnocených mikrosatelitních lokusů a variabilita plemene československý vlčák

Přestože je zcela jasné, že původ a tudíž i genetická struktura plemen československý vlčák a Cão de Gado Transmontano je zcela odlišná, ráda bych své výsledky diskutovala právě s prací van Asch et al. (2009), a to proto, že výše uvedení autoři použili zcela shodné mikrosatelitní markery. Již ve výsledkové práci jsem pro větší přehlednost uvedla vedle sebe tabulky, ve kterých jsou sumárně zpracovány základní molekulárně populační charakteristiky obou dvou plemen.

Přes velice rozdílný původ obou dvou plemen je patrné, že základní parametry variability polymorfismu mikrosatelitních lokusů jsou u obou plemen podobné. Tato podobnost se týká zejména hodnot počtu alel detekovaných v jednotlivých lokusech. U obou plemen bylo zjištěno, že nejvyšší alelická variabilita byla zjištěna u lokusu FH2361, naopak nejnižší variabilita alel byla zjištěna u lokusu REN214L11. Hodnoty PIC potom u obou plemen plně korespondují s počty zjištěných alel. Z porovnání těchto dvou plemen (tabulky 11 a 12) je patrné, že genetická variabilita plemene Cão de Gado Transmontano (van Asch et al. 2009) je mírně vyšší oproti variabilitě plemene československý vlčák, kterou jsem zjistila během řešení diplomové práce. Tento rozdíl nespatřuji v počtu hodnocených zvířat, protože v diplomové práci bylo hodnoceno celkem 358 jedinců a van Asch et al. (2009) hodnotili pouze 113 čistokrevných představitelů plemene Cão de Gado Transmontano. Předpokládala jsem, že u populace s vyšším rozsahem bude teoreticky podchyceno více alel oproti populaci menší.

Domnívám se, že vyšší variabilita mikrosatelitních lokusů u plemene Cão de Gado Transmontano mohla být způsobena nejen odlišným genetickým původem, ale i v důsledku záměrné selekce člověka. Předpokládám, že plemeno je vysloveně pracovním plemenem, u kterého budou při selekci mnohem důležitější pracovní předpoklady oproti jeho exteriéru. Československý vlčák je relativně mladé plemeno (Hartl a Jedlička, 2002), které vzniklo na základě křížení přibližně 40 německých ovčáků a 4 vlků. Již z tohoto počtu zvířat zapojeným do plemenitby je patrná úzká výchozí chovatelská základna. Nelze opomenout ani ten fakt, že řada kříženců popř. linií byla z chovu vyřazena a to zejména z důvodů zcela nevhodných povah, které byly pro nově vznikající plemeno velice důležité. Domnívám se rovněž, že nižší variabilitu hodnocených mikrosatelitních lokusů u plemene československý vlčák mohla způsobit i cílená selekce prováděná člověkem a ti nejen na základě povahových vlastností, ale i na základě líbivosti exteriéru, protože plemeno československý vlčák se v současné době stává poměrně populárním plemenem plnících rolí společenského a doprovodného psa.

6.1.3. Heterozygotnost mikrosatelitních lokusů v hodnocené populaci československého vlčáka

Z porovnání mnou získaných výsledků a hodnocení pozorované a očekávané heterozygotnosti, kterou provedli van Asch et al. (2009) je patrné, že hodnoty H_O a H_E se u obou plemen blíží a lze tudíž konstatovat, že distribuce alel všech mikrosatelitních lokusů odpovídá rovnovážnému stavu populace podle Hardy-Weinbergova zákona. U předchozí části diskuze jsem uvedla, že obě plemena představují populace, které jsou podrobovány selekci prováděné člověkem. To, že distribuce alel odpovídá rovnovážnému stavu je důkaz o tom, že použité mikrosatelitní lokusy jsou z hlediska prováděné selekce neutrální. Neutrálnost selekce vzhledem k mikrosatelitním markerům je nezbytným předpokladem pro použití mikrosatelitních markerů v populačních studiích (Korzun, 2002).

6.2. Ověření paternity a maternity v modelové populaci československého vlčáka

Pro využití populace jakéhokoli zvířete pro genetické analýzy, které vyhledávají souvislosti mezi molekulárními polymorfismy a mezi parametry jako je např. koeficient

inbreedingu nebo koeficient ztráty předků, je nezbytně nutné pracovat s takovými populacemi, ve kterých bude jednoznačně platit rodičovství u všech hodnocených jedinců. V případě že je například molekulárními analýzami stanoven polymorfismus mikrosatelitních lokusů zvířete jehož skutečný biologický původ neodpovídá rodokmenu, vnáší potom každý takový jedinec chyby do statisticky prováděných analýz. Právě mikrosatelitní markery považují za vhodnou molekulární metodu pro posouzení paternity a maternity. Praktickým vyústěním těchto analýz v rámci klinického genetického servisu bývá potvrzení rodičovství, které je u jednotlivce obvykle prováděno na vyžádání majitele psa, nebo klubu chovatelů daného plemene (Dakin a Avise, 2004).

V diplomové práci jsem se pokusila propojit obě tyto možnosti hodnocením správnosti původu jedinců plemene československý vlčák.

6.2.1. Hodnocení paternity a maternity

Na začátku experimentální části diplomové práce jsem vycházela z toho, že modelové plemeno československý vlčák bude představovat soubor jedinců, u nichž výsledky molekulárních analýz budou přesně korespondovat s hodnocením jednotlivých zvířat v rodokmenovém stromu. Ve všech případech bylo hodnocení provedeno u čistokrevných zvířat s průkazem původu. Použitá databáze rodokmenů jednotlivých zvířat je dle mého názoru naprosto korektní a zanesené původy jedinců odpovídají záznamům v plemenné knize. K tomuto závěru jsem se dopracovala na základě porovnání údajů některých jedinců uvedených v průkazu původu s údaji databázi Statistics on the Czechoslovakian Wolfdogs breed a Wolfdog.org. Vyslovila jsem tudíž hypotézu, že pokud by byly molekulárními markery zjištěny disproporce, tak tyto odchylky nebudou způsobeny formální chybou autorů těchto databází při zadávání vstupních dat.

Z výsledkové části diplomové práce však vyplývá, že původní předpoklad 100% shody mezi výsledky genotypizace zvířat a jejich rodokmeny nebyl naplněn. Pro lepší orientaci ve vzniklých rozporech jsem záměrně rozdělila do třech případů.

6.2.2. Případ 1 nepotvrzeného rodičovství

Do této skupiny rozporností mezi molekulární genotypizací a původem zvířat plynoucí z rodokmenů byla zařazena dvojice psů – sourozenců (404 a 414). Vzorek

DNA jejich matky jsem při řešení práce neměla k dispozici. Porovnáván byl pouze mikrosatelitní profil jejich otce (387) a u obou sourozenců bylo potvrzeno, že v rodokmenu uváděný otec nemůže být jejich biologickým otcem. Rozdíly byly zjištěny ve třech mikrosatelitních lokusech, přičemž oba sourozenci se od předpokládaného otce lišili v alelách dvou stejných mikrosatelitních lokusů (FH2004 a FH 2010). Třetím mikrosatelitním lokusem, který prokázal odlišnost, byl u prvního sourozence lokus FH3210 a u druhého sourozence lokus C38. Alely, které prokázaly tyto odlišnosti u lokusů FH2010, FH3210 a C38, se vyskytovaly napříč hodnocenou populací československého vlčáka. V lokusu FH2004 byly zjištěny rozdíly na základě přítomnosti alely 164 bp. Tato alela se v hodnocené populaci československého vlčáka vyskytuje s minimální frekvencí. Zajímavým zjištěním bylo, že všechny jedince s touto alelou spojuje původ z jedné chovatelské stanice. Frekvenci lokusů, které se neshodují, je možné vyjádřit procentricky. Tato hodnota se rovná 37,5%. Pokud tento výsledek porovnáme se závěry Fun et al. (2003) kteří uvádějí, že pro potvrzení paternity je nutná alespoň 80% shoda všech alel, můžeme konstatovat, že zřejmě otec těchto sourozenců uvedený v rodokmenu není biologickým otcem. K tomuto závěru se lze dopracovat i na základě výsledků Irion et al. (2003), kteří uvádějí, že neshoda může být tolerována maximálně ve dvou mikrosatelitních lokusech. Během řešení diplomové práce bylo pro hodnocení rodičovství použito 8 mikrosatelitních lokusů. Pro průkaznost diferencí Kreutzer et al. (2008) doporučují použít alespoň 10-15 lokusů. Jestliže porovnáme závěry prací Irion et al. (2003) a Kreutzer et al. (2008) s výsledky diplomové práce, tak je možné jednoznačně konstatovat, že podmínky pro potvrzení paternity u těchto dvou sourozenců rozhodně potvrzeny nebyly.

Při šetření případu 1 byly vyhodnocovány rovněž potomci těchto sourozenců. V současné době podle databází Statistics on the Czechoslovakian Wolfdogs breed a Wolfdog.org byli v chovu použiti oba sourozenci. Pes 414 měl spolu s fenou 412 dát vznik potomkovi – psovi 461. Vzorke DNA byly k dispozici u všech zvířat této rodiny a bylo možné provést úplně ověření původu psa 461 – paternity i maternity. Neodpovídající paternitu je možné vysvětlit řadou hypotéz. Chovatel nevedl původ pravého krycího psa např. z důvodu nevědomosti o nežádoucím krytí, překrytí již nakryté feny jiným psem v průběhu jedné říje, nebo nekontrolovaným chovem ustájených psů. Dalším možným vysvětlením může být chyba chovatele při odběru bukalních sliznic. Tato chyba může nastat na několika úrovních jako je např. chybné označení obálky s kartáčkem psa. Všechny tyto hypotézy mohou teoreticky vysvětlit

důvod proč pes 387 nebyl zřejmě biologickým otcem obou sourozenců. V případě úplné rodiny (otec 414 a matka 412) potomek 461 však kromě paternity byl zjištěn rovněž nesoulad i při určení maternity. Z hodnocení paternity jednoznačně vyplynulo, že pes 414, který sám má zřejmě neodpovídající původ, nemohl být otcem psa 461. Nesoulad byl zjištěn u 2 mikrosatelitních lokusů (FH3210 a REN214L11). Oproti matce uvedené v rodokmenu byl nesoulad zjištěn rovněž u dvou mikrosatelitních lokusů (FH3241 a FH2361). Frekvence výskytu nesouhlasných lokusů v porovnání s předpokládaným otcem i matkou činila 25%. To znamená, že shoda alelických profilů byla 75%. Pokud tento výsledek porovnáme se závěry Sun et al. (2003) je patrné, že jak při určení paternity, tak i při určení maternity, byla těsně překročena hodnota, kdy je možné rodičovství potvrdit. Podle Irion et al. (2003) je nesoulad tolerovatelný maximálně ve dvou lokusech a tudíž z pohledu získaných výsledků by bylo vhodné původ psa 461 ještě považovat za odpovídající jeho rodokmenu. V potaz je však nutné vzít i fakt, že v diplomové práci bylo hodnoceno pouze 8 mikrosatelitních lokusů, a ne 10 - 15 lokusů doporučených Kreutzer et al. (2008). Otázkou zůstává, k jakým změnám by došlo při hodnocení polymorfismu většího množství mikrosatelitních lokusů. Frekvence neshody může hypoteticky vzrůst i klesnout. Dakin a Avise (2004) popisují, že v důsledku *de-novo* vznikajících mutací a nulových alel může docházet k nesouhlasu s rodokmenem při určování paternity a maternity. Pokud by taková *de-novo* vzniklá mutace byla příčinou neodpovídající paternity psa 461. Potom by mutace musela proběhnout současně ve dvou mikrosatelitních lokusech a to jak u psa 414, tak i u feny 412.

Rovněž druhý ze sourozenců - pes 404 byl použit v chovu a stal se otcem feny 67. U této feny nebyl k dispozici vzorek DNA její matky, to znamená, že nebyla hodnocena úplná rodina. Přesto na základě mikrosatelitní analýzy nebylo otcovství psa 404 vyloučeno. Protože však pes 404 měl sám mikrosatelitní analýzou nepotvrzený původ byla rovněž i jeho dcera – fena 67 vyloučena z následujících statistických analýz.

6.2.3. Případy 2 a 3 nepotvrzených rodičovství

Případy dva a tři se týkají zcela jiných chovatelských stanic než zvířata zapojená do případu 1. Rovněž mezi případy 2 a 3 nejsou žádné rodokmenové souvislosti. To znamená, že oba případy vznikly nezávisle na sobě, přestože v obou dvou případech nebyla mikrosatelitní analýzou potvrzena maternita. Případ 2 se týkal feny 111, která byla zařazena do hodnocení úplné rodiny, to znamená, že na základě analýzy

mikrosatelitních vzorků DNA bylo provedeno hodnocení paternity i maternity. Původ této feny odpovídal alelickým kombinacím všech lokusů s výjimkou lokusu FH2361, kde nebyla potvrzena maternita. Pokud tento výsledek porovnáme se závěry které publikovali Sun et al. (2003) a Irion et al. (2003) je možné konstatovat, že 87,5 % shoda alelických kombinací mikrosatelitních lokusů je dostatečně vysoká pro potvrzení jak paternity tak maternity. K závěru uznání jak paternity, tak maternity je možné se přiklonit i na základě komplexního hodnocení celé rodiny. U této rodiny se jednalo o hodnocení celého vrhu z 5 sourozenců, kdy buklální buňky určené k izolaci DNA byly získány od štěňat přímo u chovatele. U zbývajících sourozenců byla plně potvrzena jak paternita tak i maternita. Lze proto vyslovit hypotézu, že během oogeneze feny mohlo dojít k mutaci, kterou uvádějí jako možné vysvětlení např. Avis a Dakin (2004).

Obdobné zjištění jako v případě 2 bylo zjištěno rovněž v případě 3. Opět se jednalo o nepotvrzení maternity u feny 230. V tomto případě se nejednalo o analýzu kompletní rodiny, protože k dispozici nebyl vzorek otce od feny 230. Stejně jako v případě 2 se jednalo o hodnocení štěněte. Současně s hodnocením neshodující se feny 230 byla provedena genotypizace u její sestry pocházející ze stejného vrhu - feny 231. U tohoto sourozence žádné rozdíly v alelických kombinacích, které by vyloučily maternitu, zjištěny nebyly. Rovněž 87,5 % shoda alelických kombinací mezi matkou a dcerou je podle závěrů Sun et al. (2003) a Irion et al. (2003) je akceptovatelná a je možné rovněž vyslovit teorii náhodné mutace (Dakin a Avise, 2004), která zřejmě proběhla u matky dané feny.

6.2.4. Hypotézy a názory na možné příčiny nesouhlasu výsledků genotypizace některých zvířat s jejich rodokmeny

V předchozích kapitolách diskuze jsem se pokusila objasnit 3 konkrétní kauzy, u kterých nebyla potvrzena paternita a maternita. V této kapitole diskuze bych ráda shrnula hypotézy, které mohou vzniklé situace vysvětlit. Navržené vysvětlující hypotézy je možné rozdělit do dvou skupin. Do první skupiny bych ráda zařadila taková vysvětlení, která mohou odpovídat situaci, kdy rodiče deklarovaní v rodokmenu jsou skutečnými biologickými rodiči. Vysvětlující hypotézy jsou potom následující:

1. U jedinců došlo k mutacím, které změnilo počty opakování repetitivních motivů hodnocených mikrosatelitních lokusů.
2. Chovatel nebo majitel provedl chybné označení vzorků. K této situaci mohlo dojít teoreticky v případě, pokud je odebírán větší počet zvířat najednou a

cytologické kartáčky jsou ponechány oschnout například na desce stolu bez uložení do označených obálek.

Do druhé skupiny vysvětlujících hypotéz mohu zařadit názory a teorie, které odpovídají skutečnosti, že u hodnocených zvířat skutečně neodpovídá jejich biologický původ s údaji uvedenými v rodokmenu. Do této skupin vysvětlujících hypotéz potom patří:

1. Fena, která byla nakryta plánovaným krycím psem, mohla být teoreticky umístěna v kotci nebo ve výběhu s jiným psem, který ji překryl. Teoreticky nelze vyloučit situaci, kdy sourozenci z jednoho vrhu pocházejí z většího počtu biologických otců. K překrytí feny mohlo samozřejmě teoreticky dojít při jakémkoli jiném kontaktu se samcem, příslušníkem daného plemene. K této vysvětlující hypotéze může dle mého názoru docházet s větší pravděpodobností v takových případech, kdy chovatel vlastní velké množství zvířat obojího pohlaví.
2. Chovatel teoreticky nemusí z různých důvodů uvést pravého otce vrhu a může spoléhat na to, že pravý původ štěňat nebude odhalen. Nelze vyloučit ani situaci, kdy chovatel zvířat je spíše množitelem než chovatelem, u kterého je ekonomické zájmy výrazně převyšují nad pravidly a etikou chovu. Tato hypotéza teoreticky může objasnit i nepotvrzení matemit, kdy chovatel, u kterého ve stejnou dobu porodí větší počet fen štěňata, může provést výměnu nebo doplnění štěňat mezi různými vrhy.
3. Nelze vyloučit ani situaci, že mezi chovateli lze nalézt „experimentátory“, kteří mohou provádět záměrná křížení neodpovídajících rodičů a potomky následně registrovat pod zcela jiným původem. Mohu vyslovit odvážný názor, že u plemene československý vlčák se nabízí možnost křížení čistokrevných jedinců plemene s dalším plemenem, které vzniklo rovněž na základě křížení psa a vlka – se Saarloosovým vlčákem. Nelze vyloučit ani takovou situaci, kdy na základě různých experimentů jsou do chovu zařazeni kříženci vlků různých filiálních generací. Vzhledem k tomu, že plemeno československý vlčák je poměrně mladým plemenem, není až tak překvapivým výsledkem plemenitby, že i v potomstvech rodičů se skutečně správným původem mohou vyštěpovat štěňata variabilní nejen z hlediska některých exteriérových znaků, jako je například tmavá maska, tmavé zbarvení očí, ale i z hlediska povahových vlastností. K této

situaci by zcela určitě docházelo právě při realizaci takovýchto nelegitimních křížení.

Všechny teorie, které jsem vyslovila v rámci této diskuze, považuji za hypotézy a v žádném případě nechci jednoznačně tvrdit, že ke všem výše uvedeným jevům a problémům při chovu plemene musí docházet. Protože diplomová práce má charakter vědecké práce, bylo mojí povinností pokusit se objasnit teoretické příčiny zjištěných výsledků. Jsem si plně vědoma toho, že pro potvrzení nebo vyvrácení mnou navržených hypotéz by v budoucnu musela existovat vůle a ochota zejména ze strany chovatelů plemene, která by umožnila jednoznačně a reprodukovatelně potvrdit nebo vyvrátit mnou zjištěné neodpovídající původy zvířat.

6.3. Vztahy mezi polymorfismem mikrosatelitních lokusů a hodnotami vybraných šlechtitelsky významných parametrů

Při řešení diplomové práce jsem se rozhodla ověřit, zda lze statisticky prokázat vztah mezi variabilitou hodnocených mikrosatelitních lokusů a variabilitou významných šlechtitelských parametrů. Na základě studia vědecké literatury, která je zaměřena na mikrosatelitní analýzu jsem zjistila, že naprostá většina publikací je zakončena pouze hodnocením variability mikrosatelitních lokusů na úrovni stanovení parametrů H_O , H_E , PIC a předpokládané pravděpodobnosti výskytu nulové alely. K těmto údajům dospěli například van Asch et al. (2009), Cho (2005), Eggleston et al. (2002) a Irion et al. (2003). Výše uvedené parametry molekulární populační genetiky byly hodnoceny i při řešení mé diplomové práce. Tyto údaje jsem považovala pouze za vstupní údaje, které sice pomohou dokreslit variabilitu hodnocené populace, ale na druhou stranu na základě těchto údajů nelze usuzovat na vztahy mezi variabilitou molekulárních markerů a příbuzenskými poměry uvnitř populace. Lze se jen domnívat, že naprostá většina autorů zabývajících se genotypizací psů na úrovni mikrosatelitních markerů zřejmě neměla k dispozici vyhodnocení populací z hlediska vzájemné příbuzenské provázanosti hodnocených zvířat. V následujících kapitolách diskuze se proto zaměřím na diskuzi výsledků, které považuji za originální, jak z hlediska použitého plemen, tak i z hlediska statistického propojení výsledků molekulární analýzy s hodnocením šlechtitelsky významných parametrů populace československého vlčáka. Podobný způsob hodnocení

nepublikoval žádný z hodnocených autorů a proto se v následujících kapitolách diskuze pokusím okomentovat a vysvětlit nejdůležitější statisticky důležitá řešení.

6.3.1. Výběr šlechtitelských parametrů a jejich variabilita

Pro řešení diplomové práce jsem využila informací plynoucí z mezinárodní databáze Statistics on the Czechoslovakian Wolfdogs breed, která je k dispozici na internetové adrese <http://www.amicale-chien-loup-tchecoslovaque.com/cgi-bin/form.py>. Pro vyjádření stupně příbuzenského křížení jsem použila parametr koeficientu inbreedingu (Jakubec et al. 2010; Wriht, 1922), tento parametr je standardně používán ve šlechtitelské praxi bez ohledu na druh zvířete. Pro větší přesnost výsledků bylo použito hodnocení F_x z 5 a 8 generací. Další z parametrů, který byl hodnocen v diplomové práci byl koeficient ztráty předků (AVK), který byl hodnocen rovněž na základě údajů 5 a 8 generačních rodokmenů. Parametr AVK je po koeficientu F_x v kynologické praxi druhým nejčastěji používaným způsobem vyjádření intenzity křížení prováděné v příbuzenské plemenitbě. Třetím hodnoceným parametrem byl podíl krve vlka v genomu jednotlivých zástupců plemene československý vlčák. Tento parametr lze považovat za specifický právě pro toto plemeno, které bylo odvozeno ze záměrného křížení mezi německým ovčákem a eurasijským vlkem.

Před statistickým zpracováním výsledků jsem se musela rozhodnout, jaký postup zvolím při vytváření kategorií hodnocených zvířat. Mým cílem bylo u výše uvedených parametrů vytvořit kategorie, které v sobě budou zahrnovat extrémní hodnoty hodnocených parametrů. U všech parametrů jsem předpokládala kontinuální variabilitu údajů. Dopředu jsem očekávala, že distribuce hodnot jednotlivých parametrů nemusí odpovídat normálnímu rozdělení. Tento můj předpoklad vycházel z toho, že u plemene československý vlčák je realizován řízený chov. To znamená, že poradci chovu mají za úkol navrhovat taková křížení, která budou eliminovat typickou příbuzenskou plemenitbu. Z těchto důvodů jsem proto předpokládala, že hodnoty parametrů vypovídající o míře příbuzenské plemenitby v plemeni budou v případě F_x posunuty směrem k hodnotám nižším a naopak v případě AVK bude posun k hodnotám vyšším. Ze statistického hodnocení skutečně vyplynulo, že distribuce hodnot neodpovídá normálnímu rozdělení a vytvoření skupin jedinců s extrémními hodnotami znaků například pomocí kvartilů by neodpovídal skutečnému rozložení dat. Z těchto důvodů jsem zvolila u všech hodnocených parametrů Cox-Boxovu transformaci dat z jejichž výsledků je patrné, že distribuce transformovaných hodnot se mnohem více blíží

normálnímu rozdělení. Proto, abych při vytváření skupin jedinců s extrémními hodnotami parametrů zahrnula i jejich variabilitu, použila jsem systém vytvoření 3 skupin na základě hodnot aritmetického průměru a směrodatných odchylek. Domnívám se, že důkazem správného zařazení jedinců do skupin A, B a C je statistická průkaznost rozdílů průměrů těchto skupin, která byla zjištěna na hladině významnosti $\alpha = 0,05$. Jinými slovy to znamená, že do skupiny A byly zařazení jedinci s nejnižší hodnotou parametru a do skupiny C s nejvyšší hodnotou parametru. Dalším cílem bylo ověřit hypotézu, zdali se jedinci zařazení do těchto 3 skupin liší rovněž z hlediska bioinformatického vyhodnocení polymorfismů mikrosatelitních lokusů. Pro vyjádření polymorfismů mikrosatelitních lokusů jsem zvolila následující způsoby: počet heterozygotních lokusů jednotlivých jedinců, průměrná heterozygotnost jednoho lokusu a průměrný počet alel jednoho lokusu.

6.4. Vztah mezi počtem heterozygotních SSR lokusů jedinců a jejich zařazením do skupin šlechtitelsky významných parametrů

Před vyhodnocením této části diplomové práce jsem předpokládala, že intenzita příbuzenského křížení, která je patrná z rodokmenů jednotlivých jedinců může ovlivnit i heterozygotnost mikrosatelitních lokusů. Předpokládala jsem existenci obecného pravidla, že s opakujícím se nepříbuzenským křížením dochází k homozygotizaci populace. Tudiž jsem očekávala, že jedinci zařazení do skupiny s extrémně vysokými hodnotami F_x (C) a s extrémně nízkými hodnotami AVK se budou odlišovat od zbytku populace rovněž i na základě počtu heterozygotních lokusů.

Jinými slovy jsem předpokládala, že jedinci s vysokými hodnotami F_x a nízkými hodnotami AVK budou vykazovat vyšší frekvenci homozygotních mikrosatelitních lokusů. Samozřejmě jsem předpokládala i obrácenou relaci. To znamená, že jedinci s nízkými hodnotami F_x a vysokými hodnotami AVK budou charakterističtí vyšší heterozygotností mikrosatelitních lokusů. Tyto hypotézy se mi podařilo potvrdit u koeficientu inbreedingu F_x 8, kde bylo prokázáno, že na hladině významnosti $\alpha = 0,05$ byly zjištěny statisticky významné rozdíly mezi průměrným počtem heterozygotních lokusů skupiny A a skupiny C. Tento výsledek nasvědčuje tomu, že hypotéza o vlivu příbuzenského křížení na homozygotizaci populace platila i pro plemeno československý vlčák a pro 8 konkrétně použitých mikrosatelitních lokusů. Statistickou analýzou bylo prokázáno, že skutečně jedinci s nízkým koeficientem inbreedingu vykazují vyšší počet heterozygotních alel studovaných u mikrosatelitních markerů.

Další statisticky významná diference na hladině významnosti $\alpha = 0,05$ byla zjištěna u šlechtitelského parametru AVK5. Zde se průměrná hodnota koeficientu ztráty předků u jedinců zařazených do skupiny C (minimální ztráta předků) lišila od průměru celé populace a rovněž od skupiny B odpovídající střední hodnotě AVK. Tento výsledek lze okomentovat následujícím způsobem. Na základě transformace dat byly vytvořeny takové kategorie, kdy do skupiny C byli skutečně zařazeni jedinci s minimální ztrátou společného předka, to znamená, že v jejich rodokmenu docházelo k minimálnímu opakování jednotlivých psů a fen a tudíž jejich rodokmen byl z hlediska jejich variability nejvíce variabilní. Lze tak konstatovat, že tímto způsobem byla potvrzena hypotéza, že existuje vztah mezi heterozygotností mikrosatelitních lokusů a předpokládanou variabilitou jedince plynoucí z jedinečnosti předků vyskytující se v jeho rodokmenu.

6.5. Vztah mezi průměrnou heterozygotností jednoho SSR lokusu a zařazením jedinců do skupin šlechtitelsky významných parametrů

Průměrná heterozygotnost mikrosatelitního lokusu je jedním z parametrů, který byl výstupem bioinformatického zpracování dat pomocí programu CERVUS 3.0.3 (Kalinowski et al. 2007). Před zpracováním této části statistické analýzy jsem formulovala obdobné hypotézy jako v případě předchozí kapitoly. Předpokládala jsem, že jedinci kteří budou charakterističtí vyšším stupněm inbreedingu by teoreticky měli vykazovat z celkového pohledu i nižší průměrné hodnoty heterozygotností jednotlivých lokusů. Tato hypotéza rovněž vychází z předpokladu, že opakované příbuzenské křížení vede k homozygotizaci populace. Tato hypotéza však potvrzena nebyla. Na hladině významnosti $\alpha = 0,05$ nebyly zjištěny žádné statisticky významné rozdíly mezi průměry skupin A, B, C ani u parametru F_x , a ani u parametru AVK.

Překvapivým zjištěním však bylo nalezení statisticky průkazných diferencí na hladině významnosti $\alpha = 0,05$ pro parametr procentuální podíl krve vlka v genomu hodnocených jedinců československého vlčáka. Jak jsem již v úvodu diskuze uvedla je tento parametr specifický pro hodnocené plemeno a není možné jeho hodnoty přímo považovat za jednoznačný způsob vyjadřující intenzitu prováděného příbuzenského křížení. Ze statistického šetření vyplývá, že skupina zvířat s extrémně nízkým zastoupením krve vlka (A) se statisticky významně lišila od zbývajících skupin (B a C). Skupina A se odlišovala rovněž od průměru celé populace. Slovně lze získané výsledky

popsat následujícím způsobem. Průměrná heterozygotnost lokusů u jedinců zařazených do skupiny A byla vyšší oproti zbývajícím skupinám i oproti celé populaci. Do skupiny A byli zařazeni jedinci s nízkým procentickým zastoupením krve vlka, to znamená, že na jejich původu se podílelo mnohem větší množství psů plemene německý ovčák. Nízký podíl krve vlka lze vysvětlit také tím, že v rodokmenech těchto zvířat se méně vyskytl jedem z nejfrekventovanějších plemenů – Rep z Pohraniční stráže. Tento pes představuje v podstatě potomka F_3 generace křížení s vlkem a je možné jej charakterizovat podílem vlčí krve 42,19%. Lze tudíž předpokládat, že jedinci s menším výskytem tohoto plemene v rodokmenu budou vykazovat větší genetickou variabilitu. Jinými slovy je možné tvrdit, že čím je v rodokmenu daného jedince méně zastoupen Rep z Pohraniční stráže, tím jsou naopak v rodokmenu více zastoupeni předci, kteří jsou více geneticky variabilní.

6.6. Vztah mezi průměrným počtem alel jednoho SSR lokusu a zařazením jedinců do skupin šlechtitelsky významných parametrů

I v této kapitole byla ověřována platnost hypotézy, zdali příbuzenské křížení, které lze vyjádřit parametry F_x a AVK může ovlivnit variabilitu počtu alel jednotlivých mikrosatelitních lokusů. Předpokládala jsem, že opakovaný výskyt jednoho jedince v rodokmenech hodnocených československých vlčáků nebude zcela náhodný. Vyšla jsem z předpokladu, že při plemenitbě mohli být teoreticky využíváni někteří plemeni, kteří nesli ideální exteriérové a povahové rysy plemene. Z chovatelské praxe je známé, že takovými velice často využívaným plemenem byl již zmiňovaný pes Rep z Pohraniční stráže. Dá se říci, že tento jedinec se opakovaně vyskytuje v rodokmenech československých vlčáků. Předpokládala jsem tudíž, že opakované použití některých jedinců v chovu může způsobit, že i alely, které tyto jedinci nesou v následujících generacích, se budou vyskytovat s vyšší frekvencí. Jinými slovy je možné říci, že takováto situace by mohla způsobovat rovněž snížení variability detekovaných alel.

Z výsledků statistických analýz vyplynulo, že při rozdělení zvířat do skupin podle hodnot F_x a AVK nebyly zjištěny statisticky významné rozdíly ($\alpha = 0,05$) mezi průměrnými počty detekovaných alel.

Zajímavým zjištěním bylo, že stejně jako v předcházející kapitole diskuze byly zjištěny statisticky významné rozdíly v počtu alel mezi skupinami jedinců vytvořenými na základě procentického podílu krve vlka v genomu československého vlčáka.

Konkrétně se tento významný rozdíl týkal skupiny A s nízkým podílem vlčí krve – 9,62 alel a skupiny C s vysokým podílkem vlčí krve (5,75) detekovaných alel. Tento výsledek dle mého názoru rovněž dokumentuje, jaký dopad mělo zřejmě opakované používání krycího psa Repa z Pohraniční stráže při vzniku plemene československý vlčák na variabilitu alel mikrosatelitních lokusů současných reprezentantů tohoto plemene. Z výsledků je patrné, že jedinci s velkým podílem krve vlka se vyznačují statisticky průkazně nižším počtem detekovaných mikrosatelitních alel oproti skupině zvířat s nízkým podílem krve vlka. Z těchto výsledků je možné potom usuzovat i na to, že němečtí ovčáci použítí při vzniku plemene mohli být z hlediska hodnocených mikrosatelitních lokusů variabilnější oproti použitým vlkům. Tento můj závěr je nutné brát jako pouhou hypotézu, protože v současné době se již není možné vrátit k použitým vlkům a německým ovčákům, kteří stáli u zrodu plemene a přímo u nich provést molekulárně genetické analýzy. Vzájemné příbuzenské vztahy vlků použitých při vzniku plemene československý vlčák nejsou přesně známy.

7. Závěr

Mikrosatelitní markery jsou v současné době široce používané a to nejen v souvislosti se studiem variability uvnitř i mezi psími plemeny, ale rovněž v případě markerování některých genů, které je založeno na existenci těsné genové vazby mezi alelickou variantou mikrosatelitního lokusu a studovaným genem. Širokou škálu uplatnění mikrosatelitních markerů je možné spatřit zejména v rozvoji automatizovaných metod fragmentační analýzy, které jsou obvykle založeny na principech kapilární elektroforézy. Jako téma diplomové práce jsem si zvolila studium problematiku variability mikrosatelitních lokusů, která byla sledována uvnitř plemene a byla použita pro vyhodnocení paternity nebo maternity jednotlivých zvířat.

Jako modelové plemeno jsem použila plemeno československý vlčák a to z několika důvodů. Vzhledem ke spolupráci školící katedry s majiteli tohoto plemene jsem mohla pracovat s poměrně velkou modelovou populací. Dalším důvodem bylo to, že plemeno československý vlčák je poměrně mladé plemeno, které vzniklo na základě křížení mezi vlkem a německým ovčákem. Z těchto důvodů jsou k dispozici úplné rodokmeny těchto jedinců, ze kterých je možné přesně vyčíst, které genotypy fungovaly v pozici předků. Z rodokmene je možné spolehlivě stanovit parametry koeficientu inbreedingu, koeficientu ztráty předků a podílu krve vlka v genomu. Další velkou výhodou tohoto plemene pro použití jako model diplomové práce je existence dvou mezinárodních databází, které v sobě zahrnují veškeré informace o chovaných zvířatech.

Konkrétní výsledky, které vyplynuly z řešení mé diplomové práce, mohu shrnout do těchto bodů:

- Pro genetické analýzy byla vybrána modelová populace, která čítala 364 jedinců (188 fen a 176 psů) jednalo se o psy původem z různých evropských zemí.
- Na základě studia rodokmenů byli tito jedinci rozděleni do skupin, které odpovídaly různým vzájemným příbuzenským vztahům. V modelové populaci bylo identifikováno celkem 36 úplných rodin, to znamená, že u každého potomka úplné rodiny byly k dispozici vzorky DNA obou jeho rodičů. Současně bylo v populaci nalezeno 45 jedinců, u kterých byl k dispozici pouze vzorek DNA otce a 91 jedinců se známým vzorkem jejich matek. U 222 jedinců populace nebyly k dispozici vzorky DNA ani jednoho z jejich rodičů.

- Pomocí komerčně vyráběného kitu NucleoSpin® Tissue XS (Machery-Nagel) byla izolována její genomická DNA. Kvantita a kvalita extrahované DNA byla zcela vhodná pro následnou aplikaci mikrosatelitních markerů.
- Pro studium variability plemene československý vlčák bylo použito 8 mikrosatelitních lokusů (FH3210, FH3241, FH4012, FH2004, FH2010, REN214L11, FH2361 a C38).
- Byly navrženy dva multiplex-SSR markery, které amplifikovaly vždy 4 mikrosatelitní lokusy při použití primerových párů podle van Asch et al. (2009).
- Fragmentační analýzou provedenou pomocí ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) byly identifikovány alelické kombinace u všech 8 mikrosatelitních lokusů.
- Na základě porovnání profilů mikrosatelitních markerů s rodokmeny zvířat bylo zjištěno, že u 5 jedinců nebyla potvrzena paternita respektive maternita a jeden jedinec byl přímým potomkem otce s nepotvrzeným rodičovstvím.
- Všichni jedinci, u kterých nebyl potvrzen původ pomocí mikrosatelitní analýzy byli na základě příbuzenských vztahů rozděleni do samostatných 3 případů. U jednoho z případů nebyla potvrzena paternita s 37,5% neshodou alel. Ve zbývajících případech byly neshody mezi alelami deklarovaných rodičů a jejich potomků na úrovni 20%. Byly vysloveny hypotézy, které vysvětlují různé příčiny nepotvrzení rodičovství.
- Pro plánovanou statistickou analýzu bylo všech 6 jedinců vyřazeno z hodnocené populace a u zbývajících 358 jedinců byly stanoveny hodnoty koeficientu inbreedingu (F_x5 a F_x8), koeficienty ztráty předka (AVK5 a AVK8) a podílu krve vlka.
- U výše uvedených šlechtitelsky významných parametrů byla ověřena normalita rozdělení jejich hodnot. Ani u jednoho z těchto parametrů distribuce dat neodpovídala normálnímu rozdělení. Z těchto důvodů byla provedena Cox-Box transformace dat. Na základě hodnocení šikmosti a špičatosti a podle Q-Q grafů bylo zjištěno, že provedená transformace výrazně přiblížila transformaci dat normálnímu rozdělení.
- Na základě transformovaných dat byli všichni jedinci podle hodnot aritmetického průměru a směrodatné odchylky rozděleni do třech skupin,

kdy do skupiny A byli zařazeni s nejnižší úrovní znaku, do skupiny B s průměrnou a do skupiny C s nejvyšší úrovní.

- Populace československého vlčáka o rozsahu 358 jedinců byla vyhodnocena rovněž na základě porovnání skutečných a očekávaných heterozygotností hodnocených mikrosatelitních lokusů. Pro všechny mikrosatelitní lokusy platilo, že hodnoty obou heterozygotností byly číselně velice blízké a lze tudíž konstatovat, že distribuce alel u všech hodnocených mikrosatelitních lokusů odpovídala rovnovážnému stavu podle Hardy-Weinbergova zákona.
- Jednotlivé mikrosatelitní lokusy se vzájemně odlišovaly počtem detekovaných alel i hodnotami PIC. Nejvyšší hodnota PIC byla zjištěna u mikrosatelitního lokusu FH2361 (0,807) a nejnižší hodnotu PIC vykazoval naopak lokus REN214L11 (0,421).
- Pomocí dvouvýběrového t-testu bylo prokázáno, že na hladině významnosti $\alpha=0,05$ byly zjištěny statisticky významné rozdíly v počtech heterozygotních lokusů jedinců zařazených do skupiny s nejnižší a nejvyšší hodnotou F_x . U počtu heterozygotních lokusů byly rovněž zjištěny statisticky významné rozdíly mezi skupinou jedinců s nejvyšší hodnotou AVK5 a průměrem celé populace. Lze se tudíž vyslovit pro přijetí hypotézy, že existuje souvislost mezi počtem heterozygotních lokusů jednotlivých jedinců populace a mírou příbuzenských křížení, které se vyskytly v jejich rodokmenech.
- U parametru průměrná heterozygotnost mikrosatelitního lokusu byly zjištěny statisticky významné rozdíly ($\alpha = 0,05$) mezi skupinou s nejnižším podílem krve vlka vůči všem ostatním skupinám i vůči celé populaci.
- Dvouvýběrový t-test prokázal rovněž statisticky významné rozdíly ($\alpha = 0,05$) mezi průměrným počtem alel jednoho lokusu, které byly nalezeny mezi skupinami jedinců s nejnižším a nejvyšším podílem krve vlka v jejich genotypu. Z předchozích 2 bodů závěru je možné vyvodit hypotézu, že opakované použití plemeníka F_3 generace – Repa z Pohraniční stráže mohlo snížit genetickou variabilitu hodnocených mikrosatelitních lokusů u současných zástupců plemene československý vlčák.

V závěru bych ráda vyslovila některá konkrétní praktická doporučení. Metodu mikrosatelitní analýzy považuji za velice citlivou a pro její reprodukovatelné použití

považuji za nezbytné provést její důkladnou optimalizaci. Tato analýza patří mezi molekulárně diagnostické metody, jejichž citlivost vyplývá z citlivosti fragmentační analýzy prováděné pomocí kapilární elektroforézy. Domnívám se, že mnou navržený metodický postup je možné s úspěchem použít pro studium genetické diverzity nejen u plemen československý vlčák, ale i u ostatních plemen. Z praktického kynologického hlediska bych chtěla poznamenat, že genetické analýzy, jejichž výsledkem je nastolení otázek, zdali původ konkrétního jedince odpovídá rodokmenu, jsou velice choulostivým tématem zejména pro majitele a chovatele. Jsem si dobře vědoma toho, že již pouhé nastínění možných problémů spojených s původem zvířat může negativně ovlivnit úspěšnost daného jedince v další reprodukci. Z důvodů maximální eliminace možného poškození pověsti jednotlivých chovatelů a chovatelských stanic jsou veškeré údaje uvedené v diplomové práci zcela anonymní a jednotlivá zvířata zde vystupují pouze pod číselnými kódy.

Domnívám se, že molekulární genetika v současné době není pouhou metodou genetického výzkumu, ale že výsledky molekulárních analýz přinesou velice důležité informace samotným chovatelům. O praktickém využití molekulární genetiky svědčí velké množství servisních laboratoří nejen ve světě ale i v České republice. Za zcela nutné považuji, aby samotní chovatelé pochopili důležitost genetických analýz pro plemeno a aby sami byli schopni přijmout výsledky prováděných analýz a dokázali je správně aplikovat v chovatelské praxi.

8. Přehled použité literatury

- Albetrs, B., Bray, D., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Robetrs, K., Walter, P., 2005: Základy buněčné biologie. Espero, Ústí nad Labem, 630s. ISBN 80-902906-2-0.
- Altet, L., Francino, O., Sánchez, A., 2001: Microsatellite Polymorphism in Closely Related Dogs. *The Journal of Heredity*. 92. (3). 276-279.
- Andersone, Ž., Lucchini, E., Randi, E., Ozoliņš, J., 2002: Hybridization between wolves and dogs in Latvia as documented using mitochondrial and microsatellite DNA markers. *Mammalian Biology*. 67. 79-90.
- Anděra, M., Dvorský, P., Hošek, J., Knotek, J., Knotková, L., Postníková, V. 1999: Savci. 2, Šelmy, luskouni, hrabáči, hlodavci. Albatros, Praha. 147s. ISBN 80-00-00677-4.
- 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. 417-42.
- van Ash, B., Pinheiro, R., Pereira, R., Alves, C., Pereira, V., Gusmão, L., Amorim, A., 2010: A framework for the development of STR genotyping in domestic animal species. Characterization and population study of 12 canine X-chromosome loci. *Electrophoresis*. 30. 417-423.
- Awise, E. E., Dakin, J. C., 2004: Microsatellite null alleles in parentage analysis. *Heredity*. 93. 504–509.
- BioLib Biological Library, 2011: Vlk obecný (*Canis Lupus*) [online], (cit. 2011-08-12).
- Bobrová, O., 2003: Vyhodnocení asociací genetických markerů s užitkovostí v komerční populaci prasat, disertační práce, Mendelova zemědělská a lesnická univerzita. 75s.
- Bowling, A. T., Eggleston-Stott, M. L., Byrns, G., Clark, R. S., Dileanis, S., Wictum, E., 1997: Validation of microsatellite markers for routine horse parentage testing. *Animal Genetics*. 28. 247–252.
- Breen, M., Langford, C. F., Carter, N. P., Holmes, N. G., Dickens, H. F., Thomas, R., Suter, N., 1999: Fish mapping and identification of canine chromosomes, *J. Hered.* 90. 27–30.
- Campbell, N., Reece, J., 2006: *Biologie*. Computer press, Brno. 1332s. ISBN 80-251-1178-4.

- Čílová, D., Vejl, P., Šebková, N., Částková, M., Jurkovičová, P., Kadlecová, V., 2011: Microsatellite analysis of X and Y gonosome variability in the czechoslovakian and Saarloos wolfdog breeds. *Journal of Veterinary Behavior*. 6. (1).60-61.
- Bryja, J., Hájková, P. Conservation Genetics and its Application in studying and Conservation of Mammals In *Výskum a ochrana cicavcov na Slovensku*. VII.Bánská Bytryca: Štátna ochrana prírody. Banská Bystrica. 2006. 109 – 113.
- Bryndová M., Knoll, A. Verification Availability Microsatellites Panel for Parentage Identification of Different Canine Breeds [online], 2008, [cit. 2012-03-24]. Dostupné z: <<http://mnet.mendelu.cz>>.
- Butler, J. M., 2005: Constructing STR multiplex Assays. *Methods in Molecular Biology*. 297. 53-65.
- Císařovský, M., 2008: Pes: nekonečný příběh od pravěku do třetího tisíciletí. *Canis*. Praha, 902s. ISBN 978-80-900820-1-4.
- Červený, J., Koubek, P., Bufka, L., 2000: Velké šelmy v naší přírodě. 3. vydání. Koršach. Praha. 32s. ISBN 80-86296-03-2.
- Červený, J., 2004: Encyklopedie myslivosti. Ottovo nakladatelství v divizi Cesty. Praha, 591s. ISBN 80-7181-901-8.
- Českomoravská Kynologická Unie, 2012: Plemena – standardy [online], [cit. 2011-08-12]. Dostupné z: <www.cmku.cz>.
- Dostál, J., 1995: Chov psů: genetika v kynologické praxi. Dona. České Budějovice, 206 s. ISBN 80-85463-58-X.
- Dostál, J., 2007: Genetika a šlechtění plemen psů. Dona. České Budějovice, 261s. ISBN 978-80-7322-104-1.
- Eggleston, M. L., Irion, D. N., Schaffer, A. L., Hughes, A. A., Draper, J. E., Robertson, K. R., Milon, L. V., Pedersen, N. C., 2002: PCR Multiplexed Microsatellite panels to Expedite Canine Analysis. *Animal Biotechnology*.13. (2). 223-235.
- Findejs, J., Hanzlík, P., Hartl, K., Horák, F., Růžička, P., 1998: Česká národní plemena psů. Plot. Praha, 187s. ISBN 80-238-2833-9.
- Francisco, L. V., Langston, A. A., Mellersh, C. S., Neal, C. L., Ostrander, E. A., May, A., 1996: A class of highly polymorphic tetranucleotide repeats for canine genetic mapping. *Mamm. Genome*. 7.(5). 359-62.
- Gagliardi, R., Llambí, S., García, C., Arruga, M. V., 2011: Microsatellite characterization of Cimarron Uruguayo dogs. *Genetic Molecular Biology*. 34, (1). 165-168.

- Gaisler, J., Zima, J., 2007: Zoologie obratlovců. Academia. Praha, 692 s. ISBN 978-80-200-1484-9.
- Gingerich, P. D., 1983: Systematics of Early Eocene Miacidae (Mammalia, Carnivora) In the Clark's Fork Basin, Wyoming. University of Michigan Museum of Paleontology. 26, 197-225.
- Godinho, R., Llaneza, L., Blanco, J. C., Lopes, S., Álvares, F., García, E. J., Palacios, Y., Tategón, J., Ferrand, N., 2011: Genetic evidence for multiple events of hybridization between wolves and domestic dogs in the Iberian Peninsula. *Molecular Ecology*. 20. (24). 5154-66.
- Hartl, K., Jedlička, J. 1996: Československý vlčák. LOBA, Praha, 79s. ISBN 80-85853-66-3.
- Henke, L., Fimmers, R., Josephi, E., Cleef, S., Dülmer, E., Henke, E., 1999: Usefulness of conventional blood groups, DNA-minisatellites, and short tandem repeat polymorphisms in paternity testing: a comparison. *Forensic Science International*. 103. (2). 133-142.
- Chistiakov, D. A., Hellemans, B., Volckaert, B., 2006: Microsatellites and their genomic distribution, evolution, function and applications. *Aquaculture*. 255. (1-4). 1-29.
- Chloupek, O., 2000: Genetická diverzita, šlechtění a semenářství, 2.vydání. Praha, 311s. ISBN 80-200-0779-2.
- Cho, G. J., 2005: Microsatellite Polymorphism and Genetic Relationship in Dog Breeds in Korea, *Journal Animal Science*. 18. 1071-1074.
- Ichikawa, Y., Takagi, K., Tsumagari, S., Ishihama, K., Morita, M., Kanemaki, M., Takeishi, M., Takahashi, H., 2001: Canine Parentage Testing Based on Microsatellite Polymorphisms, *Journal of Veterinary Medical Science*. 63. (11). 1209-1213.
- Irion, D. N., Schaffer, A. L., Famula, T. R., Eggleston, M. L., Hudghes, S. S., Pedersen, N. C., 2003: Analysis of Genetic Variation in 28 Dog Breed Populations With 100 Microsatellite Markers. *Journal of Heredity*. 94. (1). 81-87.
- Jakubec V. Bezdíček, J., Louda, F., 2010: Selekcce - inbríding – hybridizace. *Agrovýzkum. Rapotín*. 382s. ISBN 978-80-87144-22-0.
- Kenis, K., 2003: The use of molecular markers in apple breeding: genotype identification and study of tree architecture. *Dissertationes de agricultura : Doctoraatsproefschrift*. Leuven: Katholieke Universiteit. 194s.

- Kim, K. S., Tanabe, Y., Park, C. K., 2001: Genetic Variability in East Asian Dogs Using Microsatellite Loci Analysis. The American Genetic Association. 92. 398–403.
- Korzun, V., 2002: Use of molecular markers in cereal breeding. Cellular & Molecular Biology Letters. 7. (2B). 811-820.
- Kraic, J., 2005: Možná úloha nekódujúcich sekvenci v regulácii expsie génov. In: Progres v biológii: Zborník referátov z medzinárodnej vedeckej konferencie 4. Biologické dni. Nitra: FPV UKF v Nitre. 508s. ISBN 80-8050-864-X.
- Kreutzer, R., Kreutzer, M, Leeb, T., Baumgärtner, W., 2008: Rapid and accurate GM1-gangliosidosis diagnosis using a parentage testing Microsatellite, Molecular and Cellular Probes. 22. 252–254.
- Kubišta, M., Andrade, J., Bengtsson, M., Forootan, S., Jonák, J., Lind, K., Sindelka, R., Sjöback, R., Sjörgen, B., Strömbom, L., Ståhlberg, A., Zoric, N., 2006: The real-time polymerase chain reaction. Molecular Aspects Medicine. 27. (2-3). 95-125.
- Mellersh, C. S., Hitte, C., Richman, M., Vignaux, F., Priat, C., Jouquand, S., Werner, P., 1999: An integrated linkage-radiation hybrid map of the canine genome. Mammalian Genome. 11. 120–130.
- Muñoz-Fuentes, V., Darimont, C. T., Paquet, P. C., Leonard, J. A., 2010: The genetic legacy of extirpation and re-colonization in Vancouver Island wolves. 11. 547-556.
- Olschyna, U., Jaeger, C., König, M., Engel, H., 2011: Development of a 10-plex microsatellite system for dog typing [online], [cit. 2012-04-5]. Dostupné z: <<http://www.qiagen.com>>.
- Parra, S. Méndez, J., Cañón, J., Dunner, S., 2008: Genetic differentiation in pointing dog breeds inferred from microsatellites and mitochondrial DNA sequence. Animal Genetics. 39. 1–7.
- Räber, H., 1994: Plemena psů: Encyklopedie - původ, předkové, cíle chovu, schopnosti a užití. Díl 1, Pastervečtí a honáčtí psi, ovčácká plemena, dogovitá plemena, pinčové, špicové, severští psi, psi šensi, trpasličí plemena, pudl, dalmatin. Blesk, Ostrava. 768 s. ISBN 80-85606-55-0.
- Rogalska-Niznik, N., Szczerbal, I., Dolf, G., Schläpfer, J., Schelling, C., Switosnki, M., 2003: Canine-Derived Cosmid Probes Containing Microsatellites Can Be Used in Physical Mapping of Arctic Fox (*Alopex lagopus*) and Chinese Raccoon Dog

- (*Nyctereutes procyonoides procyonoides*) Genomes. *Journal of Heredity*. 94. (1). 89–93.
- Ruvinsky, A., Sampson, J., 2001: *The genetics of the dog*. CABI. Wallingford, 564s. ISBN 0-85199-520-9.
- Sambrook, J., Maniatis, T., Fritsch, E. 1989: *Molecular cloning. A laboratory manual* (Second edition), Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York. 1659.
- Sargan, D. R., Aguirre-Hernandez, J., Galibert, F., Ostrander, E. A., 2007: An Extended Microsatellite Set for Linkage Mapping in the Domestic Dog. *Journal of Heredity*. 98. (3). 221–231.
- Schlötterer, Ch., 2004: The evolution of molecular markers — just a matter of fashion?. *Nature Reviews Genetics*. 5. 63-69.
- Snustad, D. P., Simmons, M. J., 2009: *Genetika*. Masarykova univerzita, Brno. 871s. 978-80-210-4852-2.
- Sun, G., McGarvey, S. T., Bayoumi, R., Mulligan, C. J., Barrantes, R., Raskin, S., Zhong, Y., Akey, J., Chakraborty, R., Deka, R., 2003: Global genetic variation at nine short tandem repeat loci and implications on forensic genetics. *European Journal of Human Genetics*. 11. 39 – 49.
- Sunnuck, P., Wilson, A. C. C., Behegaray, L. B., Zenger, K., French, J., Taylor, A. C., 2000: SSCP is not so difficult: the application and utility of single-stranded conformation polymorphism in evolutionary biology and molecular ecology. *Molecular Ecology*. 9. 1699–1710.
- Statistics on the Czechoslovakian Wolfdogs breed [online], [cit. 2011-07-12]. Dostupné z: <<http://www.amicale-chien-loup-tchecoslovaque.com/cgi-bin/form.py>>.
- Swenson, L., 2001: *Population studies on genetic diseases in the dog*. Swedish university of agricultural sciences. Uppsala, 100s. ISBN 91-576-5822-6.
- Šebková, N. I. kapitola - *Fylogenetický původ psa, předkové a příbuzní* [online]. Publikováno 8. 7.2010 [cit. 2012-03-12]. Dostupné z :<<http://www.ifauna.cz>>.
- Šeda, O., Liška, F., Šedová, L., 2010: *Aktuální genetika. Multimediální učebnice lékařské biologie genetiky a genomiky* [online], [cit. 2012-01-01] Dostupné z: <<http://biol.lf1.cuni.cz/ucebnice/index.htm> >.
- Šmarda, J., Doškař, J., Pantůček, R., Růžičková, V., Koptíková, J., 2005: *Metody molekulární biologie*, MU Brno-Kaví Hora. Brno. 188s. ISBN 80 -210-3841-1.

- Tamaki, K., Monckton, D. G., MacLeod, A., Neil, D. L., Allen, M., Jeffreys, A. J., 1992: Minisatellite variant repeat (MVR) mapping: analysis of 'null' repeat units at D1S8. *Human Molecular Genetics*. 1. (6). 401—406.
- Uhlenbroeková, Ch., 2009: *Život zvířat*. Knižní klub. Praha. 512 s. ISBN 978-80-242-2499-2.
- Verhoef-Verhallen, E., 2007: *Psi: velký obrazový lexikon*. Rebo. Čestlice. 544 s. ISBN 978-80-7234-88-6.
- Vilá, C., Walker, C., Sundqvist, A. K., Falgstad, O., Andersone. Z., Casulli, A., Kojola, I., Valdmann, H., Halverson, J., Ellegren, H. 2003: Combined use of maternal, paternal and bi-parental genetic markers for the identification of wolf–dog hybrids. *Heredity*. 90. 17-24.
- Vierstraete, A., 2001: PCR to amplify the requested gene. University of Ghent [online], [cit. 2012-04-107]. Dostupné z: <<http://allserv.rug.ac.be/~avierstr/>>.
- Vivodík, M., Gálová, Z., 2010: Study of Wheat (*Triticum aestivum L.*) Genetic Diversity using microsatellite Markers, *Potravinářstvo*. 4. 537-544.
- Wayne, K. R., Ostrander, E. A., 1999: Origin, genetic diversity, and genome structure of the domestic dog. *BioEssays*. 21. 247–257.
- Wang, X., 1993: Transformation from Plantigrady to Digitigrady: Functional Morphology of Locomotion in *Hesperocyon (Canidae: Carnivora)*. New York: American Museum novitates. ISSN 003-0082.
- Weissenberger, M., Reichert, W., Mattern, W. A., 2011: Multiplex PCR assay to differentiate between dog and red fox. *Forensic Science International: Genetics*. 5. (5). 411-4.
- Wolfdog.org [online], [cit. 2011-07-12]. Dostupné z: <www.wolfdog.org>.
- Wright, S. 1922: Coefficients of inbreeding and relationship. *Amer. Nat.* 56. 330-338.
- Xiu-Lin Huang', Tamaki, K., Yamamoto, T., Yoshimoto, T., Mizutani, M., Leong, Y., K., Tanaka, M., Nozawa, H., Uchihi, R., Katsumata, Y., 1999: Evaluation of the paternity probability on an application of minisatellite variant repeat mapping using polymerase chain reaction (MVR-PCR) to paternity testing. *Legal Medicine*. 1. 3743.
- Yamamoto, T., Tamaki, K., Huang, X. L., Yoshimoto, T., Mizutani, M., Uchihi, R., Katsumata, Y., Jeffreys, A. J., Phil, D., 2001: The Application of Minisatellite Variant Repeat Mapping by PCR (MVR-PCR) in a Paternity Case Showing False Exclusion Due to STR Mutation. *Forensic Scientist*. 46. (2). 374-378.

- Zajc, I., Mellersh, C. S., Sampson, J., 1997: Variability of canine microsatellites within and between different dog Leeds. *Mammalian Genome*. 8. (3). 182-185.
- Zajc, I., Sampson, J., 1999: Utility of Canine Microsatellites in Revealing the Relationships of Pure Bred Dogs. *Journal of Heredity*. 90. (1). 104-107.

9. Seznam použitých zkratek

AFLP	délkový polymorfismus amplifikovaných fragmentů (Amplified Fragment Length Polymorphism)
bp	počet párů bází v molekule nukleové kyseliny
dATP	deoxyadenosin-5'-trifosfát
dCTP	deoxycytidin-5'-trifosfát
dGTP	deoxyguanin-5'-trifosfát
dTTP	deoxytymidin-5'-trifosfát
ddATP	dideoxyadenosin-5'-trifosfát
ddCTP	dideoxycytidin-5'-trifosfát
ddGTP	dideoxyguanin-5'-trifosfát
ddTTP	dideoxytymidin-5'-trifosfát
DNA	deoxyribonukleová kyselina
dNTP	deoxynukleotid-5'-trifosfát (obecně)
dsDNA	dvouřetězcová molekula DNA (Double-Stranded DNA)
PCR	polymerázová řetězová reakce (Polymerase Chain Reaction)
RAPD	náhodná amplifikace polymorfní DNA (Random Amplified Polymorphic DNA)
RFLP	délkový polymorfismus restrikčních fragmentů (Restriction Fragment Length Polymorphism)
RNA	ribonukleová kyselina
SSR	repetice jednotlivých sekvencí (Single Sequence Repeat)

10. Přílohy

Příloha 1: Vlk obecný (*Canis lupus*) ZOO Praha



Foto: Jana Lněničková, 2010

Příloha 2: Standard plemene československý vlčák

(upraveno podle: Českomoravské Kynologické Unie)

FEDERATION CYNOLOGIQUE INTERNATIONALE

Secretariat General: 13, Place Albert I – B 6530 THUIN (Belgie)

F.C.I.-Standard č. 332 / 03.09.1999 / GB

ČESKOSLOVENSKÝ VLČÁK

(Československý vlčák)

ZEMĚ PŮVODU: bývalé Československo

PATRONACE: Slovenská republika

DATUM PUBLIKACE ORIGINÁLNÍHO PLATNÉHO STANDARDU:03.09.1999

POUŽITÍ: pracovní pes.

ZAŘAZENÍ PODLE F.C.I.:

Skupina 1 - ovčáčtí a honáčtí psi (kromě švýcarských salašnických psů)

Sekce 1 - ovčáci

Zkouška z výkonu.

STRUČNÉ HISTORICKÉ SHRNU TÍ: V roce 1955 byl v tehdejší m Československu uskutečněn biologický experiment - křížení německého ovčáka s karpatským vlkem. Experiment prokázal, že potomstvo vzešlé ze spojení psa německého ovčáka a vlčice, stejně jako potomstvo vlka a feny německého ovčáka, je možno vychovat. Velká většina jedinců z těchto spojení splňovala genetické nároky na pokračování chovu. V roce 1965, po skončení experimentu, byl vytvořen plán chovu tohoto nového plemene, který zahrnoval zkombinování užitečných vlastností vlka s příznivými vlastnostmi psa. V roce 1982 byl československý vlčák uznán ústředním výborem chovatelských organizací tehdejšího Československa jako národní plemeno.

CELKOVÝ VZHLED: pevná konstituce. Nadprůměrná velikost, obdélníkový rámec. Tvarem těla, pohybem, texturou srsti, barvou srsti a masky je podobný vlku.

DŮLEŽITÉ POMĚRY:

délka těla : kohoutková výška = 10 : 9.

délka čenichové partie : délka mozkovny = 1 : 1,5.

POVAHA / TEMPERAMENT: živý, velmi aktivní, vytrvalý, učenlivý, s rychlými reakcemi. Nebojácny a odvážný. Nedůvěřivý. Velmi oddaný svému pánovi. Dobře odolává rozmarům počasí. Všestranně využitelný.

HLAVA: symetrická, dobře osvalená. Při pohledu ze strany a shora tvoří tupý klín. Dobře vyjadřuje pohlaví.

MOZKOVNA:

Lebka: při pohledu ze strany a zepředu je čelo lehce klenuté. Nevyznačená čelní vráska. Týlní kost jasně zřetelná.

Stop: střední.

OBLIČEJOVÁ ČÁST:

Nosní houba: oválného tvaru, černá.

Tlama: suchá, ne široká; rovný nosní hřbet.

Pysky: těsně přiléhající. Uzavřené koutky úst. Okraje pysků jsou černé.

Čelisti/Zuby: čelisti silné a symetrické. Dobře vyvinutý chrup, zvláště špičáky. Nůžkový nebo klešťový skus se 42 zuby podle obvyklého zubního vzorce. Pravidelné vsazení zubů.

Líce: suché, dostatečně osvalené, nijak výrazně nevystupují.

Oči: malé, šikmo uložené, jantarově zbarvené, s dobře přiléhajícími víčky.

Uši: vztyčené, tenké, trojúhelníkové, krátké (tj. ne delší než 1/6 kohoutkové výšky). Boční okraje nasazení uší a vnější koutky očí jsou ve stejné linii. Linie spuštěná kolmo ze špičky ucha prochází těsně podél hlavy.

KRK: suchý, dobře osvalený. V klidu svírá s horizontálou úhel do 40°. Krk musí být dostatečně dlouhý tak, aby se nos skloněné hlavy dotýkal země.

TRUP:

Hřbetní linie: plynulý přechod krku v trup. Hřbetní linie je mírně spadající.

Kohoutek: dobře osvalený, vyznačený. Nesmí narušovat plynulost hřbetní linie.

Hřbet: pevný a rovný.

Bedra: krátká, dobře osvalená, ne příliš široká, mírně spadající.

Zád: krátká, dobře osvalená, ne příliš široká, mírně spáditá.

Hrudník: symetrický, dobře osvalený, prostorný, hruškovitého tvaru, zužující se směrem k hrudní kosti. Hloubka hrudníku nedosahuje až k úrovni loktů. Špička hrudní kosti nepřesahuje ramenní klouby.

Spodní linie a břicho: napjaté, vtažené břicho. Mírně vtažené slabiny.

OCAS: vysoko nasazený, nesený svěšený přímo dolů. V afektu šavlovitě zvednutý.

KONČETINY:

HRUDNÍ KONČETINY: hrudní končetiny jsou rovné, silné, suché a v užším postoji s mírně vytočenými tlapkami.

Plece: ramenní lopatka je umístěna poměrně daleko vpředu, dobře osvalená. Svírá s horizontálou úhel téměř 65 stupňů.

Nadloktí: silně osvalené, svírá s ramenní lopatkou úhel 120 až 130 stupňů.

Lokty: těsně přiléhající, nejsou vytočené dovnitř ani ven, dobře vyznačené, pohyblivé. Nadloktí a předloktí svírají úhel asi 150 stupňů.

Předloktí: dlouhé, suché a rovné. Délka předloktí a nadprstí je 55 % kohoutkové výšky.

Kloub nadprstí: pevný, pružný.

Nadprstí: dlouhé, svírá úhel nejméně 75 stupňů se zemí. V pohybu mírně pruží.

Přední tlapy: velké, vytočené mírně ven. Podlouhlé klenuté prsty a silné, tmavé dráčky. Dobře vyznačené, pružné, tmavé polštářky.

PÁNEVNÍ KONČETINY: mohutné. Pánevní končetiny v postoji rovnoběžné. Myšlená vertikální linie, spuštěná z hrbolku kosti sedací, prochází středem hlezenního kloubu. Paspárky jsou nežádoucí a musí se odstraňovat.

Stehno: dlouhé, dobře osvalené. S pánví svírá úhel 80 stupňů. Kyčelní kloub je pevný a pružný.

Koleno: silné a pružné.

Bérec: dlouhý, suchý, dobře osvalený. Svírá úhel asi 130 stupňů s hlezem.

Hlezenní kloub: suchý, pevný, pružný.

Hlezno: dlouhé, suché. Téměř kolmé k zemi.

Zadní tlapy: podlouhlé, klenuté prsty se silnými tmavými drápkami. Výrazné polštářky.

POHYB: harmonický, lehkonožý, prostor dobře pokrývající klus, při němž se končetiny pohybují co nejnižší nad zemí. Hlava a krk jsou téměř v horizontální linii. V chodu pohyb mimochodem.

KUŽE: pružná, přiléhající, bez vrásek, nepigmentovaná.

OSRSTĚNÍ:

SRST: rovná a uzavřená. Zimní a letní srst se velmi liší. V zimě převládá velmi hustá podsada, která spolu s krycí srstí vytváří husté pokrytí celého těla. Srst musí pokrývat břicho, vnitřek stehna, šourek, vnitřní část ucha a plochu mezi prsty. Dobře osrstěný krk.

BARVA: žlutavě šedá až stříbrošedá, s charakteristickou světlou maskou. Světlá srst také na spodní straně krku a předhrudí. Povolena je i tmavě šedá barva se světlou maskou.

VÝŠKA A HMOTNOST:

Výška v kohoutku: psi nejméně 65 cm, feny nejméně 60 cm.

Hmotnost: psi nejméně 26 kg, feny nejméně 20 kg.

VADY: jakákoliv odchylka od výše uvedených znaků má být považována za vadu a vážnost, s níž je vada posuzována, má být v přímém poměru k jejímu stupni.

- příliš těžká nebo příliš lehká hlava.

- ploché čelo.

- chybějící dva PM1 (třenové zuby 1) nebo oba M3 (stoličky 3) nejsou penalizovány. Naproti tomu chybějící jeden M3 a dva PM1 nebo chybějící jeden PM1 a oba M3 jsou považovány za vadu.

- tmavě hnědé, černé nebo různě zbarvené oči.

- hrubé ucho. Ucho nasazené nízko nebo vysoko.

- v klidu vysoko nesený krk, v postoji nízko nesený krk.

- nevyznačený kohoutek.

- netypická hřbetní linie.

- dlouhá zád'.
- dlouhý ocas, nízko nasazený a nesprávně nesený.
- příliš malé nebo příliš velké zaúhlení hrudních končetin.
- slabé nadprstí.
- příliš malé nebo příliš velké zaúhlení pánevních končetin. Nedostatečné osvalení.
- slabě vyznačená maska.
- krátký krok, vlnivý pohyb.

VYLUČUJÍCÍ VADY:

- agresivita nebo přílišná bázlivost.
- nesoulad proporcí.
- vady chování a povahy.
- nestandardní hlava.
- chybějící zuby (kromě 2 PM1 a M3), nepravidelný skus.
- nestandardní tvar a uložení očí.
- nestandardní nasazení a tvar uší.
- lalok.
- silně spáditá zád'.
- nestandardní hrudník.
- nestandardní nasazení a nesení ocasu.
- chybné a nestandardní postavení hrudních končetin.
- odstávající a nestandardní srst.
- barvy jiné než uvedené ve standardu.
- volné šlachy.
- nestandardní pohyb.

Jedinci, vykazující fyzické nebo povahové abnormality, musí být diskvalifikováni.

Pozn.: Psi (samci) musí mít dvě zjevně normálně vyvinutá varlata, plně sestouplá v šourku.

Příloha 3: Československý vlčák (pes)



Zdroj: foto Ing. Daniela Čílová

Příloha 4: Československý vlčák (fena)



Zdroj: foto Ing. Daniela Čílová

Příloha 5: Standard plemene Sarloosův vlčák

(upraveno podle: Českomoravská Kynologická Unie,)

FEDERATION CYNOLOGIQUE INTERNATIONALE

Secretariat General: 13, Place Albert I – B 6530 THUIN (Belgie)

F.C.I.-Standard č. 311 / 22.01.1999 / GB

SAARLOOSŮV VLČÁK

(Saarlooswolfhond)

ZEMĚ PŮVODU: Nizozemí

DATUM PUBLIKACE ORIGINÁLNÍHO PLATNÉHO STANDARDU:22.01.1999

POUŽITÍ: Saarloosův vlčák nebyl šlechtěn se záměrem konkrétního použití. Má vlastnosti, které mu dovolují být věrným a oddaným společníkem a domácím psem.

ZAŘAZENÍ PODLE F.C.I.:

Skupina 1 - ovčáctí a honáctí psi (kromě švýcarských salašnických psů)

Sekce 1 - ovčáci

Bez zkoušky z výkonu.

STRUČNÉ HISTORICKÉ SHRNU TÍ: Leendert Saarloos (1884 – 1969) miloval přírodu i psy. Došel však k názoru, že psi se stali příliš polidštěnými, a proto se jakožto milovník plemene německý ovčák rozhodl vrátit tomuto plemeni původní přirozené vlastnosti a zlepšit tím jeho pracovní schopnosti. Křížil tedy psa německého ovčáka jménem Gerard van der Fransenum, což byl pes klasického pruského typu, s Fleuri, vlčicí pocházející ze sibiřské větve evropského typu (1932).

Křížení zpět na otce mu dalo základnu zvířat se čtvrtinou vlčí krve. V průběhu další experimentální fáze s přísnou selekcí bylo vytvořeno nové plemeno – „evropský vlčák“. Vybraní jedinci tohoto nového plemene dobře sloužili jako průvodci slepců, nejprve tedy byli považováni za vhodné pro tuto práci. Kvůli zvyšování podílu vlčí krve se však užitečné vlastnosti zděděné po předku Gerardovi postupně ztrácely a ukazovalo se, že plemeno nebude vhodné ani jako pracovní pes, ani jako průvodci slepců. Odkaz Leenderta Saarloose, ne pracovní pes, ale pes s vlastnostmi téměř přírodními, byl uznán

jako plemeno v roce 1975. Tehdy bylo plemeno pojmenováno Saarloosův vlčák, ke cti svého stvořitele.

Od té doby zastupuje toto plemeno holandská společnost Saarloosova vlčáka (Nederlandse Vereeniging van Saarlooswolfhonden), která vytvořila i tento nový standard.

CELKOVÝ VZHLED: Saarloosův vlčák je silně stavěný pes, jehož vnější vzhled – stavba těla, pohyb a srst – připomíná vlka. Jeho tělesná stavba je vyvážená, má poměrně dlouhé končetiny, aniž by vypadaly příliš dlouhé. Rozdílné druhotné pohlavní znaky jsou u psů i fen dobře vyjádřené.

DŮLEŽITÉ POMĚRY: Saarloosův vlčák je delší než je jeho výška. Délky horní čelisti a mozkovny jsou v poměru 1 ku 1.

POVAHA / TEMPERAMENT: živý pes se spoustou energie a hrdou nezávislou povahou. Poslouchá jen z vlastní vůle, není submisivní. Je velmi oddaný a věrný svému pánovi. Vůči cizím lidem je rezervovaný a poněkud nedůvěřivý. Rezervovanost a vlčí sklon utíkat v neznámých situacích jsou pro plemeno typické a měly by být zachovány jako charakteristické vlastnosti. Když se k Saarloosovu vlčákovi přibližuje cizí člověk, měl by mít jisté porozumění a pochopení pro jeho chování, rezervovanost a sklon utíkat, tyto vlastnosti jsou dědičné. Prudký, nežádoucí přístup cizího člověka může vést až k nepřekonatelné touze utéci. Potlačování této touhy, například omezováním volnosti psa na vodítku, může vést k nervóznímu chování.

HLAVA: hlava má připomínat vlčí a velikost hlavy má být v harmonickém poměru k trupu. Při pohledu ze strany a shora je hlava klínovitá. Linie od tlamy k dobře vyvinutému jařmovému oblouku je velmi charakteristická. Spolu se správným tvarem a uložením oka dodává tato linie žádoucí vlčí vzhled.

MOZKOVNA:

Lebka: lebka je plochá a široká. Neměla by však být příliš široká, protože to ovlivňuje typický klínovitý tvar. Týlní hrbolek a oční jamka nesmí být vystupující. Nadočnicové oblouky se spojují s lebkou v plynulé linii.

Stop: přechod od silné tlamy k lebce musí tvořit slabý stop.

OBLIČEJOVÁ ČÁST:

Nos: nosní houba dobře pigmentovaná. Rovný nosní hřbet.

Pysky: dobře uzavřené, těsně přiléhající.

Horní čelist: nesmí v poměru k lebce vypadat hrubá. Příliš hrubá tlama ruší typický vlčí vzhled.

Dolní čelist: nevýrazná.

Čelisti/Zuby: horní a spodní čelist jsou dobře vyvinuté. Silný a úplný chrup, nůžkový skus. Těsný nůžkový skus je přijatelný.

Oči: nejlépe žluté, mandlového tvaru. Posazené lehce šikmo, nevystupující a nikoliv kulaté, s dobře přiléhajícími očními víčky. Výraz je pozorný, rezervovaný, ale nikoliv bázlivý. Oči jsou pro plemeno velmi typické, protože podtrhují vlčí vzhled. Žádoucí vzhled je dosažen jen světlým okem. Velká pozornost musí být věnována barvě, tvaru a správnému uložení oka v lebce. U starších psů může žlutá barva oka tmavnout, ale původní dispozice k žluté barvě má být udržena. Dispozice k hnědé barvě je méně žádoucí. Oční jamka přechází v lebku v plynulé linii. Příliš vyjádřená oční jamka spolu s vyjádřenými nadočnicovými oblouky a vyznačeným stopem jsou nežádoucí.

Uši: středně velké, masité, trojúhelníkové, se zaoblenou špičkou. Osrstěný vnitřek ucha. Ucho je nasazené v úrovni očí. Uši jsou velmi pohyblivé a vyjadřují emoce a pocity psa. Nežádoucí jsou příliš špičaté uši nebo příliš vysoko nasazené uši. Uši nasazené příliš široce ruší typický vzhled hlavy a jsou proto méně žádoucí.

KRK: suchý, dobře osvalený, plynule přecházející v hřbet. Stejně plynulá je linie hrdla a hrudníku. Krk může být ozdoben krásným límcem srsti, zvláště v zimním období. Kůže hrdla není volná. V uvolněném klusu je hlava a krk Saarloosova vlčáka typicky v téměř horizontální linii.

TRUP: délka trupu Saarloosova vlčáka je větší než jeho výška.

Hřbet: rovný a silný.

Hrudní koš: normálně klenutý.

Hrudník: plynulá linie hrudního koše dosahuje nejvýše k loktům. Hrudník a vzdálenost mezi končetinami jsou při pohledu zřepředu středně široké. Příliš mohutný hrudník je nežádoucí, protože narušuje celkový obrys psa, který je pro tohoto klusáka typický. Obrys je spíše štíhlý a velmi vlčí.

Spodní linie a břicho: napjaté, s mírným vtažením břicha.

OCAS: široký a bohatě osrstěný v kořeni a dosahující nejméně k hleznu. Zdá se poněkud nízko nasazený, což je často ještě zdůrazněno malým prohnutím v kořeni. Ocas je nesen lehce prohnutý do šavlovitého tvaru nebo téměř rovný. V afektu nebo v klusu může být nesen poněkud výše.

KONČETINY:

HRUDNÍ KONČETINY: končetiny jsou rovné a dobře osvalené. Kosti jsou v průřezu oválné a ne příliš hrubé. Končetiny jsou v poměru k trupu poměrně gracilní.

Ramenní lopatka: dostatečně široká a dlouhá. Normální zaúhlení asi 30° k vertikále, nikoliv přehnané.

Nadloktí: stejné délky jako ramenní lopatka, zaúhlení mezi ramenní lopatkou a nadloktím je přiměřené, nikoliv přehnané.

Lokty: těsně přiléhající k hrudi, ale ne přitlačené příliš těsně. Díky zaoblení hrudního koše a správné pozici ramenní lopatky a nadloktí je vzdálenost mezi hrudními končetinami přiměřeně široká.

Přední tlapy: zaječí tlapy, dobře osvalené a klenuté, se silně vyvinutými polštářky. Toto, spolu se silnými zápěstními klouby a mírně skloněnými nadprsty, umožňuje dobrý pružný pohyb. V postoji je povoleno lehké vytočení tlapek.

PÁNEVNÍ KONČETINY: normální poloha pánve. Díky nízkému nasazení ocasu, které je často zdůrazněno lehkým prohnutím, se pánev zdá být uložena šikměji. Úhlení pánevních končetin je v rovnováze se zaúhlením hrudních končetin. Lehký pohyb, typický pro plemeno, je velmi závislý na správném úhlení kolene a hlezna. I velmi malé odchylky tento typický pohyb ruší. V postoji jsou povolena lehce sbíhavá hlezna (kravský postoj).

Stehno: normální délky a šířky, silně osvalené.

Koleno: s nepřehnaným zaúhlením.

Hlezenní kloub: zaúhlení nesmí být přehnané. Kosti a svaly dovolují optimální napětí hlezenních kloubů.

Hlezno: dostatečně dlouhé (ne krátké), přiměřeně strmé.

Zadní tlapy: dobře vyvinuté, dobře klenuté.

POHYB: Saarloosův vlčák je typický neúnavný klusák, který svým vlastním tempem snadno uběhne dlouhé vzdálenosti. Svým přirozeným pohybem se jen sotva unaví, čímž připomíná vlka. Saarloosův vlčák se velmi liší od jiných plemen lehkonožým pohybem. Správný pohyb velmi závisí na detailech stavby těla, zvláště na správném úhlení končetin. Ve volném, nesvázaném klusu nese Saarloosův vlčák hlavu a krk v téměř horizontální linii - v této poloze je uložení očí a klínovitý tvar hlavy obzvlášť typické. V klusu, charakteristickém pohybu plemene, nevykazuje pes ani velký předkrok ani přílišný posun, které by rušily lehkost pohybu, šetřícího energii.

OSRSTĚNÍ:

SRST: letní srst se velmi liší od zimní srsti.

V zimě převládá podsada, která spolu s pesíky krycí srsti tvoří bohatou srsti, pokrývající celé tělo a vytvářející výrazný límec kolem krku. V letní srsti převládá krycí srst. Teplotní změny na podzim a v zimě mají velký vliv na podsadu, ale alespoň dispozice k podsadě musí být vždy zřejmá. Břicho, vnitřní strana stehen a šourek musí být pokryty srstí.

BARVA: barvy srsti jsou:

- od světle po tmavě vlkošedou.
 - od světle po tmavě zvěřinově hnědou, tzv. „bos“ hnědá (lesní hněd’).
 - od světle krémově bílé po bílou.
 - pigmentace nosní houby, očních víček, pysků a drápků má být u vlkošedých a bílých jedinců černá. U „bos“ hnědé nebo krémově bílé játrová. Srst je světlejší na spodní části těla, vnitřní straně končetin a praporecích na stehnech.
- Vlkošedí a „bos“ hnědí jedinci mají tmavší barvu na vnější straně končetin. Mají mít také výraznou masku.

VÝŠKA:

Výška v kohoutku: psi od 65 do 75 cm, feny od 60 do 70 cm.

Malé odchylky směrem nahoru jsou přijatelné.

VADY: jakákoliv odchylka od výše uvedených znaků má být považována za vadu a vážnost, s níž je vada posuzována, má být v přímém poměru k jejímu stupni.

HLAVA

- příliš kulaté, vystupující oči.
- příliš výrazné oční jamky, takže nadočnicové oblouky nepřecházejí plynule v mozkovnu. To se často spojuje s výrazným stopem a příliš kulatýma očima.
- příliš vysoko nasazené uši nebo špičaté uši.
- uši směřující příliš výrazně do stran.

TRUP

- příliš hluboký, příliš krátký.

OCAS

- zatočený ocas. Ocas nesený nad hřbetem.

KONČETINY

- příliš hrubá kostra.

SRST

- méně žádoucí jsou nedostatečně výrazné barvy.
- tmavé sedlo vytvořené kvůli špatnému rozložení tmavých pesíků.

VYLUČUJÍCÍ VADY:

- agresivita nebo přílišná bázlivost.
- barva srsti jiná než uvedená ve standardu.
- jakékoliv znaky agresivity.

Jedinci, vykazující fyzické nebo povahové abnormality, musí být diskvalifikováni.

Pozn.: Psi (samci) musí mít dvě zjevně normálně vyvinutá varlata, plně sestouplá v šourku.

Příloha 6: Pufry a roztoky použité pro gelovou elektroforézu

Vzorkový pufr (Sambrook et al. 1989)

- 0,25 % bromfenolové modři - sodná sůl (Serva, SRN)
- 0,25 % xylencyanolové modři FF (Sigma, USA)
- 15,0 % ficolu (Sigma, USA)
- vše rozpustit ve sterilní 2x deionizované H₂O
- uchovávat při 4°C

10xTBE pufr (Sambrook et al. 1989)

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

1xTBE pufr (Sambrook et al. 1989)

- naředit 10xTBE pufr 1x deionizovanou H₂O
- uchovávat při 4°C

Zásobní roztok ethidium bromidu (Sambrook et al. 1989)

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

Elektrodový pufr

- 1500 ml 1xTBE
- 75 µl zásobního roztoku ethidium bromidu
- při přípravě a manipulaci pracovat v ochranných rukavicích
- pufr je určen pro okamžité použití.

1x TE (Sambrook et al. 1989)

- 10 mM Tris (pH 8) (Sigma, USA)
- 1 mM EDTA (Sigma, USA)
- pufr byl připravován jako 10x koncentrovaný zásobní roztok

Poznámka: Veškeré operace s roztoky a gely, které obsahují ethidium bromid, je nutno provádět vždy v ochranných latexových rukavicích.