

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra genetiky a šlechtění



**Možnosti a současná praxe určování paternity fretky
(*Mustela putorius furo*)**

Bakalářská práce

Autor práce: Tereza Henclová

Vedoucí práce: Ing. Petr Sedlák, Ph.D.

© 2017 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou bakalářskou práci " Možnosti a současná praxe určování paternity fretky (*Mustela putorius furo*)" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího bakalářské práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené bakalářské práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne 20. 4.2017 _____

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala vedoucímu své práce Ing. Petru Sedlákovi, Ph.D., za jeho cenné rady při zpracování této práce, její vedení a v neposlední řadě také za jeho trpělivost.

Možnosti a současná praxe určování paternity fretky (*Mustela putorius furo*)

Souhrn

Testy paternity se zabývají původem jednotlivce v rámci plemen a jsou důležitým parametrem pro zájemce o cílený chov zvířat. Fretka (*Mustela putorius furo*) se v současné době stává stále častěji vyhledávaným a oblíbeným domácím mazlíčkem. Z tohoto důvodu se v rámci jejich chovu také stále častěji objevuje příbuzenská plemenitba a poměrně velká míra dědičných chorob, což významně ovlivňuje kvalitu chovu těchto zvířat. Tato problematika je u fretek prozatím rozpracovaná a testování se v současné době příliš nevyužívá., přitom by mohlo významně ovlivnit kvalitu jejich chovu a omezit podvodné chování s cílem oklamání budoucího majitele. Paternitní testování se provádí pomocí metody PCR (polymerase chain reaction), která umožňuje rychlou amplifikaci DNA. Tato metoda porovnává STR lokusy tria matka-mládě-otec. Výhodou STR polymorfismů je dobrá rozlišovací schopnost, vysoká variabilita a snadná amplifikovatelnost pomocí metody PCR, ovšem jejich největší nevýhodou je vysoká mutační rychlost a limitovaný počet markerů v jedné reakci (maximálně 17). Výsledky STR profilování se vyjadřují indexem paternity (Pi). Ekvivalentní vyjádření Pi je procentuální v rozmezí 0% až 100%. Výsledkem je buď potvrzení, nebo vyvrácení otcovství.

Klíčová slova: Fretka, *Mustela putorius furo*, paternita, genetická analýza

Options and current practice of determining ferrets paternity (*Mustela putorius furo*)

Summary

Paternity test's dealing with the origin of individuals within breeds. It is an important parameter for those interested in the targeted livestock and lead to the improvement of their breed. Ferret (*Mustela putorius furo*) are now becoming increasingly popular and favorite pets. For this reason, as part of their breeding also been increasingly inbreeding, and relatively high rate of hereditary diseases, which significantly affects the quality of these animals. This issue is far worked in ferrets and testing is currently not used too. While could significantly affect the quality of their breeding and reduce fraudulent behavior in order to deceive the future owner. Paternity testing is carried out by PCR (Polymerase Chain Reaction), which enables rapid amplification DNA. This method compares STR loci trio mother-baby-father. STR polymorphisms advantage is good resolution, high variability and easy amplification using the PCR method, but the main disadvantage is the high mutation rate and limited number of markers in a single reaction (maximum 17). STR profiling results are expressed paternity index (Pi). Equivalent expression Pi is the percentage ranging from 0% to 100%. The result is either confirming or disproving fatherhood.

Keywords: Ferret, *Mustela putorius furo*, paternity, genetic analysis

Obsah

1	Úvod	8
2	Cíl práce	9
3	Přehled literatury	10
3.1	Fretka – základní informace a popis druhu	10
3.1.1	Taxonomie a fylogeneze	10
3.1.2	Základní charakteristika	11
3.1.2.1	Váhové údaje.....	11
3.1.2.2	Obecná morfologie.....	11
3.1.2.3	Reprodukce	12
3.1.2.4	Srst a barevné varianty	13
3.1.3	Domestikace a praktické využití	15
3.1.3.1	Rozdíly způsobené domestikací	16
3.1.4	Rozšíření na další kontinenty	17
3.1.5	Chov	17
3.2	Základní genetické údaje	18
3.2.1	Karyotyp.....	18
3.2.2	Molekulární taxonomie	19
3.2.2.1	Fylogentický strom na základě cytokinů.....	19
3.2.2.2	Fylogenetický strom Neighbour-joining	21
3.2.2.3	Fylogenetické vztahy mezi tchoři a domestikovanými fretkami.....	21
3.2.3	Genom fretky jako model pro zkoumání virových infekcí lidí	22
3.3	Testy Paternity	23
3.3.1	Historie.....	23
3.3.2	Molekulárně genetické testy	24
3.3.2.1	Molekulárně genetické testy ve vztahu ke zvířatům	25
3.3.3	Současný způsob ověřování paternity	25
3.3.3.1	Metoda PCR.....	26
3.3.3.2	Mikrosatelitní markery	26
3.3.3.3	Výskyt nulových alel.....	28
3.3.3.4	STR polymorfismy.....	28
3.3.3.5	Jednonukleotidové polymorfismy (SNP).....	29
3.3.3.6	STR nebo SNP?.....	30
3.3.4	Pravděpodobnost	30

3.3.4.1	Věrohodnostní poměr	31
3.3.4.2	Bayesova věta.....	31
3.3.4.3	Výpočet pravděpodobnosti.....	32
3.4	Paternita šelem	34
3.4.1	Paternita psů (<i>Canis lupus familiaris</i>).....	34
3.4.2	Paternita koček (<i>Felis silvestris</i>)	34
3.4.3	Paternita norka amerického (<i>Mustela vison</i>).....	35
3.5	Paternita fretek	36
3.5.1	Charakterizace mikrosatelitních makerů	36
3.5.1.1	Test mikrosatelitních markerů norka u fretky	38
3.5.2	Možnosti využití paternitního testování u fretky	40
3.5.2.1	Inbreeding	40
3.5.2.2	Dědičné choroby	40
3.5.2.3	Hybridizace mezi fretkami a tchoři.....	41
4	Diskuze.....	42
5	Závěr	44
6	Seznam literatury.....	45

1 Úvod

Původ jednotlivce v rámci plemen zvířat je důležitým plemenným parametrem, který může indikovat plemennou hodnotu jedince ve vztahu k vlastnostem rodičů. Paternita nemusí být vždy plně garantována z různých důvodů, ať již vědomých či nevědomých chyb chovatelů nebo dokonce podvodného chování s cílem záměrného poškozování vlastnických práv budoucího majitele vybraného jedince. Bakalářská práce řeší formou literární analýzy smysl a možnosti detekce určení paternity u fretky (*Mustela putorius furo*) na současné úrovni genetického výzkumu.

2 Cíl práce

Cílem této bakalářské práce je shromáždit informace o testech paternity na současné úrovni genetického výzkumu a následně popsat možnosti využití tohoto testování u fretky (*Mustela putorius furo*). Hypotézou je, že testy paternity u fretek mají svůj význam.

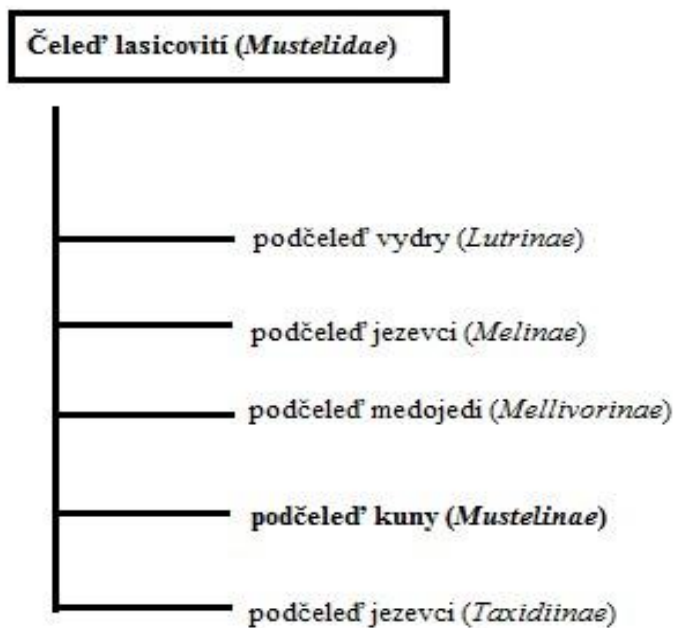
3 Přehled literatury

3.1 Fretka – základní informace a popis druhu

3.1.1 Taxonomie a fylogeneze

Fretka (*Mustela putorius furo*, Linnaeus, 1758) je šelma (*Carnivora*, Bowdich, 1821) patřící do starobylé čeledi lasicovitých (*Mustelidae*, Fischer, 1817), kteří se pravděpodobně datují do doby eocénu asi před 40ti miliony let. Do taxonomické skupiny této čeledi (obrázek 1), uznané Corbetem a Hillem, patří 67 druhů ze severní, střední a jižní Ameriky, Euroasie a Afriky (Fox, 2014). V Linného klasifikačním systému se fretka nazývá *Mustela putorius furo* a to zůstává dodnes pevně stanoveno. Anglický výraz ferret (fretka) je odvozeno z latinského *furonem* a z italského *furone*, což znamená zloděj. Další název *putorius* je z latinského *putor* znamenající zápach, který se vztahuje na pižmový zápach fretek (Thompson, 1951).

Rodičovské druhy fretek jsou stále nejisté. Jejich předkem může být tchoř evropský (*M. putorius putorius*, Linnaeus, 1758) nebo tchoř stepní (*M. evermanni*, Lesson, 1827), který má více podobností v lebeční morfologii (Blandford, 1987). Tchoř evropský a stepní byli původně řazeni jako jeden druh. V současnosti je tchoř tmavý považován za samostatný druh, blíže příbuzný tchoři stepnímu a norku evropskému (*Mustela lutreola*, Linnaeus, 1761) (Michaux et al., 2005). Genetická data naznačují, že k oddělení těchto tří druhů tzv. putorius group (*Mustela putorius*, *lutreola* a *evermanni*) pravděpodobně došlo v nedávné minulosti nebo že speciace těchto druhů dosud probíhá (Hosoda et al., 2000). Zatím se nepodařilo fylogenetickými metodami vyřešit vztahy mezi druhy (Davison et al., 1999). *M. putorius* a *M. evermannii* se mezi sebou kříží, a tím se genofondy jejich druhu překrývají (Blandford, 1987).



Obrázek 1. Moderní členění čeledi *Mustelidae* (Zdroj: Štráfelda, 2002)

3.1.2 Základní charakteristika

3.1.2.1 Váhové údaje

Fretky obvykle dosahují tělesné dospělosti v 6 měsících svého života (Evans, 2014). Divoce žijící samci váží 1-2 kg oproti lehčím samicím, které váží 0,6-1 kg. V zajetí chovaní jedinci, kteří nemusí čelit vnějším vlivům, váží průměrně 0,8-1,2 kg a to obě pohlaví (Hrapkiewicz a Medina, 2006).

3.1.2.2 Obecná morfologie

Tato zvířata mají dlouhé tělo s krátkýma, dobře osvalenýma nohama a dlouhým ocasem. Dospělé fretky dosahují délky těla od čenichu ke špičce ocasu přibližně 44 - 46 cm. Některé z anatomických rysů se podobají psům a kočkám – přední a boční části lebky se podobají kočičím a neuzavřenými lícními kostmi připomínají zase spíše psi (Wen et al., 1985).

Zejména z důvodu hrabacího instinktu v přírodě se u fretek vyvinul dlouhý krk a umístění tepen, které má napomáhat udržování dostatečného průtoku krve mozkiem v těsných uzavřených prostorech (Andrews et al., 1979).

Bueno et al. (1981) informuje, že krátký trávicí trakt fretek je charakteristický i pro jiné šelmy (*Carnivora*), ale slepé střevo a apendix u tohoto druhu chybí. Unikátní je také jejich tlusté střevo, protože nemá žádné externí anatomické rozdělení mezi tenkým střevem a tlustým střevem, tudíž střeva vypadají jako jeden dlouhý nediferencovaný orgán.

Fretky mají pár nadměrně vyvinutých análních žláz, což je charakteristické pro čeled' lasicovitých (*Mustelidae*). Produkují žlutou serózní tekutinu se silným zápachem. Když se cítí vystrašené nebo ohrožené dokáží spěšně spustit své anální žlázy, ale na rozdíl od skunka nemohou vystříknout tekutinu na dlouhé vzdálenosti (Hrapkiewicz a Medina, 2006).

3.1.2.3 Reprodukce

Samice fretek dosahují pohlavní dospělosti mezi 8. a 12. měsícem (obvykle první jaro od jejich narození). Samci dosahují puberty v 9 měsících života (Purcell a Brown, 1999). Domestikanti jsou sezonně polyestriční (Hrapkiewicz a Medina, 2006). Pro správný běh pohlavního cyklu vyžadují střídající se periody dlouhých a krátkých dnů. Obě pohlaví jsou nejlodnější, když se dny začínají prodlužovat. Spermatogenní aktivita samců probíhá od prosince do června (Lindeberg, 2008). Pro úspěšné páření se doporučuje, aby se samice se samcem umístili do společného kotce deset dní před začátkem říje. Po ukončení říje opouštějí kotec po 48 hodinách společně (Purcell a Brown, 1999).

K ovulaci dochází 30-36 hodin po kopulaci (Hrapkiewicz a Medina, 2006). Délka březosti u domestikovaných fretek dosahuje průměrně 41 dní (39-42 dní). Jestliže samice nemůže zabřeznout poté, co u ní byla indikována březost, jedná se o falešnou březost, která může trvat 40-42 dní (Ivey a Morrisey, 1999; Hrapkiewicz a Medina, 2006). Samice rodí průměrně 8 mlád'at (1-18 mlád'at) o váze 6-12 gramů. Jsou slepá, hluchá a mají řídkou bílou srst (Lindeberg, 2008). Samice vychovává mlád'ata sama. Potravu začínají přijímat od 21. dne věku, když poprvé otevřou oči. Odstav probíhá mezi 6. – 8. týdnem života (Hrapkiewicz a Medina, 2006).

Fretky jsou plodné s evropskými tchoři, což potvrzuje blízký genetický vztah. Divoké evropské fretky (tchoři) však obvykle mívají pouze jedno mládě, kdežto fretky domestikované mají dvě a více mláďat ročně. Také F1 generace z divokých tchořů a domácích fretek mají plodné potomstvo. Stepní tchoři se mohou též křížit s tchořem černonohým (*Mustela nigripes*). Samice fretek a samci hranostajů (*Mustela erminae*, Linnaeus, 1758) také dokáží vyprodukovat životaschopné potomky (Williams et al., 1996).

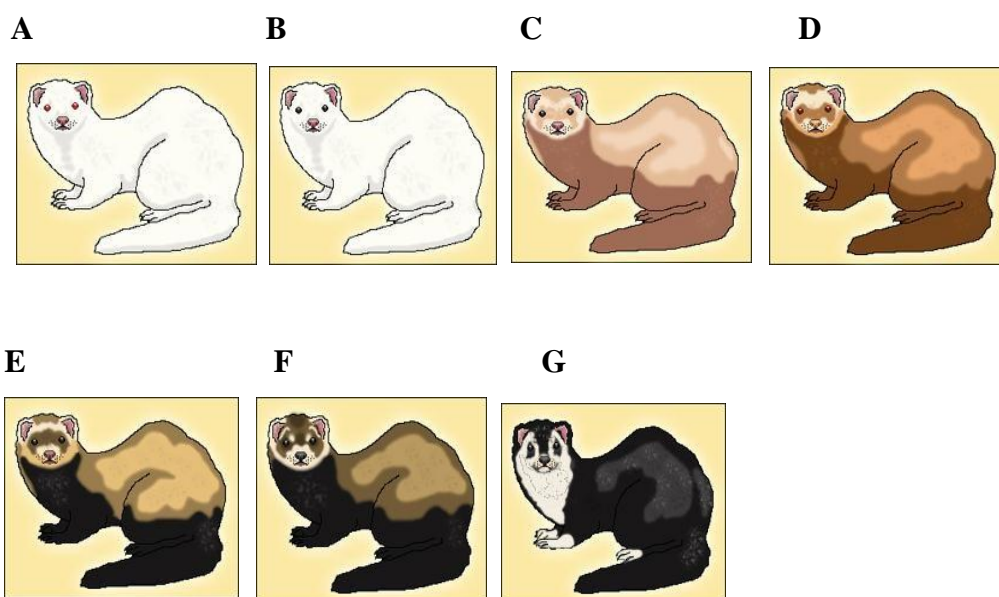
3.1.2.4 Srst a barevné varianty

Lewington (2007) uvádí, že neexistují žádná specifická plemena fretek, ale barevné standardy a rázy existují. Americká asociace chovatelů fretek (The American Ferret Association) uznala následující standardy pro účely výstavy a chovu:

1. **Albino** – Krycí srst a podsada je bílá až krémová. Bez masky. Barva očí je pouze červená a čenich je vždy růžový (obrázek 3A).
2. **Tmavooký bílý** - Krycí srst a podsada je bílá až krémová. Masky chybí. Oči jsou karmínově červené a čenich růžový (obrázek 2B).
3. **Šampaňské** – Krycí srst je žlutohnědá až béžová. Podsada je bílá až krémová. Masky má tvar "bandity", "V", nebo může být neúplná. Oči jsou tmavě červené (můžou být i světlejší). Čenich je béžový, růžový, nebo se světle hnědým obrysem "T" (obrázek 2C).
4. **Skořicový** – Krycí srst je světle červenohnědá. Podsada je zlatá (i světlejší je přijatelná). Masky může mít rozdílnou barvu, nebo odstín. Oči jsou tmavě červené (můžou být i světlejší). Čenich je žádoucí cihlově oranžový, béžový nebo se světle hnědým či cihlově oranžovým obrysem "T" (obrázek 2D).
5. **Tchořovitý** – Krycí srst je tmavě hnědá až černá. Podsada je světlá až béžová, nebo krémová a neměla by být žlutá. Masky je nejčastěji ve tvaru "bandity" a může mít rozdílnou barvu nebo odstín. Oči jsou tmavě hnědé až k černé. Čenich má být světle hnědý, skvrnitý nebo s hnědým obrysem "T" (obrázek 2E).

6. **Černotchořovitý** – Krycí srst je jasanově tmavě hnědá až k černé (hnědá nesmí mít nádech do teplých tónů). Podsada je světlá až krémová., žádaná je bílá. Masky bývají tmavá a je často plná – tedy tvoří takzvanou "kuklu", nebo má tvar "bandity". Oči jsou tmavě hnědé až černé. Čenich je tmavě hnědý až černý a puntíkováný, nebo flekatý (obrázek 2F).

7. **Černý** – Krycí srst je černá. Podsada je žádaná bílá. Masky je tmavá. Oči jsou tmavé až černé. Čenich je černý nebo tmavě hnědý, může být i černo skvrnitý (obrázek 2G).



Obrázek 2. barevné standardy fretek (Zdroj: <http://www.fretka.cz/>)

Kresba jejich masky se mění od sezóny k sezóně a od roku k roku. Fotografování je tudíž nespolehlivý způsob individuální identifikace. Fretky chované ve venkovních voliérách nabývají tmavších barev. Chovatelé by měli pečlivě a pravidelně dokumentovat důležité charakteristiky jako je pigmentace srsti a podsady, nebo pigmentové značení pokožky. Vzhledem k tomu, že se na to do současnosti příliš nekladl důraz, nebylo zatím možné plně charakterizovat genetický vliv na barvu jejich srsti. Chov velkého množství fretek ve venkovních voliérách po mnoho generací by byl ideální k archivaci údajů pro další studie (Lewington, 2007). Podsadu ztrácejí na jaře a na podzim. V tomto období prodělávají také váhové sezónní změny (Evans, 2014).

3.1.3 Domestikace a praktické využití

Bays et al. (2006) uvádí, že se jedná o plně domestikovaný druh zvířete, který již nemá žádný divoký protějšek. Nejpravděpodobnějšími předky jsou tchoř tmavý (*Mustela putorius putorius*) a tchoř stepní (*Mustela eversmanni*).

Fretka je zvíře s velice dlouhou historií domestikace, zhruba 2000 – 3000 let. Mezi faktory, které komplikují určení domestikace, patří omezený počet kosterních nálezů, nedostatek údajů pro určení geografické oblasti domestikace, nemožnost oddělit kosterní nálezy domácí fretky od jiných divokých příslušníků rodu *Mustela* a nedostatečné genetické studie (Lewington, 2007).

Je pravděpodobné, že fretky byly chované na ochranu uloženého obilí a jiných potravin od hlodavců, stejně jako kočky (Price, 2002). Dalším důvodem k chovu fretek byl lov králíků, myši a krys, nazývaný ferreting (obrázek 3). První vyobrazení fretky používané k lovu králíků se objevuje v rukopisech již ze čtrnáctého století. Toto potvrzují i rané záznamy od Straba a Plinia, cca 60 let př. n. l., které byly pravděpodobně základem pozdějšího využití a uvádějí, že vznik fretky probíhal v Severní Africe (Thompson, 1951). Tyto záznamy byly zpochybňovány, ale předpokládá se, že odsud byla tato zvířata převezena do Jižní Evropy, kde proběhla domestikace (Lewington, 2007). S jejich štíhlými těly, mohou pronásledovat svou kořist snadno až do nor (Kaufman, 1980). Tato praktika byla postupně zavlečena i do Asie a na Britské ostrovy. Zde se tato činnost provozuje dodnes jako sport (Thompson, 1951). Ve většině zemí je tato technika lovu povolena pouze s licencí podle platného zákona. Jiné využití těchto zvířat lidmi je rozvádění kabelů do pracovních míst, kam se těžko dostává kvůli omezenému prostoru, například pro telefonní společnosti. Pro tento účel, nosí fretka malý postroj, na kterém má připojené nylonové struny, které lze snadno tahat skrz úzké prostory (Broom a Fraser, 2015). Také jsou hojně používány jako biomedicínský model pro studium viru lidské chřipky, zejména pro pandemický virus chřipky H5N1 (Ouborg et al., 2010), a jsou používány i v toxikologii a farmakologii, v reprodukční fyziologii a endokrinním výzkumu, většinou v amerických laboratořích. Mezinárodně jsou fretky také chovány pro jejich kožešinu (Fitch vrstvu). V Evropě nejsou žádné specializované registrované farmy pro výrobu Fitch kožešiny - chov fretek je většinou kombinován s chovem norka amerického (*Mustela vison*). V roce 2000 bylo v Evropě vyprodukováno zhruba 1700 kožešin (200 kožešin v Norsku a 1500 kožešin v Polsku); 79 chovných jedinců bylo zaznamenáno v Dánsku v roce 2001 (Broom a Fraser, 2015).



Obrázek 3. Ferreting (Zdroj: Thompson, 1951)

3.1.3.1 Rozdíly způsobené domestikací

Mezi první viditelné rozdíly patří změna barvy jejich kožichu, stejně jako k tomu došlo vlivem domestikace i u jiných druhů zvířat. Albinotické fretky byly chovány po staletí a byly častěji preferovány pro lov kvůli jejich lepší viditelnosti. Mají také odlišný zrak a sluch. Mezi další změny patří zmenšení lebeční kapacity o 15-20%, širší konstrukce těla a redukce zubů (Church, 2007).

Existují i behaviorální rozdíly mezi domestikanty a divokými tchoři. Doma chované fretky, na rozdíl od divoce žijících jedinců, nejsou tolik temperamentní a hbité (Grzimek a Werner, 1990). Jsou také více společenské, což je častý nežádoucí účinek domestikace. Fretky žijí raději v malých skupinách, na rozdíl od jejich samotářsky žijících divokých příbuzných (Church, 2007). Domácí fretky jsou mnohem více učenlivé a neměl by se u nich rozvíjet strach z lidí, ani z neznámého prostředí. Generace F1 hybridů z parentální generace fretek a tchořů však vykazovala rozvoj strachu z lidí, když měla v kritickém období v 7,5 – 8,5 týdnech života opustit svou matku (Poole, 1972). Když se začala věnovat pozornost testování reakcí na rachotivý zvuk, zjistilo se, že divocí tchoři a F1 hybridy si zvykají rychleji než domestikanti. Reakce hybridů F1 generace závisí do jisté míry na tom, z jakého prostředí byli vzati. Jedinci odchovaní v domácích podmínkách reagovali jinak, než ti odchovaní ve venkovních voliérách. Protože kontrast přirozeného habitatu fretky s domácím prostředím je značný, jedinci odchovaní doma vykazovali větší odezvu na podněty. Toto zjištění souhlasí s Lorenzovou hypotézou, že chování domestikovaných zvířat odpovídá chování mladých jedinců jejich divokých protějšků (Hahn a Wester, 1969).

3.1.4 Rozšíření na další kontinenty

Do Severní Ameriky byly domestikované fretky pravděpodobně zavlečeny na obchodních lodích kolem roku 1700. Mohli sem přijet jako společenská zvířata nebo jako pomocníci při lovu. Na lodi také plnily funkci hlídačů zásob před hlodavci (Fox, 2014). V Americe se fretky chovaly zejména pro jejich kožešinu. Jedno město v oblasti Nového Londýna ve státě Ohio, dokonce přijalo název Ferretwill, protože se zde chovala obrovská populace fretek kolem roku 1915. Ve dvacátém století byl lov králíků fretkami v některých zemích zakázán, protože divoká populace králíků byla natolik zničena, že se museli začít chránit (Lewington, 2007).

Fox (2014) a Lewington (2007) se domnívají, že fretky byly introdukovány do Austrálie z Evropy okolo roku 1800, kvůli řízení populace evropských králíků, kteří sem byli zavlečeni již dříve. Naštěstí zde byly fretky loveny místními predátory, jako jsou například lišky, divocí psi dingo a jestřábi, tudíž se zde divoká populace fretek nemohla dále rozvíjet a narušit tím místní ekosystém. Nicméně, když byly ze stejného důvodu introdukovány do přírody Nového Zélandu spolu s dalšími lasicemi, nebyli tam žádní predátoři, kteří by jejich populaci zredukovali. Proto se zde divoká populace domestikovaných fretek rozvinula a přetrvává dodnes. Dopady tohoto počínu na místní faunu a floru jsou sporné.

3.1.5 Chov

Tato zvířata mohou být chována jak v bytě, tak i venku v závislosti na klimatu (Quesenberry a Carpenter, 2014). Většina fretek chovaných v zájmových chovech je ubytována v klecích, kde jsou buď samostatně, nebo společně s dalšími jedinci svého druhu. Doporučená minimální velikost klece pro 1 - 2 jedince je alespoň 1,5 - 2 m² s podmínkou, že na každého dalšího obyvatele by se mělo přidat dalších 0,5 m² (McKay, 2006). Nicméně většina chovatelů, pokud možno, dává přednost větším rozměrům. Divocí tchoři mají průměrné domácí okrsky velikosti přibližně 12,4 ha pro samice a 31,4 ha pro samce (Blandford, 1987). Ačkoli rozsáhlé domácí okrsky jsou uvedeny jako jeden z největších prediktorů stresu a psychologických dysfunkcí v zajetí, zůstává nejasné, do jaké míry toto ovlivňuje právě velikost klece (Clubb a Mason, 2007).

Pro jejich ubikaci je zcela nevhodné akvárium, kvůli velmi špatným ventilačním vlastnostem a potenciálnímu riziku přehřátí v důsledku vysokých teplot. Optimální teplota pro chov je 15 - 21 °C a neměla by překročit 29 °C a zároveň by neměla klesnout pod -7°C (Fox, 2014).

Vzhledem k citlivosti jejich dýchacích cest není doporučeno používat piliny či slámu jako stelivo (Quesenberry a Carpenter, 2014).

Fretky se většinou vyměšují na jednom, maximálně na dvou oblíbených místech v kleci. Tato behaviorální vlastnost může být využita ve výcviku v chození na bedýnku (Woodley a Baum, 2003).

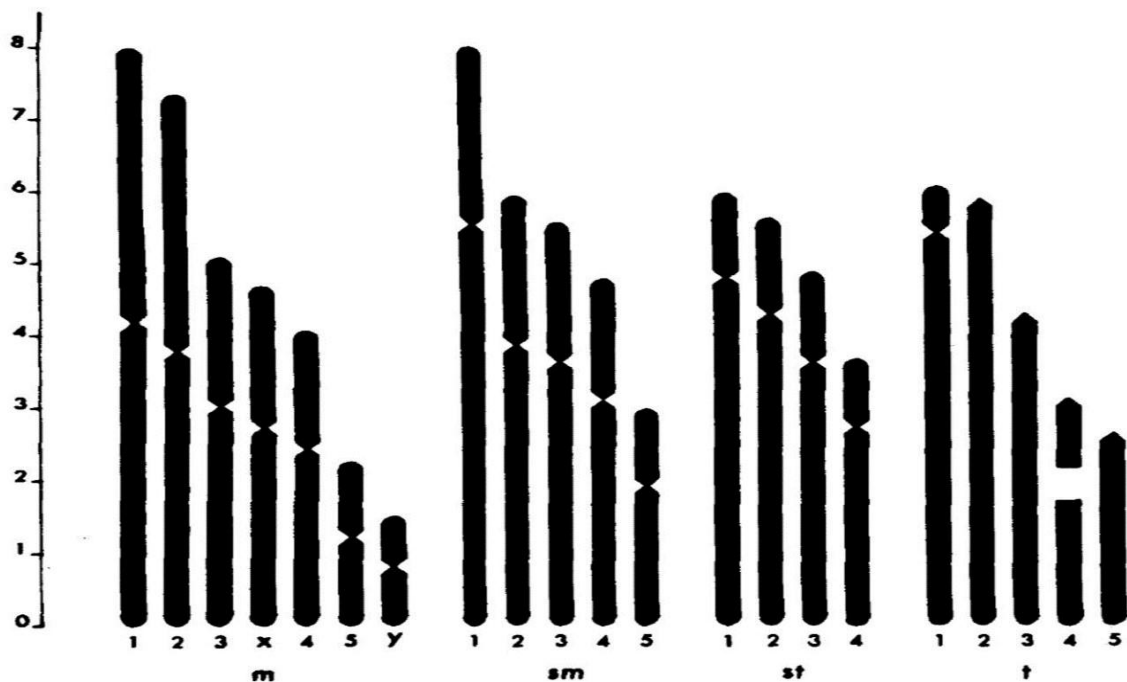
Quesenberry a Carpenter (2014) podávají informace o tom, že potřebují mít ve svém obydlí „temný koutek“, který využívají jako své útočiště a spací prostor. Tento prostor vnímají jako bezpečné místo a to omezuje stres.

3.2 Základní genetické údaje

3.2.1 Karyotyp

Fretka má 20 párů chromozómů, a to 19 párů autozómů a 1 pár gonozómů (pohlavní chromozómy X a Y)

Frykman (1972) a Omodeo a Renzani (1966) uvádějí, že chromozómy fretky jsou rozděleny do čtyř skupin stejně, jako tomu je i u jiných savců (obrázek 4). Skupiny jsou nazývány dle lokace centromery na chromozómech. Ve skupině m (metacentrické) je pět párů autozómů a gonozómy X a Y. Všechny jsou rozeznatelné podle poměru délky jejich ramen. Ve skupině sm (submetacentrické) je umístěno také pět párů autozómů. Skupinu st (subtelocentrickou) tvoří čtyři páry autozómů. Skupina t (telocentrická) obsahuje pět párů autozómů.



Obrázek 4. Idiogram – rozdělení chromozómů do skupin m, sm, st a t. V každé z nich jsou jednotlivé chromozómy číslovány v pořadí podle klesající délky (Zdroj: Frykman, 1972).

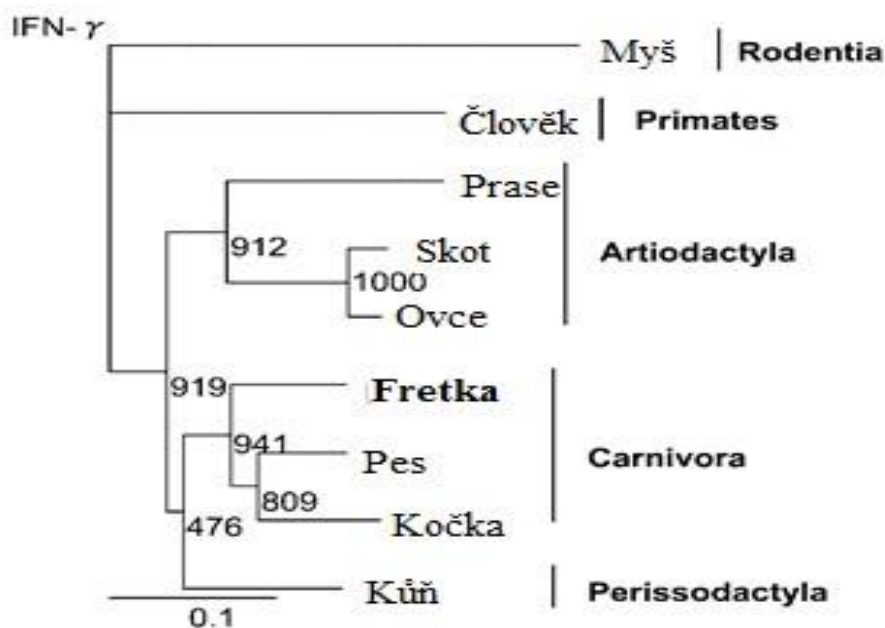
3.2.2 Molekulární taxonomie

Čeď *Mustelidae* byla podrobena hodnocení pomocí fylogenetické analýzy maximální úspornosti (maximum parsimony, preferování jednodušších hypotéz před složitějšími). Byla analyzována částečná cDNA genů RAG1 a IRBP. Tyto testy způsobily jisté změny zařazení druhů zejména jezevců z rodu *Melogale* (Geoffroy, 1831). Tato analýza také silně podporuje vyčlenění skunků vykazující znaky *Procyonidae* (Gray, 1825) a *Mustelidae* (Fischer, 1817) (Sato et al., 2004).

3.2.2.1 Fylogentický strom na základě cytokinů

Cytokiny jsou nezastupitelné při údržbě homeostázy organismu. Jsou spojeny a rozvojem poruch zánětlivého rázu. Pokud dojde k zánětu jakékoli tkáně, cytokiny se začnou hojně vytvářet v oblasti lokálních lézí v rámci časné hostitelské obranné imunitní reakce na infekci (Šterzl, 1999).

Na základě aminokyselinové sekvence cytokinů a užíváním metody neighbor-joining (posuzování sdílených znaků se sousedy) byl postaven následující fylogenetický strom (obrázek 5) (Nakata et al., 2008). Fylogenetické skupiny savců na základě struktury cytokinů jsou rozděleny do pěti skupin: *Primates*, *Artiodactyla*, *Perissodactyla*, *Carnivora* a *Rodentia*. Rozdíl mezi těmito skupinami spočívá v proteinu interferonu gama (IFN- γ) (Boulay et al., 2003).



Obrázek 5. Fylogenetický strom na základě interferonu gama (IFN- γ) (Zdroj: Nakata et al., 2008)

Procentuální podíly identifikovatelné nukleotidové sekvence a odvozené sekvence aminokyselin pro cytokiny fretek ve srovnání s jinými savci jsou uvedeny v obrázku č. 6., který znázorňuje sekvenční homologie IFN- γ , IL-1, IL-6, IL-8 (interleukiny 1, 6 a 8) a TNF α (faktor nádorové nekrózy). Sekvence kódující proteiny byla průměrně z 85% stejná se psi. Na rozdíl od myši, které mají tuto homologii nukleotidových sekvencí cytokinů s fretkami ve srovnání s jinými savci nižší (Nakata et al., 2008).

DRUH	Homologie nukleových aminokyselin v %				
	FN- γ	IL-1 β	IL-6	IL-8	TNF- α
Pes	92.9 (86)	83.9 (74)	84.8 (73)	89.7 (89)	95.0 (97)
Kočka	88.1 (83)	83.4 (73)	83.0 (75)	86.2 (85)	93.0 (92)
Člověk	78.4 (63)	77.3 (62)	74.3 (59)	82.3 (75)	88.9 (89)
Mýš	64.3 (54)	73.0 (57)	58.1 (39)	58.1 (41)	79.0 (79)

Obrázek 6. Porovnání sekvenčních homologií IFN- γ , IL-1, IL-6, IL-8 a TNF- α (Zdroj: Nakata et al., 2008).

3.2.2.2 Fylogenetický strom Neighbour-joining

Fylogenetický strom Neighbour-joining je sestavený na základě kombinace sekvencí cytochromu B (integrální membránový protein, který se běžně používá jako oblast mitochondriální DNA pro určení fylogenetických vztahů mezi organismy) a D-smyčky, což je významná "nekódující" sekvence mtDNA. Sekvence byly spojeny, kvůli potenciálním problémům, které plynou z uložení modelů během evoluce (Wenzel et al., 2013). Prioritou by mělo být využití maximální sekvenční variace. Topologie těchto fylogenetických stromů byla vytvořena především s využitím sekvence D-smyčky. Podobnost fylogenetických stromů vytvořených pomocí metody maximální pravděpodobnosti mají za následek fylogenetické stromy podobné topologie, až na to, že uzel D10/D13 zde není vyřešen, což vede k většímu rozvětvení. Variace hypervariabilního CnTn pole nebyly zařazeny do konstrukce fylogenetického stromu. Spolehlivé sladění této oblasti nebylo možné. Podobné polypyrimidinové trakty byly identifikovány i u jiných savců (Zardoya et al., 1995).

3.2.2.3 Fylogenetické vztahy mezi tchoři a domestikovanými fretkami

Nedávné spekulace o původu fretky a některé biologické studie o její morfologii a karyotypu, nedosáhly téměř žádného pokroku při studiu jejich domestikace (Blandford 1987, Frykman, 1972).

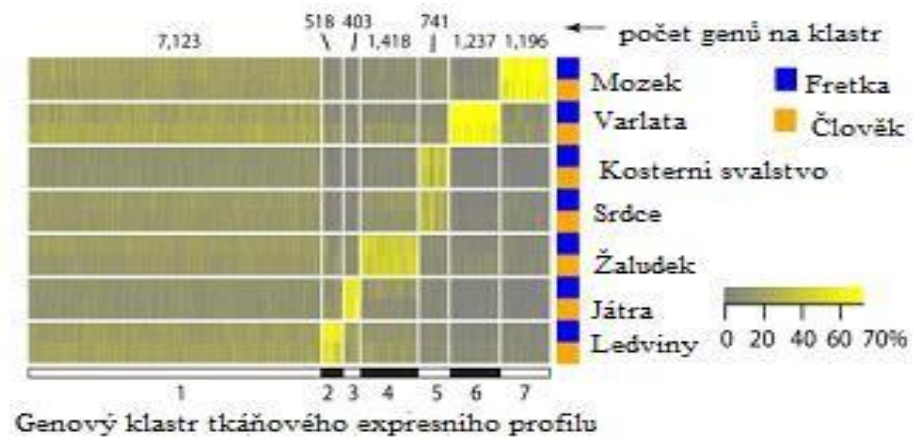
Davison et al. (1999) uvádí, že po introdukci domestikovaných frettek do Velké Británie mnoho jedinců tohoto druhu buď uteklo na svobodu, nebo bylo vypuštěno svými chovateli do místní volné přírody. Populace tchořů klesla během 1. Světové války. Z důvodu, zda současná expandující populace tchoře je převážně hybridního původu a k objasnění genetické rozmanitosti tchoře v Británii bylo použito sekvencování oblastí cytochromu B za použití primerů L14771 a H15149. Pro kontrolu použili úsek D-smyčky. Objevili pouze dva typy cytochromu B, které se liší na bázi přechodu substituce na třetí pozici kodonu. Tyto haplotypy jsou označovány jako „Welsh polecat“ (WP) u divokých tchořů a „domestic ferret“ (F) u domácích frettek. WP haplotyp byl omezen na oblast Walesu, západní a střední Anglie, zatímco F haplotyp byl nalezen v pevninské části Anglie, Walesu a Skotska a také na ostrovech (Benbecula, Shetland, Man). Sekvence cytochromu B druhého haplotypu F byla totožná se dvěma fretkami v databázi Genbank. Tyto dva haplotypy cytochromu B odpovídaly dvěma odlišným D-smyčkám. Haplotyp F byl také nalezen ve fenotypu slovinského tchoře.

3.2.3 Genom fretky jako model pro zkoumání virových infekcí lidí

Genom frettek se zkoumá zejména kvůli jejich využití jako modelů pro studium lidských virových onemocnění převážně respiračního charakteru. Analýzy odhalily vysoké sekvenční a proteinové podobnosti a také sdílení tkáňových expresních vzorců mezi fretkami a lidmi, což naznačuje potenciální užitečnost frettek jako modelů v širším souboru onemocnění (Ouborg et al., 2010).

V současné době existuje pouze omezený počet částečných úseků cDNA přítomné v GenBank. To má vliv nejen na počet molekulárně genetických testů, které jsou k dispozici pro analýzy, ale také k rozvoji testů založených na protilátkách (Bruder et al., 2010). Funkční genomové analýzy mohou poskytnout cenné poznatky o tom, které složky vrozené imunitní odpovědi hostitele zneškodní patogeny, nebo informace o strategii, kterou viry nebo bakterie využívají k přežití (Kobasa et al., 2007). Dostupnost činidel pro molekulární analýzy používané k rozpoznání infekcí a predikci imunogenní ochrany je omezena. To omezuje i užitečnost fretky jako modelu (Bruder et al., 2010).

Byly porovnávány genetické vzory transkripce fretek a lidí napříč sedmi tkáněmi. Nejprve se určily geny s nejvyšší relativní hojností ve všech tkáních a zjistilo se, že průsečík těchto tkáňově specifických sad mezi člověkem a fretkou byl velmi významný (Cabali et al., 2011). Vymezi-li se sady tkáňově specifických genů, jsou sdružené geny s podobnými expresními vzory napříč 14ti tkáňovými vzory (7 z fretek a 7 z lidí) rozděleny do 7 klastrů (obrázek 7). Tato analýza ukázala, že shlukování genů fretek a lidí vykazovaly velmi souhlasné tkáňově specifické vzory exprese. Přiřazení genového klastru na konkrétní tkáň bylo zřejmé díky své výrazně zvýšené expresi v dané tkáni. Z obrázku 5 je zřejmá podobnost mezi kosterním svalstvem a srdcem, kterou lze přičíst přítomnosti příčně pruhovaných svalových buněk v obou tkáních (Peng et al., 2014).



Obrázek 7. K-means. Tkáňová exprese genetických sad odhaluje podobnosti v tkáňové specifičnosti. Svislé dělicí stěny odpovídají sedmi shlukům genů. Horizontální seskupení genů je vyjádřeno dvěma barvami, a to modrou pro fretky a oranžovou pro lidi, též upozorňují na tkáňovou specifičnost shluků 2 až 7. (Zdroj: Peng et al., 2014)

3.3 Testy Paternity

3.3.1 Historie

Historie soudního lékařství začala ve Francii a jejím průkopníkem byl Ambroise Pare (1509 - 1590), slavný francouzský renesanční chirurg, který poprvé uvedl soudní spisy na základě anatomických studií v roce 1575. Podrobně popsal zkoušky panenství a mužské impotence, kritizoval názory kongresu a uvádí, že nikdo by nemohl být schopný erekce a ejakulace před

komisí. Pare se však neodvážil publikovat tato slova za svého života. Byly zveřejněny až v roce 1598, tedy 8 let po jeho smrti (Albrecht a Shultheiss, 2004).

Velký význam učinil medik Johan Ham (1651-1723) svým mikroskopickým objevem spermií. Anglický chirurg William Cheselden (1688- 1752) ilustroval a popsal spermii ve své slavné knize „*The Anatomy of the Human Body*“ (anatomie lidského těla). Wilhelm von Gleichen-Russwurm na to v roce 1778 navázal a prohlásil, že mikroskop může pomoci vyřešit otázky otcovství (Schultheiss a Denil, 2002).

Karl Landsteiner (1868-1943) svým objevem krevních skupin na začátku dvacátého století položil základní kámen pro sofistikované techniky řešení otázek otcovství. Nebylo to ovšem zveřejněno až do roku 1921, kdy se Reuben Ottenberg z New Yorku stal prvním, kdo navrhnul použití tohoto vědeckého poznatku na medicínsko-právní otázky (Schultheiss a Denil, 2002).

Mezi starší metody ověřování paternity patří testování podle krevních skupin, tzv. HLA systému (polymorfismus leukocytů), nebo polymorfismů enzymů erytrocytů (Geserick a Wirth, 2012).

3.3.2 Molekulárně genetické testy

V současné době se pro molekulárně genetické testy využívá zejména metoda PCR, která bude popsána v následující kapitole. Dříve se k těmto testům používala metoda Southern blotting, která je poměrně drahá a složitá. Dnes se používá převážně jen výzkumně. Byla plně nahrazena PCR technikami.

Tyto typy testů se provádějí buď v prenatálním období, nebo již za života jedince. V obou dvou případech se používají zejména pro detekci choroby, která může ovlivnit život jedince, tzn. stanovuje se prostřednictvím nich presymptomatická diagnóza. Tato diagnóza odhaluje, zda v genomu daného jedince proběhla taková molekulární změna na určitém genu (mutace typu delece apod.), která způsobí, že v průběhu svého života onemocní příslušnou chorobou. Používají se také pro identifikaci patogenního organismu (bakterie, viry, paraziti apod.), který způsobuje chorobu a tím zefektivňuje její léčbu (Akhmetov a Bubnov, 2015).

Dále se tyto testy hojně využívají ve forenzní praxi, kde působí jako nevyvratitelný důkaz, který potvrzuje přítomnost podezřelého na místě činu. Zde představují jistou komplikaci forenzní stopy, které nesou pouze nepatrné množství vzorku, který může být degradován nebo znečištěn. Je též pravděpodobná přítomnost buněčného materiálu z více zdrojů (Budowle et al., 2005). Ve forenzní praxi se využívají také k identifikaci osob prostřednictvím testů paternity (Drábek, 2011).

3.3.2.1 Molekulárně genetické testy ve vztahu ke zvířatům

Ve vztahu ke zvířatům se molekulárně genetické testy využívají zejména v molekulární taxonomii, ve které v současné době způsobují změny taxonomického zařazení živočichů (Sato et al., 2004). I u zvířat se využívají tyto testy k detekci neznámého patogenu a následné diagnóze. Nacházejí zde uplatnění testy paternity, které pomáhají ke zkvalitnění chovu zvířat. Testy pomáhají zmapovat chovné linie jedinců, čímž zabraňují inbreedingu a podvodnému jednání, které může poškodit majitele kupovaného zvířete.

3.3.3 Současný způsob ověřování paternity

Hardwick (2015) uvádí, že ověřování otcovství je dnes zastoupeno výhradně DNA technologiemi a je nabízeno ústavy soudního lékařství, genetickými ústavy nebo soukromými laboratořemi. Pro testování musí potenciální otec a dítě odevzdat k dispozici vzorek bukalních stěrů. Doplnkové vzorky krve jsou někdy brány jako sérologický důkaz, včetně analýzy krevních skupin, který zajišťuje vyšší úroveň testu. U novorozenců bývá obtížnější vyšetření z důvodu vývoje charakteristických krevních skupin, které se vyvíjejí až několik měsíců po porodu – bukalní stěry pro analýzu DNA jsou v této situaci vhodnější, a to i kvůli jednoduchosti odběru.

Typizace zvířecí DNA je založena na lidském forenzním testování otcovství. Z tohoto důvodu jsou testy paternity u zvířat založeny na těchto bohatých zkušenostech a nemusí být znovuobjevovány. V jistých případech však mohou vyžadovat mírnou úpravu, zvláště pak když některé z použitých metod mohou být plemenně nebo druhově specifické (Hellmann et al., 2006). Živočišné zkušební laboratoře, které používají druhově specifické metody, si nemusí dělat starosti s křížovou kontaminací testovaných vzorků DNA ze strany zaměstnanců. Obecné současné postupy používané pro tyto testy jsou spolehlivé. Nicméně, zde nebyl

objasněn proces druhových shod (až do současnosti), aby stanovil základní hranici strukturovaných QA postupů (Quality Assurance). Tyto postupy zachovávají standardy pro zajištění a kontrolu kvality testů v laboratořích a srovnatelnosti výsledků mezi laboratořemi (Budowle et al., 2005).

Příbuznost může být efektivně testována pomocí mnohoalelické variability počtů krátkých tandemových repetitiv (STR) polymorfismů. Toho lze dosáhnout použitím multilokusové analýzy DNA, prozkoumáním jednoho lokusu minisatelitů nebo pomocí PCR testu minisatelitů a mikrosatelitních markerů, což bude pro tuto práci stěžejní.

3.3.3.1 Metoda PCR

PCR (Polymerase Chain Reaction) = polymerázová řetězová reakce je enzymová metoda sloužící k syntéze definovaného úseku DNA. Během této metody dochází k rychlému a snadnému množení úseků DNA (až mnoha milionů kopií), založeného na principu replikace nukleoidových kyselin. Tato reakce probíhá v termocykleru a má 3 kroky: denaturaci (rozrušení vodíkových můstků a rozvolnění dvoušroubovice), annealing (na dvouvláknové úseky DNA-primer se váže DNA polymeráza) a prodlužování primerů, kdy dochází k samotné syntéze DNA (Innis et al., 2012).

Díky rychlé amplifikaci a možnosti porovnání desítek až stovek jedinců v relativně krátkém čase je metoda PCR vhodná pro analýzu polymorfismů, tudíž se hojně využívá i pro testy paternity. Tato metoda nevyžaduje vzorky krve ani jiných tkání získaných přímo z živých zvířat – DNA pro tyto účely lze odebrat z trusu, také buklím stěrem nebo z vlasových cibulek, nemusí se tedy bezprostředně narušovat jejich život (Budowle et al., 2005).

3.3.3.2 Mikrosatelitní markery

Jsou to tandemově se opakující úseky DNA o délce 1-10 párů bází (nejčastěji 2-6bp). Používají se pro ně zkratky STRs (short tandem repeat), SSR (simple sequence repeats), nebo VNTRs (variable number of tandem repeats). Mikrosatelity se vyskytují v genomu nejrůznějších organismů ve velkém množství, ale jejich biologická funkce je zatím neobjasněna (Tóth et al., 2000). Tyto markery jsou dobře amplifikovatelné pomocí metody PCR (Budowle et al., 2005).

V důsledku rozšířeného používání mikrosatelitů v genetických studiích rychle roste naše chápání jejich mutačního chování, vývoje a distribuci v genomu a napříč taxony. Nejčastější volbou pro molekulárně genetické studie jsou markery dinukleotidové (např. CACACACA), trinukleotidové (např. ATGATGATGATG) a tetranukleotidové (např. CATGCATGCATGCATG). Dinukleotidové markery tvoří většinu mikrosatelitů mnoha druhů. Trinukleotidové a hexanukleotidové repetice jsou s největší pravděpodobností ty, které se objevují v kódujících oblastech, protože nenarušují čtecí rámce genů. Repetice mononukleotidové jsou nejméně spolehlivé kvůli problémům s amplifikací. Delší typy markerů jsou méně časté a existuje jen málo dat k přezkoumání jejich evoluce (Li et al., 2002; Tóth et al., 2000).

Selkoe a Toonen (2006) ve své studii uvádějí, že DNA obklopující mikrosatelitní lokus se nazývá hraniční oblast. Sekvence lemující tuto oblast se obecně zachovává (je identická) u jedinců téhož druhu a někdy i u různých druhů. Konkrétní mikrosatelit může být často identifikován svou koncovou sekvencí. Krátké úseky DNA nazývané oligonukleotidy nebo primery mohou být navrženy tak, že se váží na hraniční oblast a řídí amplifikaci mikrosatelitů polymerázovou řetězovou reakcí (PCR). Specifický pár PCR primerů je hmatatelným produktem izolace mikrosatelitních markerů. Všeobecná dostupnost oligonukleotidů z komerčních služeb umožňuje objednání libovolných neznačených sekvencí primerů během několika dní (fluorescenčně značené primery jsou řádově dražší).

Markery jsou obsaženy v celém genomu. V nekódujících oblastech, jako jsou telomery, subtelomery a heterochromatin u centromer je jejich koncentrace největší. Naopak v kódujících oblastech se nachází pouze 9-15% mikrosatelitů. Tato nízká frekvence mikrosatelitů v kódujících oblastech může být vysvětlena negativní selekcí posunových mutací při translaci (Metzgar et al., 2000). V intronech můžeme často nalézt dinukleotidy. V exonech se pak často vyskytují trinukleotidy a hexanukleotidy, které neporušují čtecí rámec. V oblasti centromer jsou nalézány spíše tetranukleotidy (Tóth et al., 2000).

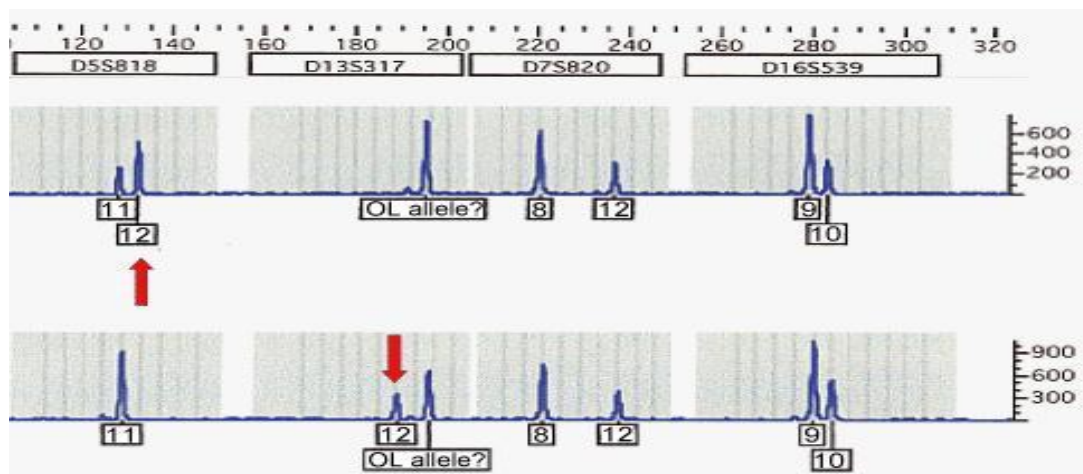
3.3.3.3 Výskyt nulových alel

Výskyt nulových, nebo-li neamplifikujících se alel může negativně ovlivnit analýzu mikrosatelitové DNA. Poznají se tak, že se objeví homozygotní matka a vypadá to, že některá její mláďata od ní nezdědila alelu. Toto se dá objasnit výskytem nulové alely. Matka je ve skutečnosti heterozygotní (místo domnělé homozygotnosti) s jednou amplifikující se a jednou neamplifikující se alelou. Mláďata, která od zdánlivě homozygotního otce zdědila nulovou alelu, mohou být označena jako produkty mimopárové paternity. Tyto alely znemožňují průběh PCR, kvůli svému vzniku prostřednictvím mutace DNA v místě, které je homologní k sekvenci primeru. Nejčastěji to bývá v úseku u konce 3'. Tento jev se dá řešit sekvencováním PCR produktu vyšetřovaného lokusu a následnou úpravou sekvence nenesadajícího primeru (posunutím o několik nukleotidů vedle mutace). Takto pozměněný lokus je plně využitelný pro přesnější identifikaci paternity (Dakin a Avise, 2004).

3.3.3.4 STR polymorfismy

STR, nebo-li krátké tandemové repetice jsou často používány při určování příbuznosti. Jejich výhodou je dobrá rozlišovací schopnost, vysoká variabilita a snadná amplifikovatelnost pomocí metody PCR. Jejich největší nevýhodou je vysoká mutační rychlost a limitovaný počet (maximálně 17) markerů v jedné reakci (Butler, 2011).

Testy paternity jsou založeny na porovnávání alel u STR lokusů mezi mládětem, matkou a údajným otcem (trio) (obrázek 8). V případech bez matky (duo) bylo provedeno srovnávání těchto alel STR lokusů mezi mládětem a údajným otcem. Pokud byly DNA profily mláděte a údajného otce vyrovnané, test je považován jako nevyvratitelný důkaz otcovství. Ovšem v případě, že profily DNA mláděte a údajného otce nebyly vyrovnané, poté je výsledek považován za vyloučení otcovství (El-Alfy a Abd El-Hafez, 2012).



Obrázek 8. výsledek STR profilování – V horním panelu je zobrazena směs obsahující stejnou DNA, která je uvedena ve spodním panelu. Šipky označují alelu od otce a od matky (Zdroj: Butler, 2011).

3.3.3.5 Jednonukleotidové polymorfismy (SNP)

Genomická DNA každého jedince se liší v drobných odchylkách, které jsou klasifikovány jako polymorfismy či mutace. Pokud by byly náhodně vybrány genomy dvou fretek, míra jejich vzájemné shody v sekvenci DNA bude dosahovat 99,9 %. Právě zbývající 0,1 % zahrnuje polymorfismy, jejichž nejjednodušší a nejběžnější forma jednonukleotidových záměn je označována jako SNP (Single Nucleotide Polymorphism) (Flegr, 2009). Tyto SNP jsou vhodné pro genetické studie testů příbuznosti, neboť jsou stabilní a roztroušeny po celém genomu s frekvencí jednoho polymorfního místa na 1000 bp v nekódujících oblastech. V kódujících oblastech případně jednonukleotidová diference na každých 1200 bp (Bruchová a kol., 2005).

Butler (2012) uvádí následující kategorie SNP polymorfismů:

- 1. SNP pro identifikační účely** - společně dávají velmi nízkou pravděpodobnost shody dvou jedinců se stejným multilokusovým genotypem.

-

- 1. SNP pro genealogické studie** - pevně spojené SNP sady v haplotypu, které fungují jako multialelické markery. Tyto sady SNP mohou sloužit k identifikaci příbuzných jedinců s vyšší pravděpodobností, než jednotlivé bialelické SNP.
- 2. SNP pro predikci původu** - společně určují s vysokou pravděpodobností původ jedince z jedné části světa nebo jsou odvozené ze dvou nebo více částí světa.
- 3. SNP pro predikci fenotypu** - určují s vysokou pravděpodobností fenotyp jedinců, jako je například barva očí a srsti.

3.3.3.6 STR nebo SNP?

Díky technologickému pokroku přicházejícímu ze studia lidského genomu a mezinárodních HapMap projektů byla v posledních letech v rámci studie DNA pro forenzní účely vznesena otázka: „Je potenciál SNP polymorfismů možnou náhradou aktuálně používaných krátkých tandemových repetitivních (STR)?“ (Butler a Vallone, 2007). STR mají menší diskriminační sílu, ale širší použitelnost degradovaných vzorků než doplňkové markery (OPO) a jednonukleotidové polymorfismy (SNP). SNP polymorfismy dostačují k určení otcovství a prokázání sourozenecké vazby, ale nejsou použitelné pro testy vzdálené příbuznosti (Mo et al., 2016). Svojí schopností kombinace v multiplexních testech za účelem získání informací z malého množství biologického materiálu, budou STR pravděpodobněji než SNP plnit rozhodující úlohu při testování příbuznosti v dohledné budoucnosti (Butler a Vallone, 2007).

3.3.4 Pravděpodobnost

Pravděpodobnost je považována za měřítko stupně důvěryhodnosti určité hypotézy. Pro tyto účely se s ní pracuje při vyhodnocování STR profilování, kde nám pomáhá vyjádřit jak velká je možnost, že údajný samec je otcem mláďat. Elston (1986) ve své studii uvádí, že o pravděpodobnosti je užitečné uvažovat jako o odhadu skutečného, ale neznámého množství. Tato fakta o pravděpodobnosti v případě sporného otcovství udávají, jestli potenciální otec je otcem mláďatek, a to buď 1, nebo 0 (může být také ekvivalentně vyjádřena procentuálně v rozmezí 0% až 100%), což odpovídá tomu, jestli skutečně je, či není otcem.

Pro tato tvrzení potřebujeme kromě znalosti Mendelových zákonů také využít pravidlo o Hardy-Weinbergově rovnováze a Bayesovu větu. V následujících podkapitolách proběhne seznámení s věrohodnostním poměrem, Bayesovou větou a následně se samotným výpočtem pravděpodobnosti.

3.3.4.1 Věrohodnostní poměr

Anglicky likelihood ratio (LR) je číslo, vyjadřující podíl dvou pravděpodobností, čili se jedná o pravděpodobnost, že daný jev nastane za určitých podmínek, děleno pravděpodobností, že určitý jev nastane za jiných podmínek, přičemž podmínky jsou vzájemně se vylučující. Při určování otcovství se pro věrohodnostní poměr používá označení index paternity, paternitní index (P_i). Základním paternitním indexem je podíl pravděpodobnosti výsledků genotypizace tria matka-dítě-otec a nabývá jakýchkoliv hodnot větších než nula. Pokud je LR větší, než jedna pak je dotyčný samec otcem. Pokud je menší než jedna, tak je otcovství méně pravděpodobné. Pokud je věrohodnostní poměr roven jedné, tak je důkaz irelevantní (Drábek, 2011).

3.3.4.2 Bayesova věta

Drábek (2011) ve své knize uvádí, že: „Tato věta představuje matematický teorém, který nám umožňuje upravit naše pravděpodobnostní očekávání ve světle nových důkazů.“

Máme-li dva náhodné jevy A a B s pravděpodobnostmi $P(A)$ a $P(B)$, přičemž $P(B) > 0$. Potom platí, že:

$$P(A|B) = \frac{P(B|A) P(A)}{P(B)},$$

3.3.4.3 Výpočet pravděpodobnosti

Dále v textu bude následující symbolika představovat:

π – pravděpodobnost tvrzení

i – představuje konstelaci fenotypů pro trio obsahující údajného otce, matku a dítě

X_i - značí podmíněnou pravděpodobnost takové konstelace, kdy je údajný samec

Y_i - podmíněná pravděpodobnost, že náhodný samec z téže populace je pravým otcem

L_i - koeficient pravděpodobnosti; někdy označován P_i – index paternity (věrohodnostní poměr)

Předpokládejme tedy existenci takové populace, kde se jedinci mezi sebou náhodně páří vzhledem k polymorfismu, a že v rámci této populace je též populace údajných otců, potom platí, že: Poměr π patří náhodnému triu otec-matka-mládě z této populace a část $1 - \pi$ jsou náhodní samci, jimž pár matka-mládě ze stejné populace byl náhodně připojen (Baur et al., 1986).

Obrázek 9 zobrazuje hodnoty X_i a Y_j pro každý z 27 uvedených fenotypů (v tomto případě také genotyp) tria. Vyobrazená tabulka v obrázku 9 předpokládá vzhledem k Hardy-Weinbergově rovnováze a absenci mutací i selekcí, že neexistuje žádná pochybnost o vztahu mezi matkou a dítětem. Hodnoty X_i a Y_i , jsou pravdivé (Baur et al., 1986), a od nich můžeme odvodit poměr pravděpodobností $L_i = X_i / Y_i$, které jsou také uvedeny v obrázku 9 (šest z možných genotypů tria nemůže nastat a L_i pro ně není definováno) (Majumder a Nei, 1983).

Z tabulky 2 vyplývá, že v této situaci může L_i nabývat pouze jednu ze šesti následujících hodnot: $1/p$, $1/2p$, 1 , $1/2q$, $1/q$, nebo 0 . Pro konkrétní konstelaci i se získá pravděpodobnost otcovství pomocí Bayesovy věty, protože tyto podmínky také vedou k platné pravděpodobnosti otcovství. Všechny tyto podmíněné pravděpodobnosti a poměry pravděpodobností lze snadno zobecnit pro umožnění vícenásobného alelismu, dominance nebo více systémů.

matka	potenciální otec	mládě								
		AA			Aa			aa		
		X_i	Y_i	L_i	X_i	Y_i	L_i	X_i	Y_i	L_i
AA	AA	p^4	p^3	$\frac{1}{p}$	0	p^4q	0	0	0	...
	Aa	p^3q	$2p^4q$	$\frac{1}{2p}$	p^3q	$2p^3q^2$	$\frac{1}{2q}$	0	0	...
	aa	0	p^3q^2	0	p^2q^2	p^2q^3	$\frac{1}{q}$	0	0	...
mezisoučet	p^3	p^3	...	p^2q	p^2q	...	0	0	...
Aa	AA	p^3q	p^4q	$\frac{1}{p}$	p^3q	p^3q	1	0	p^3q^2	0
	Aa	p^2q^2	$2p^3q^2$	$\frac{1}{2p}$	$2p^2q^2$	$2p^2q^2$	1	p^2q^2	$2p^2q^3$	$\frac{1}{2q}$
	aa	0	p^2q^3	0	pq^3	pq^3	1	pq^3	pq^4	$\frac{1}{q}$
mezisoučet	p^2q	p^2q	...	pq	pq	...	pq^2	pq^2	...
aa	AA	0	0	...	p^2q^2	p^3q^2	$\frac{1}{p}$	0	p^2q^3	0
	Aa	0	0	...	pq^3	$2p^2q^3$	$\frac{1}{2p}$	pq^3	$2pq^4$	$\frac{1}{2q}$
	aa	0	0	...	0	pq^4	0	q^4	q^5	$\frac{1}{q}$
mezisoučet	0	0	...	pq^2	pq^2	...	q^3	q^3	...
součet	p^2	p^2	...	$2pq$	$2pq$...	q^2	q^2	...

Obrázek 9. Podmíněné pravděpodobnosti tří fenotypů v případě kodominantních autozomálních lokusů s alelami A nebo a, a frekvencí alel p a q s ohledem na údajného otce (X_i) nebo náhodného samce (Y_i) je pravý otec a koeficient pravděpodobnosti $L_i = X_i / Y_i$ (Zdroj: Elston, 1986).

Výsledkem těchto postupů je buď otcovství prakticky prokázané (pravděpodobné), což představují hodnoty $1/p$, $1/2p$, 1 , $1/2q$, $1/q$ s ohledem na frekvenci genů p a q , nebo vyloučené, reprezentované hodnotou 0 . K vyloučení otcovství tedy teoreticky stačí pouze jeden STR polymorfismus, kdy domnělý otec nesdílí s mládětem ani jednu alelu.

3.4 Paternita šelem

3.4.1 Paternita psů (*Canis lupus familiaris*)

Mikrosatelitní sekvence, stejně jako minisatelity patří do třídy polymorfní DNA, která se běžně vyskytuje v savčí DNA. I když se mikrosatelity v populaci zvířat liší podstatně méně než minisatelity, mají velký potenciál pro zodpovězení otázek otcovství a příbuzenství. Nicméně, jejich neodmyslitelně nižší variabilita spolu s genetickou homogenitou u ušlechtilých psů v důsledku příbuzenské plemenitby, poukazuje na pochybnosti o jejich účinnosti pro tyto testy. Studie Zajíce et al. (1994) ukazuje, že psí mikrosatelity poskytují dostatečný základ pro přidělování otcovství v rodokmenu plemen. Tento systém testování vyžaduje pouze malé množství krve (0,1 ml) a jde jednodušeji provést a interpretovat, než testy založené na minisatelitech.

Chae et al. (1999) ve své práci uvádí, že pro individuální identifikaci a test otcovství u psů použily analýzu mikrosatelitních markerů. DNA všech relevantních psů byla získána stěrem z dutiny ústní. Tetranukleotidové repetice mikrosatelitních markerů byly amplifikovány metodou PCR. Následně byly analyzovány elektroforézou na polyakrylamidovém gelu a barveny stříbrem. Jejich studie prokázala užitečnost analýzy mikrosatelitních markerů jako jednoduchý a efektivní způsob testování otcovství u psů.

3.4.2 Paternita koček (*Felis silvestris*)

U koček (*Felis silvestris*, Linnaeus, 1758) se testy paternity provádějí zejména kvůli zjištění míry hybridizace doma chovaných jedinců a divoce žijících koček, nebo za účelem porovnání míry reprodukce venkovských a městských koček (Say et al., 1999).

Jako příklad uvádím studii podle Say et al. (1999), která podává informace o analýze otcovství u domácích koček v populaci lišící se strukturou přirozeného prostředí (venkovské proti městskému). Testováno bylo celkem 312 potomků, 76 matek a 65 domnělých otců. Zadáno bylo devět mikrosatelitních markerů. Jejich data ukázala vysokou míru vícenásobného otcovství kocourů z městské populace (70 - 83% vrhů), zatímco míra otcovství kocourů z venkovské populace byla mnohem nižší (0-22% vrhů). Samci v městské populaci se reprodukovali, jakmile dosáhli pohlavní dospělosti (tj. deset měsíců věku), zatímco většina samců venkovské populace má zpožděnou reprodukci ve věku tří let.

3.4.3 Paternita norka amerického (*Mustela vision*)

U norka amerického (*Mustela vision*, Schreber, 1777) prováděli testy paternity Yamaguchi et al. (2004) za účelem zjištění vícenásobného otcovství a reprodukčních taktik. Uvádějí, že použili 7 mikrosatelitních markerů (uvedené v tabulce 1) a jejich srovnáním získali důkaz, že v této populaci došlo k vícenásobnému otcovství. Ačkoli si samci zachovávají území po většinu roku, neovlivní otcovství vrhů v oblastech mimo jejich územní hranice. Neschopnost samce monopolizovat otcovství, spolu se schopností nepřetržité ovulace samice (tzv. superfetace) do značné míry vysvětluje, proč se samci vzdávají teritoriality během období rozmnožování. Superfetace umožňuje oplodnění vajíček z různých ovulací různými samci. Ke schopnosti superfetace může dojít ve větší míře i u příbuzných druhů a vyžaduje přehodnocení sociobiologie čeledi *Mustelidae*.

Lokus	Počet alel	Rozsah velikostí Párů bází	Očekávaná heterozygotnost
Mvi111	9	90–114	0.861
Mvi114	9	71–89	0.707
Mvi219	4	165–175	0.470
Mvi232	6	145–161	0.657
Mvi24	4	132–140	0.247.
Mvi54	8	91–129	0.706
Mvi87	8	74–88	0.771

Tabulka 1. 7 mikrosatelitních markerů používaných k ověřování paternity norka (Zdroj: Yamaguchi et al., 2004).

3.5 Paternita fretek

Paternita u fretek se v současné době nehodnotí, tudíž v této kapitole proběhne charakterizace mikrosatelitních makerů fretky. Dále zde budou popsány možnosti využití těchto testů u fretek.

3.5.1 Charakterizace mikrosatelitních makerů

Ernest et al. (2012) ve své studii uvádí, že izolovali celkem 126 mikrosatelitních sekvencí z částečných genomových knihoven. Čtyřicet osm bylo vyřazeno z dalšího posuzování kvůli nejednoznačnému čtení na elektroferogramech. Zbývajících 78 sekvencí přineslo jasné proužky DNA domácích fretek, divokých tchořů a hybridů vzniklých křížením mezi tchoři a domácími fretkami pocházejících z Austrálie a USA. Konečný soubor dvaadvaceti markerů poskytující polymorfismy a amplifikační produkty v očekávaném rozmezí velikostí uvádí tabulka 2. U domácích fretek markery nevykazovaly významné odchylky od požadavků na rovnovážnou populaci podle Hardy-Weinberga.

Marker	Štítek Dye	Velikost produktu PCR (bp)	Opakující se motiv	Sekvence primeru (5'-3')
Mpu A4w ¹	vic	152–174	(AC)23	F: CACTTCCTCCCATGGACACT R: CAAAGTCTCCCACCCTATGC
Mpu A10w	ned	154–158	(AC)13(AC)7	F: TGGCCTATATGTGCAGATGAC R: TGTTTGTCTTGTACCCTCTGACC
Mpu A115w	pet	164–188	(TG)17	F: CACTGTTAGGGGAAGGAAGA R: CTAAGAGTGTTCTGATTGCAT
Mpu A121w ⁷	fam	105–129	(CA)14	F: ACTGCCATCAGGTCATCTAGG R: GGGTAGACACCTGGCTCAAG
Mpu A129w ⁷	fam	197–205	(CA)13	F: GGCCTCTGAACACATAGTTG R: AAGTACAGAATGGAAGGATCTG
Mpu A212w ¹	fam	137–153	(TG)13	F: CCCTATGAGGGCATGTTTGT R: CTGCCATGTTTCCACTGGT
Mpu A223w ³	ned	213–239	(GT)19	F: GAAGACAGCACCCAGAGTC R: TGGTTGCCAAGAAGACTAGCAG
Mpu A229w ⁴	pet	107–139	(GT)11(TG)7	F: GGGTAGGACGTGCTTAAAGATG R: AGCCCTCAAAGCCTCTTCTC
Mpu A231w ⁶	vic	182–224	(GT)15	F: CCTCTGGTAACCATCTGTTTG R: TCTTCAAGATGTTCAAGTGTGGA
Mpu B1w ⁴	vic	178–190	(CT)15(CA)8 (AC)5(AC)11	F: TCCACTACCTGGCCTCATTC R: ACCTCAGGCTCCACTCTCAG
Mpu B6w ²	ned	156–164	(TC)18	F: TGGGTGTAGAGCATGTTTGG R: TGCCTATTCCAGGTACCTCAT
Mpu B9w ⁷	vic	180–192	(GA)18	F: CGTTACCAACTGTGGCTGTG R: TGCCTGGGCCTGTGATTA
Mpu B12w ³	fam	175–179	(AG)11(AC)8 (AC)7	F: AGTCGACAGATGAGTCCACGAAG R: TGTCACACATGGCAGGATCT
Mpu B112w ⁵	fam	161–165	(AG)14	F: CCATTACAAGTGCTTGGAGACA R: TGGAACATGCTGGAAATTGT
Mpu B202w ³	pet	164–168	(CTC)5(GA)14	F: TCTCCTCCTCCTCCTCCTC R: ATGAGATTGACCGTGCATCA
Mpu B209w ²	vic	119–125	(CT)16	F: TGCTTCTCCCTCTGACTGCT R: CCGCCCAAGTATCCCTAAAT
Mpu B217w ³	vic	126–144	(TC)5(TC)17	F: TTCCCTGCTTGTGCTCTCTT R: TGGGGTAAGGGTAGGTATGC
Mpu C4w ⁷	ned	147–163	(TCCA)9	F: CTGGCCCTATCACATACATATTCA R: GGAAGTATACTCATGCCTGCAA
Mpu C102w ³	fam	119–135	(TGGA)7	F: GGGTGGATGGGTGAGTAGGTA R: CCTTCCACATTCCATCCTT
Mpu D207w ⁵	ned	188–214	(CT)10 (ATAG)7	F: CAGGTGAAGAAGTCCCTCTGT R: CTTGGTTCTGACCATTTGGA
Mpu D209w ⁴	fam	165–185	(TATC)7	F: GAACAGCAAGTAGTCCAACCTCTCA R: GTTGGATCCTTTCCATCACC
Mpu D231w ²	fam	132–160	(GATA)9	F: TTTGGGTTCCACAGTAGGTG R: ATGCTCTCAATCCATGCTCA

Tabulka 2. Charakteristika 22 mikrosatelitních markerů izolovaných z domácí fretky (*Mustela putorius furo*) (Zdroj: Ernest et al., 2012).

3.5.1.1 Test mikrosatelitních markerů norka u fretky

Cílem práce Anistoroaei a Christensen (2006) bylo porovnat mikrosatelitní markery norka a fretky a zhodnotit jejich použitelnost pro genetické analýzy napříč obou druhů.

Vzhledem k velké podobnosti fretky s norkem proběhla analýza jejich mikrosatelitních markerů pomocí metody PCR. Bylo zjištěno, že 38 z 59 markerů, což činí 64,5%, je stejně velkých u obou druhů, zatímco 5 markerů, tedy 8,5%, se svou velikostí liší, 16 markerů, 27%, nebylo v genomu fretky. Sekvencováno bylo 10 produktů PCR včetně těch, které si byly vzájemně podobné, i těch, které se lišily velikostí (interpretace rozdílných výsledků je znázorněna v tabulce 3). Amplifikované sekvence Mvi4029, Mvi4050 a Mvi4052, respektive DQ361080, DQ361082 a DQ361084 obsahují stejný opakující se vzor motivu, ale opakování nejsou zcela dokonalá. Několik variačních bodů existujících v rámci opakovaných sekvencí se musely objevit až po speciaci, protože v závorkách regionů si jsou velmi podobné. U sekvence Mvi4052 (DQ361084) došlo zcela ke ztrátě repetice v průběhu evoluce (obrázek 10). Pro Mvi4023, Mvi4051, Mvi4079 a Mvi4097 sekvence (DQ361079, DQ361083, DQ361085 a DQ361086) je opakovaný vzor stejný u obou druhů, pouze s mírnými rozdíly v počtu opakování. Sekvence Mvi4079 (DQ361085) obsahuje navíc mikrosatelit fretky, který neexistuje u norka. Amplifikace sekvence Mvi4003, Mvi4013 a Mvi4039 (DQ361076, DQ361077 a DQ361081) primerů, které se lišily od norka velikostí sekvencí, odhalila vysoký stupeň podobnosti v místě primerů a to přibližně až 120 nukleotidů. V rámci těchto sekvencí byly zaznamenány četné mezery proložené velmi podobnými úseky. Závěr byl, že amplifikované sekvenční podobnosti mohou nastat díky rozptýleným repetícím, které se velmi často vyskytují v savčích genomech (Anistoroaei a Christensen, 2006).

Výsledky této studie dospěly k závěru, že mikrosatelitní markery norka amerického mohou být využity pro genetické analýzy fretky pouze v omezené míře. Vzhledem k jejich vzájemné podobnosti se hypoteticky předpokládala větší podobnost mikrosatelitních markerů mezi oběma druhy a tudíž širší využitelnost pro genetické analýzy.

Název markeru	Sekvence u norka	Sekvence u fretky	Opakující se motiv norka	Opakující se motiv fretky	komentář
Mvi4003	DQ270766	DQ361076 a DQ361077	(ATTT)6 + (AG)6	Není	Rozdílná amplifikace
Mvi4013	DQ270776	DQ361078	(CT)3(TC)(CT)7...(AA)4 (TCTT) (AA)11	Není	Rozdílná amplifikace
Mvi4023	DQ270786	DQ361079	(TG)18	(TG)12	6 dinukleotidových. mezer
Mvi4029	DQ270792	DQ361080	(CTCCTG)4... (CTGCTC)4	Není	Stejný model opakování
Mvi4039	DQ270802	DQ361081	(AA)13	Není	Rozdílná amplifikace
Mvi4050	DQ270813	DQ361082	(AAAT)6	Není	Stejný model opakování
Mvi4051	DQ270814	DQ361083	(AAGA)9...(TTTTA)6	(AAGA)9 (TTTTA)4	2 pentanukleotidové mezery
Mvi4052	DQ270815	DQ361084	(TT)13	Není	Opakující se místo zmizelo
Mvi4079	DQ270842	DQ361085	(AC)12	(GA)9... (CA)14	9 extra dinucleotidových a 2 dinucleotidové mezery
Mvi4097	DQ270813	DQ361086	(TG)8AT(TG)5A(TG)8	(GT)5 (GT)11	Rozdíly v opakujícím se místě

Tabulka 3. Srovnání markerů a produktové sekvence fretky a norků – interpretace rozdílných výsledků (Zdroj: Anistoroaei a Christensen, 2006).

```

Norek      -MTTCCBCCGNGKTRCCATTLEA GTTTAGAAACAAAGCAATTCBAATACGTTTTCTCCAAAGAT 59
Fretka     TATTTUURCHLW-CRCCATUUALTTIAGAAALAAA-CAATTUAAIACUWUUTUCLAAAGAT 60
*****

Norek      TTC CAAG GCAAT -GAC TTAGTAATATTTCTTCTGTATCTCCCTAC GFICTTTTTTTT 118
Fretka     TTC CAAG GCAATCGAC TTAGTAATATTTCTTCTGTATCTCCCTAG GTTCTTTAGC TTT 120
*****

Norek      TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTAGCTTTGAGACCTTTAAAAAAA-GTCTCTTTATGANAAC AAT 177
Fretka     A-----AGCTTTGAGACCTTTAAAAAAAAGTCTCTTTATGAGAAC AAT 163
*****

Norek      GHTTCAGC CATCTTTTTC AAGTAAGCTTGTAAATTGGGACAAAAGATGACC CTT- 232
Fretka     GHTTCAGC CATCTTTTTC AAGTAAGCTTGTAAATTGGGA-AAAGATGACC CTTA 218
*****

```

Obrázek 10. Chybějící opakující se mononukleotid u fretky v sekvenci DQ361084 (Mvi4052) (Zdroj: Anistoroaei a Christensen, 2006).

3.5.2 Možnosti využití paternitního testování u fretky

I když v rámci tohoto druhu neexistují žádná plemena, tak zde existují ustálené barevné rázy. Jak uvádí Lewington (2007), nebylo zatím možné plně charakterizovat genetický vliv na barvu jejich srsti, protože se na to do současnosti příliš nekladl důraz. Tato informace dává základ k využívání testů paternity u fretek. Dále je také důležité v rámci jejich chovu zmapování chovných linií a evidence uchovněných jedinců, zejména kvůli inbreedingu. Toto si vzala za úkol v rámci České republiky nově vzniklá organizace chovatelů fretek. Ke vzniku ČSCH ZSOCHF (<http://schf.webnode.cz/>) došlo na přelomu let 2010/2011. ČSCH ZSOCHF je registrováno jako základní organizace pod Českým svazem chovatelů. Budoucím cílem provádění testů paternity v chovu fretek je tedy zejména zamezení možnosti

inbreedingu a přenosu dědičných chorob do dalších generací. Tyto testy lze také využít při mapování toků genů v divoké populaci tchoře (hybridizace vypuštěných fretek s divokými jedinci).

3.5.2.1 Inbreeding

Inbrední populace trpí ztrátou schopnosti odolávat vnějším stresům. Je zde častější uplatňování recesivních genů, které mohou nést genetické choroby, jež se v běžné populaci většinou neprojevují. Dále způsobuje pokles vitality a genetické variability. Mezi příznaky inbreední deprese patří: potíže s plodností, méně početné vrhy, nedostatečná životaschopnost mláďat, menší velikost mláďat, poruchy sacího reflexu, vyšší náchylnost k chorobám, neschopnost vytvořit si dostatečnou hladinu protilátek po očkování, poruchy chování (nervové problémy, větší kousavost), nižší inteligence a v neposlední řadě také kratší délka života (Ralls et al., 1988).

3.5.2.2 Dědičné choroby

Dědičné choroby a vady se u fretek vyskytují, stejně jako v každé populaci, a měly by se v chovu cíleně eliminovat. Eliminaci dědičných chorob lze uskutečnit vyřazením nemocných jedinců z chovu. Testy paternity by mohli přispět k zamezení šíření těchto chorob tím, že zájemcům potvrdí původ mláďat a tudíž si můžeme ověřit zdravý rodičů a to buď vizuální kontrolou, nebo veterinárními či genetickými testy. Například je popsáno 13 nádorových onemocnění vyskytujících se u tohoto druhu. První hlášený případ se objevil v roce 1950. Od roku 1950 do roku 1979 bylo hlášeno pouze 20 případů a téměř všechny pocházely z

laboratoře či zoologických sbírek. V následujících 10ti letech tyto případy rapidně vzrostly - hlášeno bylo více než 170 dalších případů a z toho polovina z nich pocházela z domácích zájmových chovů (Beach a Greenwood 1993). Mezi další časté dědičné choroby vyskytující se v chovu fretek, které je třeba eliminovat patří cukrovka (BenoitBiancamano et al., 2005), epilepsie (Schwartz a Bonhoeffer, 2001) a Waardenburgův syndrom (Moya et al., 2014).

3.5.2.3 Hybridizace mezi fretkami a tchoři

Obava z hybridizace mezi tchoři a fretkami v Británii vedla Davisona et al. (1999) k prozkoumání zejména rozšiřující se populace východního okraje této země. Je genetická integrita tchoře ohrožena hybridizací? Toto se to stalo například u divoké kočky (*Felis silvestris*) a u vlka červeného (*Canis rufus*) (Abernethy, 1994; Brownlow, 1996). V tomto případě byla použita mitochondriální DNA a její sekvenční zpracování na zodpovězení otázky, zda zůstávají všechny britští tchoři/ fretky v populaci geneticky odlišní navzdory svojí hybridizaci. Toto je důležité zejména s ohledem na spor, která biologická jednotka by měla být chráněna (Awise, 2012).

Davison et al. (1999) nakonec zjistil, že rod tchoře ve Velké Británii se vyskytuje převážně v oblasti Walesu a v anglických pohraničních okresech, zatímco divoké fretky se vyskytují v celé Británii.

4 Diskuze

Ač se testy paternity v současné době u fretek nevyužívají, v rámci České republiky si Svaz chovatelů fretek, který vznikl teprve nedávno (2010-2011) a je registrován jako základní organizace pod Českým svazem chovatelů, vzal určité cíle, pro které by testy paternity byly přínosné a napomohly k jejich efektivnímu naplnění. Tento svaz se zaměřuje především na drobné chovatele a nabádá je, aby odchovávali pouze zdravé a přátelské jedince. Dále se zde budou cíle této organizace do budoucnosti diskutovat.

Jedním z cílů je mapování chovných linií, které by zabraňovalo inbreedingu. Fretek, u kterých je znám jejich původ je v České republice velmi málo a z tohoto důvodu na nich nelze založit cílený chov. Zanedlouho by došlo k příbuzenské plemenitbě, což by vedlo k devastaci chovné populace. V tomto případě by byl vhodný import chovných jedinců ze zahraničí. Ralls et al. (1988) uvádí, že samice z inbreední populace trpí problémy s plodností, mají méně početné vrhy a jejich mláďata mají nedostatečnou životaschopnost a trpí poruchy sacího reflexu. Chov takovýchto jedinců by se neměl podporovat, ale naopak by se měl cíleně eliminovat. Testy paternity by tento problém pomohly efektivně vyřešit. Každý chovatel by přesně věděl, z jakého chovu a od jakých rodičovských párů pocházejí jeho fretky, čímž by se mohl aktivně podílet na omezení problému příbuzenské plemenitby a udržovat genetickou variabilitu doma chovaných jedinců.

Dalším hlavním cílem svazu chovatelů fretek, kde by se měly testy paternity využívat, je chov založený na jedincích, kteří byly uchovněni - čili posouzeni kvalifikovanými poradci chovu. Cílený chov fretek v České republice představuje běh na dlouhou trať, a to zejména proto, že je chováno stále mnoho fretek bez známých předků, které byly zakoupeny ve zverimexech. Bohužel na nich drobní chovatelé odchovávali mláďata, bez posouzení vhodnosti k chovu. Testy příbuznosti by případnému zájemci potvrdily původ od uchovněných jedinců a budoucí chovatel se koupí takového mláděte může zapojit do zkvalitnění a rozšíření cíleného chovu.

Sledování zdravotního stavu chovné populace a omezení vzniku nežádoucích genetických vad a dispozic pro dědičné choroby je posledním hlavním cílem tohoto svazu do budoucna, kde by se daly uplatnit testy paternity. Fretky trpí řadou dědičných chorob a vad, které postihují a znehodnocují jejich chov. Beach a Greenwood (1993) uvádějí, že nádorových

onemocnění bylo v letech 1950-1979 hlášeno jen nepatrné množství. O deset let později jejich výskyt rapidně vzrostl, a to zejména v zájmových chovech. Další choroby a vady postihující tato zvířata jsou uvedeny výše. Z tohoto důvodu není vhodné rozmnožovat fretky bez rozmyslu. Je třeba každého jedince, kterého chceme zařadit do chovu nechat posoudit, zda nemá závažné dědičné vady či predispozice k chorobám, které by mohl přenášet na své potomky a tím je v chovu nadále šířit. Zde by testy paternity pomáhaly taktéž při ověřování původu mláďete – zda je od zdravých rodičů, či není. Prodávající by budoucímu chovateli doložil výsledky veterinárních a genetických testů, které by prokazovaly zdraví rodičů mláďete.

Lewington, (2007) uvádí, že nebylo zatím možné plně charakterizovat genetický vliv na barvu jejich srsti. Důvodem pravděpodobně je, že se do současnosti příliš nekladl důraz na pravidelné dokumentování důležitých charakteristik jako je pigmentace srsti a podsady, pigmentové značení pokožky a zároveň není příliš rozšířen cílený chov fretek, ve kterém by byly mapovány chovné linie. Tuto otázku by pomohl objasnit chov velkého množství fretek ve venkovních voliérách po mnoho generací a následná archivace údajů pro následující studie. K této problematice se samozřejmě vztahují testy paternity, které by pomohly osvětlit otázku otcovství mláďat, která je v tomto případě nezbytná.

Zajímavou studií je také studie Davison et al. (1999), která posouvá testy paternity z domácích chovů do volné přírody. Uvádí problematiku spojenou s hybridizací mezi fretkami a tchoři. Jak je uvedeno výše, domácí fretky se dokáží plodně křížit s evropskými tchoři. Zde by se testy příbuznosti našly uplatnění v rámci populační genetiky a to zejména při zjišťování toku genů a míry hybridizace u divoké populace.

5 Závěr

Cílem této práce bylo prostřednictvím literární analýzy popsat současné metody testování paternity u domestikovaných šelem a její možnosti využití u fretek (*Mustela putorius furo*).

Genom fretky se používá zejména pro studie virových respiračních onemocnění a cystické fibrózy u lidí, proto jsou informace většinou omezené pouze na výzkum těchto chorob. Další informace genetického charakteru pocházejí také z fylogenetické analýzy, která zkoumá především nejasné předchůdce těchto zvířat.

V současné době se k testům paternity u šelem používá analýza mikrosatelitních markerů pomocí PCR reakce. V této práci je uvedena charakterizace mikrosatelitních markerů podle studie Ernesta et al. (2012), které se k těmto testům používají a následně jsou zde popsány možnosti využití u fretek.

Pokud poroste zájem o cílený chov těchto zvířat, jistě tyto testy najdou využití v chovech zodpovědných chovatelů, kteří chtějí mít svůj chov nejen zdravý, ale také budou moci doložit původ chovaných zvířat a prodávaných mláďat. Omezí se tím podvody s cílem záměrného poškozování vlastnických práv budoucího majitele vybraného jedince, případný inbreeding a šíření dědičných chorob, což může hypoteticky přispět ke zkvalitnění chovu těchto zvířat.

6 Seznam literatury

Abernethy, K. 1994. The establishment of a hybrid zone between red and sika deer (genus *Cervus*). *Molecular Ecology*. 3 (6). 551.

Akhmetov, I., Bubnov, R. V. 2015. Assessing value of innovative molecular diagnostic tests in the concept of predictive, preventive, and personalized medicine. *The EPMA Journal*. 6 (1). 1-12.

Albrecht, K., Schultheiss, D. 2004. Proof of paternity: historical reflections on an andrological–forensic challenge. *Andrologia*. 36 (1). 31-37.

Andrews, P. L. R., Bower A. J., Illman O. 1979. Some aspects of the physiology and anatomy of the cardiovascular system of the ferret, *Mustela putorius furo*. *Laboratory animals*. 13 (3). 215-220.

Anistoroaei, R., Christensen, K. 2006. A test of mink microsatellite markers in the ferret: amplification and sequence comparisons. *Hereditas*. 143 (1). 198-201.

Anistoroaei, R., Farid, A., Benkel, B., Cirera, S., Christensen, K. 2006. Isolation and characterization of 79 microsatellite markers from the American mink (*Mustela vison*). *Animal genetic*. 37 (2). 185–188.

Awise, J. C. 2012. *Molecular Markers, Natural History and Evolution*, Springer Science & Business Media. New York. 511 p., ISBN: 1461523818.

Baur, M. P., Elston, R. C., Gürtler, H., Henningsen, K., Hummel, K., Matsumoto, H., Mayr, W., Moris, J. V., Niejenhuis, L., Polesky, H., Salmon, D., Valentin, J., Walkers, R. 1986. No fallacies in the formulation of the paternity index. *American Journal of Human Genetic*. 39 (4). 528–536.

Bays, T. B., Lightfoot, T., Mayer, J. 2006. *Exotics Pet Behavior. Birds, Reptiles, and Small Mammals*. Missouri, USA. 360 p. ISBN: 1416000097.

Beach, J. E., Greenwood, B. 1993. Spontaneous neoplasia in the ferret (*Mustela putorius furo*). Journal of comparative pathology. 108 (2). 133-147.

Benoit-Biancamano, M., Morin, M., Langlois, I. 2005. Histopathologic lesions of diabetes mellitus in a domestic ferret, Canadian veterinary journal [online], 46 (10). 895.

Blandford, P. R. S. 1987. Biology of the polecat *Mustela putorius*: a literature review. Mammal review. 17 (4). 155-197.

Boulay, J. L., O'Shea, J. J., Paul, W. E. 2003. Molecular phylogeny within type I cytokines and their cognate receptors. Immunity. 19 (2), 159-163.

Brownlow, C. A. 1996. Molecular Taxonomy and the Conservation of the Red Wolf and Other Endangered Carnivores. Conservation Biology. 10 (2). 390-396.

Broom, D. M., Fraser, A. F., 2015. The welfare of animals kept for fur production, In: Broom, D. M., Fraser, A. F., (ed). 2015. Domestic animal behaviour and welfare. CABI. United Kingdom. p. 308-312. ISBN: 1780645392.

Brownstein, M. J., Carpten, J. D., Smith, J. R. Modulation of non-templated nucleotide addition by Taq DNA polymerase: Primer modifications that facilitate genotyping. Biotechniques [online]. 1996. [cit. 2016-01-25]. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/infodroje.czu.cz/pubmed/8780871>

Bruder, C. E., Yao, S., Larson, F., Camp, J. V., Tapp, R., McBrayer, A., Powers, N., Granda, W. V., Jonsson, C. B. Transcriptome sequencing and development of an expression microarray platform for the domestic ferret. BMC Genomics [online]. 2010 [cit. 2016-01-20]. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/infodroje.czu.cz/pmc/articles/PMC2873475/>

Bruchová, H., Kráčmarová, A., Černý, V., Brdička, R.. 2005. Využití technologie LabMAP Luminex pro detekci SNP polymorfismů. Klinická biochemie a metabolismus. 13 (34). 87–91.

Bueno, L., Fioramonti, J., More, J. 1981. Is there a functional large intestine in the ferret? *Experientia*. 37 (3). 275-277.

Budowle, B., Garofano, P., Hellman, A., Ketchum, M., Kanthaswamy, S., Parson, W., van Haeringen, W., Fain, S. 2005. Recommendations for animal DNA forensic and identity testing. *International Journal Of Legal Medicine*. 119 (5). 295-302.

Bugert, P., Rink, G., Kemp, K., Klüte, H. 2012. Blood group ABO genotyping in paternity testing. *Transfusion Medicine and Hemotherapy*. 39 (3). 182-186.

Butler, J. M. 2011. Chapter 5: Short tandem repeat (STR) loci and kits. In: Butler, J. M. (ed). 2011. *Advanced Topics in Forensic DNA Typing: Methodology*, Academic Press. USA. p. 99-141. ISBN: 0123878233.

Butler, J. M., Vallone P. 2007. STRs vs. SNPs: thoughts on the future of forensic DNA testing. *Forensic Science Medicine*. 3 (3). 200-205.

Cabili, M. N., Trapnell, C., Goff, L., Koziol, M., Tazon-Vega, B., Regev, A., Rinn, J. L. 2011. Integrative annotation of human large intergenic noncoding RNAs reveals global properties and specific subclasses. *Genes a Development*. 25 (1). 1915–1927.

Clubb, R., Manson, G. J. 2007. Natural behavioural biology as a risk factor in carnivore welfare: How analysing species differences could help zoos improve enclosures. *Applied Animal Behaviour Science*. 102 (3-4). 300-328.

Dakin, E. E., Avise, J. C. 2004. Microsatellite null alleles in parentage analysis. *Heredity*. 93. 504–509.

Davison, A., Birks, J. D. S., Griffiths, H. I., Kitchener, A. C., Biggins, D., Butlin, R. K. 1999. Hybridization and the phylogenetic relationship between polecats and domestic ferrets in Britain, *Biological Conservation*. 87 (2). 155–161.

- Drábek, J., 2011. Interpretace DNA profilů při určování otcovství a příbuznosti. Tribun EU. Česká republika, 95 s., ISBN: 8026300661.
- Ernest, H. B., Drazenovich, T. L., Dalbeck, L. S., Hawkins, M. G. 2012. Isolation and Characterization of Microsatellite Markers in the Domestic Ferret (*Mustela putorius furo*). International Journal of Molecular Science. 13 (12). 16592–16597.
- El-Alfy, S. H., Abd El-Hafez, A. F. 2012. Paternity testing and forensic DNA typing by multiplex STR analysis using ABI PRISM 310 Genetic Analyzer. Journal of Genetic Engineering and Biotechnology. 10 (1). 101-112.
- Elston, R. C. 1986. Probability and paternity testing. American Journal of Human Genetics. 39 (1). 112–122.
- Evans, H. E. Anatomy of the ferret. In: Fox, J. G., Marrini, R. P., (eds). 2014. Biology and Diseases of the Ferret. John Wiley & Sons. Baltimore. 19-69. ISBN: 1118782739.
- Fisher, P. G. 2006. Ferret behavior. In: Bays, T. B., Lightfoot, T., Mayer, J. 2006. Exotics Pet Behavior. Birds, Reptiles, and Small Mammals. Missouri, USA. p. 163-207. ISBN: 1416000097.
- Flégr, J. 2009. Polymorfismus. In: Flégr, J. (ed). 2009. Evoluční biologie, Česká republika, p. 162-175. ISBN: 978-80-200-1767-3
- Fox, J. G., Taxonomy, history and use. In: Fox, J. G., Marrini, R. P., (eds.). 2014. Biology and Diseases of the Ferret. John Wiley & Sons. Baltimore. p. 3-18. ISBN: 1118782739.
- Frykman, I. 1972. Chromosome studies of *Mustela putorius* in tissue culture. Hereditas. 70 (1). 59-68.

Geserick, G., Wirth, I. 2012. Genetic kinship investigation from blood groups to DNA markers. *Transfusion Medicine and Hemotherapy*. 39 (3). 163-175.

Grzimek, B. Werner, I. 1990. Grzimek's encyclopedia of mammals. Svazek 3. McGraw-Hill. Michiganská univerzita. 550 p. ISBN: 0079095089.

Hahn, E. W., Wester, R. C. 1969. The biomedical use of ferret in research. Marshall Research Animals, University of Minnesota. 52 p. Dostupné také z: https://books.google.cz/books?id=X4YeAQAAMAAJ&q=the+biomedical+use+of+ferret+in+research&dq=the+biomedical+use+of+ferret+in+research&hl=cs&sa=X&redir_esc=y

Hardwick, J. 2015. Policing paternity: historicising masculinity and sexuality in early-modern France. *European Review of History*. 22 (4). 643-657.

Hellmann, A. P., Rohleder, U., Eichmann, C., Pfeiffer, I., Parson, W., Schleenbecker, U. 2006. A Proposal for Standardization in Forensic Canine DNA Typing: Allele Nomenclature of Six Canine-Specific STR Loci. *Journal of forensic sciences*, 51 (2). 274-281.

Hosoda, T., Suzuki, H., Hrada, M., Tsuchiya, K., Han, S. H., Zhang, Y. 2000. Evolutionary trends of the mitochondrial lineage differentiation in species of genera *Martes* and *Mustela*. *Genes & Genetic Systems*. 75 (5). 259.

Hrapkiewicz, K., Medina, L. 2006. *Clinical Laboratory Animal Medicine: An Introduction*. John Wiley & Sons. Iowa. 384 p. ISBN: 0813829666.

Chae, Y. J., Kim, D. K., Kim, H. N., Lee, M. H., Hwang, W. S., Lee, B. C., Youn, H. Y., Lee, H. Paternity test in dogs by microsatellite allele analysis. *Korean Journal of Veterinary Research* [online], 39 (1), 1999 [cit. 2016-01-11]. Dostupné z: <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=KR2000000737>

Church, B. Ferret-pollecat domestication: genetic, taxonomy and phylogenetic relationship. In: Lewington, J. H. (ed). 2007. Ferret Husbandry, Medicine and Surgery. Elsevier. United Kingdom. p. 30-39. ISBN: 0702028274.

Innis, M.,A., Gelfand, D. H., Sninsky, J. J., White, T. J. Part one: Basic methodology In: Innis, M. A., Gelfand, D. H., Sninsky, J. J., White, T. J. 2012. PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. Academic Press. USA. p. 3-168.. ISBN: 008088671X.

Ivey, E., Morrisey, J. Ferrets: examination and practice medicine. Exotic Animal Practice [online], 1999 [cit. 2016-01-15]. Dostupné z: <http://europepmc.org/abstract/med/11228740>

Jones, K. C., Levine, K., Banks, J. 2002. Characterization of 11 polymorphic tetranucleotide microsatellites for forensic applications in California elk (*Cervus elaphus canadensis*). Molecular Ecology. 2 (4). 425–427.

Kaufman, L.,W. 1980. Foraging cost and meal patterns in ferrets. Physiology Behavior. 25 (1). 139–141.

Kobasa, D., Jones, S. M., Shinya, K., Kash, J. C., Copps, J., Ebihara, H., Feldmann, F. 2007. Aberrant innate immune response in lethal infection of macaques with the 1918 influenza virus. Nature. 445 (7125). 319-323.

Lewington, J. H. 2007. Ferret Husbandry, Medicine and Surgery. Elsevier. United Kingdom. 521 p. ISBN: 0702028274.

Li, C. C., Chakravarti, A. 1984. Estimating the prior probability of paternity from the results of exclusion tests. American Journal of Human Genetic. 39 (4). 528–536.

Li, Y. C., Korol, A. B., Fahima, T., Beiles, A., Nevo, E. 2002. Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutational mechanisms. Molecular Ecology. 11 (12). 2453-2465.

- Lindeberg, H. 2008. Reproduction of the female ferret (*Mustela putorius furo*). *Reproduction domestic animal*. 43 (2). 150-156.
- MacDonald, D. W. 1992. *The Velvet Claw: A Natural History of the Carnivores*. BBC Books. United Kingdom. 256 p. ISBN: 0563208449.
- Majumder, P. P., Nei, M. A. 1983. Note on positive identification of paternity by using genetic markers. *Human Heredity*. 33 (1). 29–35.
- McKay, J. 2006. *Ferret Breeding: A Modern Scientific Approach*, Swan Hill Press. Shrewsbury, UK. 245 p. ISBN: 190405756X.
- Metzgar, D., Bytof, J., Wills, C. 2000. Selection against frameshift mutations limits microsatellite expansion in coding DNA. *Genome Research*. 10. 72–80.
- Michaux, J. R., Hardy, O. J., Justy, F., Fournier, P. 2005. Conservation genetics and population history of the threatened European mink *Mustela lutreola*, with an emphasis on the west European population. *Molecular Ecology*. 14 (8). 2373 – 2388.
- Mo, S. K., Ya-Cheng, L., Sheng-qi, W., Bo, X. Ch., Li, Z., Chen, Y., Ni, M. 2016. Research paper: Exploring the efficacy of paternity and kinship testing based on single nucleotide polymorphisms. *Forensic Science International: Genetics*. 22. 161-168.
- Moya, A., Mínguez, J. J., Martorell, J., Gallinato, M. J., Recio, A. 2014. Congenital Peripheral Vestibular Syndrome in a Domestic Ferret (*Mustela putorius furo*). *Journal of Exotic Pet Medicine*. 23 (3). 287-293.
- Nakata, M., Itou, T., Sakai, T. 2008. Molecular Cloning and Phylogenetic Analysis of Inflammatory Cytokines of the Ferret (*Mustela putorius furo*). *Journal of Veterinary Medical Science*. 70 (6). 543-550.

Omodeo, P., Renzoni, A. 1966. The karyotype of some Mustelidae. *Caryologia*. 19 (2). 219-226.

Ouborg, N. J., Pertoldi, C., Loeschke, V., Bijlsma, R., Hedrick, P. W. Conservation genetics in transition to conservation genomics. *Trends in Genetics* [online]. 2010 [cit. 2016-01-11]. Dostupné z: <http://www.cell.com/trends/genetics/fulltext/S01689525%2810%2900003-X>

Peng, X., Alföldi, J., Gori, K., Eisfeld, A. J., Tyler, S. R., Tisoncik-Go, J., Brawand, D., Law, G. L., Skunca, N., Hatta, M., Gasper, D. J., Kelly, S. M., Chang, J., Thomas, M. J. 2014. The draft genome sequence of the ferret (*Mustela putorius furo*) facilitates study of human respiratory disease. *Nature Biotechnology*. 32 (12). 1250–1255.

Pool, B. 1972. Some behavioural differences between the European polecat, *Mustela putorius*, the ferret, *M. furo*, and their hybrids. *Journal of zoology*. 166 (1). 25-35.

Price, O. E. 2002. *Animal Domestication and Behaviour*. CABI. Washington. 320 p. ISBN: 0851997724.

Purcell, K., Brown, S. A. 1999. *Essentials of Ferrets: A Guide for Practitioners*. AAHA Press. USA. 208 p. ISBN: 0941451739.

Quesenberry, K., Carpenter, J. W. 2011. Section one: Ferrets. In: Quesenberry, K., Carpenter, J. W. 2011. *Ferrets, Rabbits and Rodents: Clinical Medicine and Surgery*. Elsevier Health Sciences. USA. p. 10-202. ISBN: 1437702880.

Ralls, K., Ballou, J. D., Templeton, A. 1988. Estimates of lethal equivalents and the cost of inbreeding in mammals. *Conservation biology*. 2 (2). 185-193.

Sato, J. J., Hosoda, T., Wolsan, M., Suzuki, H. 2004. Molecular phylogeny of arctoids (Mammalia: Carnivora) with emphasis on phylogenetic and taxonomic positions of the ferretbadgers and skunks. *Zoological science*. 21 (1). 111-118.

Say, L., Pontier, D., Natoli, E. 1999. High variation in multiple paternity of domestic cats (*Felis catus L.*) in relation to environmental conditions. *Biological Sciences*. 266 (1433). 2071-2074.

Selkoe, K. A., Toonen, R. J. 2006. Microsatellites for ecologists: a practical guide to using and evaluating microsatellite markers. *Ecology letters*. 5 (5). 615-629.

Shaw, M. W. 1983. Paternity determination: 1921 to 1983 and beyond. *JAMA* [online], 250 (18), p. 2536–2537.

Schultheiss, D., Denil, J. 2002. History of the microscope and development of microsurgery: a revolution for reproductive, tract surgery. *Andrologia*. 34 (4). 234–241.

Schwartz, T. H., Bonhoeffer, T. 2001. In vivo optical mapping of epileptic foci and surround inhibition in ferret cerebral cortex. *Nature medicine*. 7 (9). 1063-1067.

Šterzl, I. 1999. Cytokiny – struktura a funkce I. *Diabetologie, metabolismus, endokrinologie, výživa*. 4 (2), 185-194.

Štráfelda, J. Biolib [online], 16.11.2002, 12.05.2009, [cit. 2016-03-20], dostupné z: <http://www.biolib.cz/cz/taxon/id1681/>

Thompson, A. D. 1951. A history of the ferret. *Journal of History of Medicine and Allied Science*. 6 (4). 471–480.

Tóth, G., Gáspari, Z., Jurka, J. 2000. Microsatellites in different eukaryotic genomes: Survey and analysis. *Genome Research*. 10. 967-981.

Wen, G. Y., Sturman, J. A., Shek, J. W. A comparative study of the tapetum, retina and skull of the ferret, dog and cat. *Laboratory Animal Science* [online]. 1985 [cit. 2016-01-09]. Dostupné z: <http://europepmc.org/abstract/med/4021435>

Wenzel, J. W. Phylogenetic analysys. In: DeSalle, R., Giribet, G., Wheeler W. (eds). 2013. *Techniques in Molecular Systematics and Evolution*, Birkhäuser. USA. p. 4-31. ISBN: 3034881258.

Williams, E. S., Anderson, S. L., Cavender, J., Lynn, C., List, K., Hearn, C., Appel, M. J. G. 1996. Vaccination of black-footed ferret (*Mustela nigripes*)× Siberian polecat (*M. eversmanni*) hybrids and domestic ferrets (*M. putorius furo*) against canine distemper. *Journal of Wildlife Diseases*. 32 (3). 417-423

Wisely, S. M., McDonald, D. B., Buskirk, S .V. 2003. Evaluation of the genetic management of the endangered black-footed ferret (*Mustela nigripes*). *Zoobiology*. 22 (3). 287–298.

Woodley, S. K., Baum, M. J. 2003. Effects of sex hormones and gender on attraction thresholds for volatile anal scent gland odors in ferrets. *Hormones and Behavior*. 44 (2). 110 – 118.

Yamaguchi, N., Sarno, R. J., Johnson, W. E., O'Brien, S. J., MacDonald, D. W. 2004. Multiple Paternity and Reproductive Tactics of Free-Ranging American Minks, *Mustela vison*. *Journal of Mammalogy*. 85 (3). 432-439.

Zajc, I., Mellersh, C., Kelly, E. P., Sampson J. A new method of paternity testing for dogs, based on microsatellite sequences. *Veterinary Record* [online]. 1994 [cit. 2016-01-26]. Dostupné z: <http://europepmc.org/abstract/med/7886887>

Zardoya, R., Villalta, M., Lopez-Perez, M. J., Garrido-Pertierra, A., Montoya, J., Bautista, J. M. 1995. Nucleotide sequence of the sheep mitochondrial DNA D-loop and its flanking tRNA genes. *Current Genetics*. 28 (1). 94–96.