

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra genetiky a šlechtění



Bakalářská práce

Populačně genetické postupy při analýze rodokmenu psů

Baránková Lucia

© 2022 ČZU v Praze

ČESKÁ ZEMĚDĚLSKÁ UNIVERZITA V PRAZE

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

Lucia Baránková

Zootechnika
Kynologie

Název práce

Populačně genetické postupy při analýze rodokmenu psů

Název anglicky

Population genetic procedures in the analysis of the pedigree of dogs

Cíle práce

Cílem práce je literární rozbor populačně genetických postupů, které jsou používány u studie populací psů. Vědecká hypotéza: U plemen psů nedochází k ztrátě genetické diverzity.

Metodika

Téma je literární rešerše o způsobech vyhodnocování populací a metod využívaných pro hodnocení genetické diverzity v populaci se zaměřením na plemena psů. Na základě dostupné vědecké literatury budou rozebrány geneticky populační postupy používané při studiu genetické diverzity u plemen psů.

Doporučený rozsah práce

40 stran

Klíčová slova

ztráta genetické diverzity, koeficient inbreedingu, pes

Doporučené zdroje informací

- Calboli, F. C., Sampson, J., Fretwell, N., Balding, D. J. 2008. Population structure and inbreeding from pedigree analysis of purebred dogs. *Genetics*. 179 (1). 593-601.
- Ceh, E., Dovc, P. 2014. Population structure and genetic differentiation of livestock guard dog breeds from the Western Balkans. *Journal of Animal Breeding and Genetics*. 131 (4). 313-325.
- Leroy, G., Rognon, X., Varlet, A., Joffrin, C., Verrier, E. 2006. Genetic variability in French dog breeds assessed by pedigree data. *Journal of Animal Breeding and Genetics*. 123 (1). 1-9.
- Leroy, G. 2011. Genetic diversity, inbreeding and breeding practices in dogs: results from pedigree analyses. *The Veterinary Journal*. 189 (2). 177-182.
- Lewis, T. W., Abhayaratne, B. M., Blott, S. C. 2015. Trends in genetic diversity for all Kennel Club registered pedigree dog breeds. *Canine Genetics and Epidemiology*. 2 (13). 1-10.

Předběžný termín obhajoby

2020/21 LS – FAPPZ

Vedoucí práce

prof. Ing. Luboš Vostrý, Ph.D.

Garantující pracoviště

Katedra genetiky a šlechtění

Elektronicky schváleno dne 24. 2. 2021

doc. Dr. Ing. Pavel Vejl

Vedoucí katedry

Elektronicky schváleno dne 25. 2. 2021

prof. Ing. Iva Langrová, CSc.

Děkanka

V Praze dne 14. 04. 2021

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou bakalářskou práci "Populačně genetické postupy při analýze rodokmenu psů" 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 použitých zdrojů na konci práce. Jako autorka uvedené bakalářské práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušil autorská práva třetích osob.

V Praze dne 07.04.2022

Pod'akovanie

Rada by som touto cestou poďakovala svojmu priateľovi, Ing. Vojtěchovi Svobodovi, za trpezlivosť a pomoc, mojej rodine a priateľom za pripomienky, celému pracovnému kolektívu klientského centra MAXIMA REALITY za poskytnutie priestoru a času k písaniu práce a v neposlednom rade svojmu vedúcemu práce, prof. Ing. Lubošovi Vostrému, Ph.D., za cenné rady, trpezlivosť a motiváciu, ktoré mi pomohli vytvoriť túto bakalársku prácu.

Populačne genetické postupy pri analýze rodokmeňov psov

Abstrakt

Táto práca je literárnou rešeršou o spôsoboch vyhodnocovania populácií a metód využívaných pre hodnotenie genetickej diverzity v populácií so zameraním na plemená psov. V úvode práce vysvetľujem prečo si myslím že je nevyhnutné sa genetickej diverzitou zaoberať a prečo je tak dôležitá. Celá prvá časť práce je venovaná definíciám a vysvetleniu základných pojmov používaných v texte práce. Uvádzam základné indexy genetickej diverzity (Hardy-Weinbergov zákon, koeficient inbreedingu, Shannon-Wienerov a Simpsonov index) v populácií a metódy výpočtu týchto indexov. Rovnako sa venujem aj faktorom priamo určujúcim genetickej diverzitu, ako sú mutačný tlak, selekčný tlak, migrácia, genetický drift, bottleneck efekt a inbreeding. Druhá časť práce obsahuje metódy skúmania genetickej diverzity a je rozdelená na analýzy genetickej diverzity za pomoci rodokmeňov a na analýzy vychádzajúce zo skúmania údajov genotype polymorfných mikrosatelitných markerov. Z výsledkov rôznych vedeckých štúdií a analýz využívajúcich dostupné metódy hodnotenia genetickej diverzity subjektívne hodnotím klady a zápory daných metód. Rovnako rozoberám príčiny straty genetickej diverzity a na základe príkladných štúdií vyhodnocujem správnosť zaužívaných postupov v plemenitbe psov.

Kľúčová slova: strata genetickej diverzity, koeficient inbreedingu, pes, príbuzenské párenie

Population genetic procedures in the analysis of the pedigree of dogs

Abstract

This work is a literature search on ways to evaluate populations and methods used to assess genetic diversity in populations with a focus on dog breeds. At the beginning of the thesis I explain why I think it is necessary to deal with genetic diversity and why it is so important. The whole first part of the work is devoted to definitions and explanations of basic terms used in the text of the work. I present the basic indices of genetic diversity (Hardy-Weinberg's law, inbreeding coefficient, Shannon-Wiener and Simpson index) in the population and methods of calculating these indices. I also deal with factors that directly determine genetic diversity, such as mutation pressure, selection pressure, migration, genetic drift, bottleneck effect and inbreeding. The second part of the work contains methods of researching genetic diversity and is divided into analyzes of genetic diversity using pedigrees and analyzes based on the study of genotype data of polymorphic microsatellite markers. From the results of various scientific studies and analyzes using available methods for assessing genetic diversity, I subjectively evaluate the pros and cons of these methods. I also analyze the causes of loss of genetic diversity and, based on exemplary studies, evaluate the correctness of the usual procedures in dog breeding.

Keywords: loss of genetic diversity, inbreeding coefficient, dog, kinship mating

Obsah

1 Úvod.....	9
2 Genetická diverzita	11
2.1 Definícia a význam genetickej diverzity v populácii	11
2.2 Indexy genetickej diverzity v populácií	12
2.2.1 Hardy – Weinbergov zákon	12
2.2.2 Koeficient inbreedingu	12
2.2.3 Shannon – Wienerov index	12
2.2.4 Simpsonov index.....	13
2.3 Faktory priamo určujúce genetickú diverzitu	14
2.3.1 Mutačný tlak	14
2.3.2 Selekcčný tlak.....	14
2.3.3 Migrácia	14
2.3.4 Genetický drift	14
2.3.5 Bottleneck effect	15
2.3.6 Inbreeding	15
3 Metódy skúmania genetickej diverzity.....	17
3.1 Analýza rodokmeňov	17
3.1.1 Analýza rodokmeňov pôvodných švédskych plemien psov	17
3.1.2 Analýza populácie plemena psov border kólie v Maďarsku za pomoci rodokmeňov	21
3.1.3 Rodokmeňová analýza populácie plemena hovawart v Poľsku	23
3.1.4 Analýza rodokmeňov plemena český strakatý pes	25
3.2 Analýza za pomoci údajov o genotype polymorfných mikrosatelitných markerov	29
3.2.1 Využitie analýz dát genotypu na záchranu ohrozených populácií psov ...	29
3.2.2 PCR amplifikácia pomocou metódy ISSR.....	30
3.2.3 Posúdenie genetickej diverzity plemena a odhad užitočnosti markerov na testovanie rodičovstva a individuálnu identifikáciu plemena Kangal sheperd dog	31
3.2.4 Analýza úrovne príbuzenskej plemenitby plemena nemeckého krátkosrstého stavača z genomického a genealogického hľadiska	33
3.2.5 Analýza genetickej rozmanitosti a genomovej štruktúry pôvodných čínskych plemien psov.....	35
4 Záver.....	38
5 Zoznam použitých zdrojov	40
6 Zoznam tabuliek.....	43
7 Zoznam grafov.....	44

1 Úvod

Rôznorodosť živých organizmov je geneticky podmienená a je prirodzenou vlastnosťou vznikajúcou v dôsledku mutácií. Geneticky variabilnejšie populácie lepšie prežívajú, vyvíjajú sa a prispôsobujú sa meniacim sa podmienkam prostredia.

Genetická diverzita je chápaná ako geneticky fixovaná rozmanitosť medzi živými organizmami, či ako génová variabilita populácie či druhu. Jedná sa o jeden z najdôležitejších faktorov zachovania ekologickej stability. Zníženie genetickej diverzity nemusí byť nápadné, môže však byť do budúcnosti z hľadiska zachovania druhu kľúčové. Pokiaľ totiž v systéme s nízkou genetickou variabilitou dôjde ku kríze (nastanú nepriaznivé podmienky), môže skolabovať celý systém z dôvodu straty schopnosti adaptívnej odpovedi, čo môže viesť až k vymieraniu druhov. Strata genetickej diverzity sa v súčasnosti považuje za jeden z najväčších ekologických problémov, pretože genetická diverzita je nenahraditeľná a jej strata je nezvratná. Zaručuje evolučný potenciál a preto je nutnou podmienkou života.

Psy rôznych plemien sa používajú na ľudskú terapiu, športové aktivity, stádo, poľovníctvo, lekárske výskum, identifikáciu biologického materiálu, spoločnosť, ako aj pri policajných, colných, vojenských, záchranných a bezpečnostných prácach. Súčasný výskum zároveň naznačuje, že v rámci plemena sa genetická rozmanitosť rýchlo vyčerpáva, čo môže brániť dlhodobému udržiavaniu samostatných plemien. To sa v neposlednom rade týka starých, tradičných plemien, ktoré predstavujú biologické a kultúrne dedičstvo.

Jedna z hlavných príčin straty genetickej diverzity u rôznych plemien psov je zavedenie selektívneho šľachtenia zameraného na odstránenie dedičných porúch u týchto plemien. Zvieratá s diagnostikovanou chybou sa však v mnohých prípadoch môžu stále používať pri chove. Napríklad psy s diagnostikovanou dyspláziou bedrového kĺbu môžu byť použité v chove, aj keď kluby chovateľov často odporúčajú, aby tomu tak nebolo. Jedným z dôvodov umožnenia použitia prenášačov v chove je to, že ak by sa tieto zvieratá vybrali, mohlo by to viesť k strate genetických variácií. Napriek tomu sa často stretávame so striktným vyradovaním týchto psov, čo môže viesť k zníženiu genetickej diverzity v rámci plemena. Tento problém sa týka hlavne málopočetných populácií. Pre plemená obľúbené a často chované by odstránenie ako chorých jedincov, tak prenášačov, nepredstavuje vážny problém.

Pozitívna selekcia zameraná na požadovanú fenotypovú vlastnosť je ďalšia častá príčina prísneho výberu. Výber psov je založený na štandardoch plemena, ktoré zvyčajne určujú ciele selekcie morfológických znakov a predispozíciu správania každého plemena. Keď sa vrátíme do histórie ľudstva, domestikácia psov určila genetickú odchýlku od divých vlkov a následne smerový výber konkrétnych charakteristík viedol k rôznym plemenám psov, ktorých bolo okolo 500. Vlastnosti jednotlivých plemien sú určené génovým zložením plemien, ktoré mohlo byť ovplyvnené špecifickými výberovými postupmi. V takomto prípade môže znížený počet predkov, spolu s veľkým využívaním populárnych plemenníkov (napr. najlepšie hodnotený pes roka), viesť k zvýšeniu homozygotnosti populácie. Vytvorenie chovateľských klubov v polovici 19. storočia, ktoré definovalo štandardy

plemien, nejako formalizovalo reprodukčnú izoláciu v rámci viacerých psích morfológií, ktoré v tom čase existovali. Vytvorila sa „bariéra pre plemeno“, ktorá definuje, že každé šteňa nemôže byť v internej knižke, pokiaľ nie sú rodičia zaregistrovaní v tej istej. Činnosť plemenných kníh klubov pri ochrane plemien je založená na prísnej rodokmeňovej kontrole a hodnotení blízkosti k štandardom plemien. Tento proces môže viesť k rýchlemu zníženiu genetickej variability u plemien, pokiaľ sa neuplatnia osobitné reprodukčné plány na kontrolu inbreedingu.

Je bežnou praxou, že si chovatelia psov vyberajú plemenníkov a matky so spoločným predkom, aby si upevnili niektoré špecifické črty vzhľadu alebo pracovných schopností. Tento takzvaný líniový chov sa snaží vyhnúť sa úzko príbuzenskému páreniu; chovateľské združenie to však niekedy umožňuje. Riešením problému príbuzenského párenia s cieľom zachovania štandardu plemena by mohol byť dovoz chovných psov. Na druhej strane sú šľachtiteľské normy medzi krajinami mierne odlišné, a preto je potrebná spolupráca medzi šľachtiteľskými organizáciami a vedcami s cieľom zlepšiť zdravie nasledujúcej generácie.

Viacere štúdie uvádzajú nižšiu genetickú diverzitu plemien používaných na výstavy, kde sa chovatelia zameriavajú predovšetkým na exteriér psa, ako u pracovných plemien psov. Zdá sa, že tieto posledné menované si udržujú lepšie genetické zdravie vďaka prítomnosti mnohých genetických znakov, stále podobných tým, ktoré majú ich divokí predkovia. Charakterizácia genetiky psa, štúdium úrovni inbreedingu a všeobecne pozornosť ku genetickému zdraviu psa by sa mala považovať za základ efektívnych plánov selekcie založených na objektívnych vedeckých informáciách.

2 Genetická diverzita

Schopnosť adaptácie populácie určitého druhu k environmentálnym vplyvom je umožnená akumuláciou genetickej variability. Strata genetickej diverzity sa považuje za najväčší problém zo súčasných najzávažnejších ekologických problémov, pretože je nenahraditeľná (Ehrlich & Ehrlich 1983).

2.1 Definícia a význam genetickej diverzity v populácii

Každý existujúci druh je adaptovaný na určité podmienky prostredia v ktorom sa nachádza aby dokázal prežiť v konkurencii s inými druhmi. Druh sa skladá z niekoľko oddelených populácií. Tieto populácie žijú v rôznych lokalitách, ktoré sú súčasťou areálu rozšírenia daného druhu. Každá populácia sa tak môže vyskytovať na inom mieste a byť adaptovaná na svoje prostredie (Chloupek 2008).

Rozdiely medzi druhmi, medzi populáciami, ale aj vnútri populácií – to sú úrovne na ktorých je možné sledovať a posudzovať genetickú diverzitu (Albrecht et al. 2005). Nízka genetická diverzita znižuje prežívanie a fitness, pretože poskytuje len obmedzené množstvo genetického materiálu k selekcií, čím znižuje možnosť prispôbiť sa zmenám prostredia. V prípade krízy, napr. napadnutie patogénom, v uniformnom systéme systém väčšinou skolabuje celý. Naopak v rôznorodom systéme prechádzajú krízou len niektoré jeho časti a ako celok ostáva stále funkčný. Úloha genetickej variability je zásadná. Jej stratou sa môže značne znižovať schopnosť prispôbiť sa novým ekologickým podmienkam a v malých populáciách má strata genetickej variability, spôsobená napríklad príbuzenskou plemenitbou, nepriaznivé dôsledky, ktoré sa prejavujú inbreednou depresiou. Inbreedná depresia označuje pokles zdravia v dôsledku inbreedingu spojeného s prejavom množstva škodlivých alel v homozygotnom stave a z dlhodobého hľadiska vedie k strate schopnosti adaptovať sa podmienkam meniaceho sa prostredia. Tým sa zvyšuje pravdepodobnosť vymierania druhov (Frankham et al. 2002).

Genetická diverzita je v prírode usporiadaná hierarchicky. Jednotlivé populácie, druhy, či vyššie taxóny sa od seba geneticky rôznou mierou líšia a tieto odlišnosti sú efektívne využívané pri výskume voľne žijúcich organizmov. Medzidruhové genetické odlišnosti sú zahrnuté v koncepte druhovej diverzity. O úroveň nižšie stoja medzipopulačné vnútrodrohové rozdiely, inak populačná štruktúra v rámci druhu. Poznanie fylogenetických vzťahov medzi populáciami druhu umožňuje rekonštruovať centrá a cesty šírenia druhu – fylogeografia, a sledovať tak historické zmeny rozšírenia, ktoré prebiehali na pozadí posunov areálu a demografických zmien. To umožňuje pochopiť dnešný charakter genetickej variability a diferenciáciu populácií druhov a iných fylogenetických línií. Na ešte nižšej úrovni stojí genetická diverzita v rámci populácie (Bryja et al. 2010).

Genetická diverzita môže byť posudzovaná rôznymi spôsobmi: na úrovni genových rezerv, na úrovni populácií, individuí, genomu, lokusu alebo na úrovni sekvencie báz DNA (Kresovich & Mcferson 1992). Väčšinou sa definuje frekvenciou génov, ale určuje sa z frekvencie genotypov a závisí na spôsobe rozmnožovania populácie (Weir 1990).

2.2 Indexy genetickej diverzity v populácií

Definícia populácie je skupina jedincov toho istého druhu so spoločným genofondom, ktorá obýva určitú oblasť v určitom časovom období. Jedinci sa medzi sebou môžu voľne krížiť a pochádzajú z rovnakého predka. Podľa spôsobu rozmnožovania sa jedincov populácie, môžeme populácie rozdeliť na:

Autogamickú populáciu tvorenú jedincami, ktorí sa rozmnožujú autogamiou (samooplodením). Každý jedinec (hermafrodit) produkuje samčie aj samičie gamety. Tento druh populácie môžeme nájsť u rastlín - samoopelenie.

A na alogamickú populáciu, ktorá je tvorená organizmami, u ktorých nový jedinec (potomok) vzniká splynutím dvoch gamet (pohlavné bunky) od dvoch rôznych jedincov toho istého druhu. Všetky nižšie uvedené indexy sa vzťahujú na alogamickú populáciu.

2.2.1 Hardy – Weinbergov zákon

Ak dominantnú alelu označíme ako p a recesívnu alelu ako q , získame vzťah pre populáciu $p + q = 1$ (100 %).

- pravdepodobnosť vzniku dominantného homozygota vyjadríme ako $p \times p = p^2$
- pravdepodobnosť vzniku recesívneho homozygota ako $q \times q = q^2$
- pravdepodobnosť vzniku heterozygota je $(p \times q) + (q \times p) = 2pq$
- celkové genotypové zloženie populácie je teda $p^2 + 2pq + q^2 = 1$

Ďalším využitím Hardy-Weinbergovho zákona môže byť zistenie miery inbreedingu. Ak populácia stráca genetickú diverzitu dôsledkom genetického driftu stáva sa súčasne inbreednou. Tato strata heterozygotnosti môže byť vyjadrená pomocou koeficientu inbreedingu F (Reed & Frankham 2003).

2.2.2 Koeficient inbreedingu

Koeficient inbreedingu je definovaný ako pravdepodobnosť s akou jedinec zdedil obe alely toho istého lokusu či génu od rovnakého predka (Falconer 1960). Je možné ho vypočítať pomocou pozorovanej heterozygotnosti H_{obs} a očakávanej heterozygotnosti H_{exp} podľa vzorca:

$$F = (H_{exp} - H_{obs}) / H_{exp}$$

Pozorovaná heterozygotnosť, H_{obs} , je podiel počtu heterozygotov v určitom lokuse z celkového počtu jedincov. To znamená podiel jedincov, ktorý sú pre daný lokus heterozygotní (Falconer 1960).

2.2.3 Shannon – Wienerov index

Shannon-Wienerov index sa snaží zohľadniť aj ďalšie atribúty diverzity ako napr. vyváženosť - abundancia (početnosť jedincov) jednotlivých druhov. Je indexom vychádzajúcim z informačnej teórie a matematický vzťah pre jeho výpočet je:

$$H = -\sum_{i=1}^S p_i \ln p_i \quad p_i = \frac{n_i}{N}$$

kde S je celkový počet druhov,
 ni je počet jedincov
 i-teho druhu
 a N celkový počet jedincov (Šípek 2004).

Predpokladom tohto indexu je náhodný výber jedincov z teoreticky neobmedzeného množstva a prítomnosť všetkých druhov spoločenstva vo vzorke. Zvyčajne nadobúda hodnoty od 1,5 až 4,5. Shannon-Wienerov index (rovnako ako ostatné indexy tohto typu) je možné vyjadriť aj ako vyrovnanosť spoločenstva. Tu je hodnota indexu vzťahovaná na maximálnu možnú vyrovnanosť spoločenstva a vyjadrená ako časť z tejto maximálnej vyrovnanosti o možnom rozsahu od nula do jednej. Maximálna hodnota Shannon-Wienerovho indexu pre dané spoločenstvo zodpovedá logaritmu počtu druhov a ukazuje, aké hodnoty by index nadobudol pri zhodnej početnosti všetkých druhov spoločenstva. Hodnota tohto indexu pri maximálne vyrovnanom spoločenstve je teda daná vzťahom:

$$H_{max} = -\ln S$$

Hodnota Shannon-Wienerovej vyrovnanosti vypovedá o pomernej hodnote diverzity "vyčerpanej" daným spoločenstvom vzhľadom k spoločenstvu so zhodnou početnosťou druhov:

$$E = \frac{H}{H_{max}} = \frac{H}{\ln S} \quad (\text{Šípek 2004}).$$

2.2.4 Simpsonov index

Ďalším veľmi často používaným indexom diverzity je Simpsonov index. Tento index je silne závislý na najpočetnejšom druhu a menej citlivý k vzácnym druhom. Môže nadobúdať hodnoty od nuly do jednej. Hodnota indexu silne záporne koreluje s vyrovnanosťou odvodenou pomocou Shannon-Wienerovho indexu. S jeho zvyšujúcou sa hladinou stúpa dominancia a klesá vyrovnanosť spoločenstva, preto sa často používa jeho prevrátená hodnota alebo odpočet od jednej. Výpočet základnej verzie nadobúdajúci najvyšších hodnôt pri vysokej dominancii a najnižších pri vyrovnanom spoločenstve je daný vzťahom:

$$D = \sum_{i=1}^S \frac{n_i(n_i - 1)}{N(N - 1)}$$

kde S je počet druhov,
 ni počet jedincov
 i-teho taxónu
 a N celkový počet jedincov (Šípek 2004).

2.3 Faktory priamo určujúce genetickú diverzitu

Existujú faktory, ktoré genetickú diverzitu určujú priamo a faktory, ktoré ju ovplyvňujú nepriamo prostredníctvom priamych faktorov. V nasledujúcich kapitolách budú predstavené tieto faktory vrátane ich dôsledkov na genetickú diverzitu.

2.3.1 Mutačný tlak

Mutáciami génov môže dochádzať k vzniku nových alel, alebo k zmenám existujúcich alel, čo môže byť pre nositeľa génu výhodné, neutrálne alebo nevýhodné. Zvyšuje genetickú diverzitu a vytvára nové varianty. Jej vplyv sa výraznejšie prejavuje v malých populáciách (Falconer 1960).

2.3.2 Selečný tlak

Pokiaľ alela svojho nositeľa zvyhodňuje oproti jedincom bez tejto alely, bude frekvencia tejto alely v nasledujúcich generáciách postupne stúpať. Nevýhodné alely postupne ubúdajú (dominantná alela mizne pomerne rýchlo, recesívna mizne pomaly a úplne nevymizne nikdy), pretože svojich nositeľov znevýhodňujú (tzv. negatívna selekcia). Zvýhodnenie či znevýhodnenie určitého genotypu voči ostatným genotypom charakterizuje veličina fitness - w . Hodnota fitness vypovedá o tom, akou mierou prispievajú jedinci s týmto genotypom do genofondu populácie. Hodnoty fitness sa pohybujú v rozmedzí od 0 do 1, pričom hodnotu $w = 1$ nachádzame u "najplodnejšieho" genotypu. Mieru selekcie proti určitému genotypu charakterizuje koeficient selekcie - s . Platí vzťah $s = 1 - w$, kde w je fitness príslušného genotypu, pre ktorý koeficient selekcie stanovujeme. Hodnota $s = 1$ je typická pro genotypy, ktoré sú letálne (Falconer 1960).

2.3.3 Migrácia

Migrácia môže znamenať obohatenie genofondu o nové alely, ale aj jeho ochudobnenie. Organizmy žijú často na špecifickom mieste, kde môžu tvoriť viacej alebo menej izolované subpopulácie. V takýchto prípadoch je migrácia nevyhnutná pre genetický tok, pričom rozšírenie alel závisí na ich adaptívnej hodnote (vplyv selekcie), pretože podmienky nového prostredia sa môžu líšiť od podmienok pôvodných. Pri migrácií sa môžeme stretnúť s tzv. efektom zakladateľa, kedy migrujúci jedinec predal do ďalších generácií vzácnu alelu, ktorá sa následne rozšírila natoľko (genetickým driftom), že jej frekvencia v danej populácii je omnoho vyššia ako v iných populáciách (Falconer 1960).

2.3.4 Genetický drift

Genetický drift sú náhodné posuny vo frekvenciách jednotlivých alel v rámci genofondu danej populácie. V praxi to znamená, že tieto zmeny frekvencií nepodliehajú selekcií, ale závisia vyložene na náhode pri vzniku gamet a zygot (nositeľ výhodnej alely nemusí túto alelu svojim potomkom predať a tá sa v ďalších generáciách neobjaví). Tieto zmeny sú kumulatívne a časom tak môže dôjsť k fixácii jednej alely a vymiznutiu alely druhej.

Genetický drift sa uplatňuje v relatívne malých populáciách - čím je populácie menšia - tým výraznejší je vplyv driftu a tým častejšie dôjde k fixácii jednej z alel (Frankham et al. 2002).

2.3.5 Bottleneck effect

Efekt hrdla fľaše je prudký pokles počtu jedincov v populácii sprevádzaný znížením genetickej diverzity. Jeho účinky sú nenávratné – stratené alely sa ani po obnovení populácie do pôvodnej veľkosti znovu neobjavia, takže genetická diverzita ostáva znížená. Tento efekt navyše posilňuje účinky genetického driftu (Frankham et al. 2002).

2.3.6 Inbreeding

Inbreeding je párením príbuzných jedincov, pri ktorom sa všeobecne mení frekvencia genotypov v populáciách a môže mať za následok pokles priemerného fenotypu a zdatnosti - fenomén známy ako inbreedna depresia, ktorý sa prejavuje predovšetkým z hľadiska problému so zdatnosťou zvierat a môže tiež viesť k zníženiu selekčnej reakcie na ekonomické znaky (Francesca et al. 2015). Účinky príbuzenského párenia sa študovali hlavne u divých populácií zvierat a pre rôzne znaky a populácie je dobre zdokumentovaný u mnohých druhov alebo populácií.

V dôsledku selekčného tlaku, manažmentu v uzavretých populáciách a historických úzkych miest zaznamenali mnohé plemená psov značné príbuzenské kríženie a vykazujú porovnateľnú stratu diverzity v porovnaní s inými domácimi druhmi. Tento vývoj súvisí s chovateľskými postupmi, ako je nadmerné používanie populárnych samcov alebo párenie medzi príbuznými zvieratami. (Leroy 2011).

Trend u všetkých plemien bol taký, že miera príbuzenskej plemenitby bola najvyššia v 80. a 90. rokoch 20. storočia, po roku 2000 mala tendenciu klesať. Tento trend bol výraznejší u vzácnejších plemien. Miera príbuzenskej plemenitby za celé obdobie rokov 1980 – 2014 nekorelovala s veľkosťou populácie. Existencia obľúbených plemenníkov bola zjavná u všetkých skúmaných plemien (Lewis et al. 2015)

Rôzne plemená psov, ako aj rôzne vlastnosti sa líšia v reakcii na príbuzenskú plemenitbu: niektoré plemená môžu vykazovať veľmi výrazný účinok zvýšeného príbuzenského párenia pre danú vlastnosť, zatiaľ čo iné plemená nemusia mať veľký účinok. Niekoľko štúdií ukázalo heterogenitu depresie inbreedingu s neutrálnymi alebo negatívnymi alebo pozitívnymi účinkami na rôzne vlastnosti, čiže v danej populácii sú zmiešané „zlé“ a „dobré“ účinky inbreedingu. Miera inbreednej depresie v populácii ďalej závisí od rozsahu príbuzenského párenia, pôvodnej frekvencie škodlivých recesív, prostredia a depresie pri párení s príbuznými (Francesca et al. 2015).

Pre príklad uvediem štúdiu morfológických znakov plemena Bracco Italiano a účinky príbuzenstva na tieto znaky. Znaky sa zisťovali od 155 dospelých (priemerný vek $4,18 \pm 2,60$ rokov) psov (79 samcov a 76 samíc) patriacich do 57 rôznych chovateľských staníc. Priemerný koeficient príbuzenskej plemenitby bol 6,7% a priemerný prírastok príbuzenskej plemenitby bol 1,29% ($N_e = 38,86$). Vypočítal sa variačný koeficient (CV%) každého znaku. Na odhad depresie inbreedingu bola do modelu pridaná lineárna regresia každého znaku na

koeficiente inbreedingu. Variačný koeficient všetkých znakov sa pohyboval od 4,27% do 26,15% (Francesca et al. 2015).

Namerané hodnoty sa zhodovali s normami uvádzanými v štandarde plemena, s výnimkou dĺžky zadku, ktorá bola skôr $\frac{1}{4}$ výšky kohútika než $\frac{1}{3}$ požadovaná v štandard. Aj keď pozitívna fenotypová korelácia pozorovaná medzi týmito dvoma parametrami nebola významná, mohlo by to sťažiť dosiahnutie cieľov (Francesca et al. 2015). Bolo by potrebné študovať dedivosť a genetické korelácie medzi znakmi, aby sa zistilo, či je možné vykonať selektívne účinky na tieto znaky.

Výsledky tejto štúdie ukazujú, že príbuzné párenie nemá významný vplyv na konformačné vlastnosti. Inbreedna depresia sa však počítala na vzorke, ktorá mala ako maximálnu hodnotu $F = 0,20$. Navyše, väčšina zvierat mala koeficient inbreedingu menší ako 0,05. Účinky, ktoré môžu mať hodnoty F vyššie ako 20% na tieto vlastnosti preto nepoznáme. Niektorí autori v skutočnosti uviedli, že u iných druhov a iných znakov majú najsilnejšie účinky zvieratá s hodnotami $F \geq 0,25$ (Francesca et al. 2015).

Túto rozdielnú toleranciu pre príbuzenskú plemenitbu možno čiastočne určiť históriou príbuzenskej plemenitby. Keď príbuzenská plemenitba odhalí genetickú záťaž, môže sa zvýšiť schopnosť prírodného výberu očistiť inbreedne populácie od škodlivých alel. Populácie, ktoré sa normálne do istej miery krížia, teda môžu byť od tej doby menej náchylné na inbreednu depresiu. Z dôvodu ťažkostí s predvídaním toho, ako vážne bude populácia ovplyvnená inbreednou depresiou (ak vôbec), vyhýbanie sa príbuzenskej plemenitbe je primárnym cieľom. Mnoho populácií je však tak malých, že príbuzenská plemenitba je nevyhnutná. Niektorí vedci dokonca navrhujú očistenie genetickej záťaže, ako jednoduchšiu alternatívu v porovnaní s vyhýbaním sa príbuzenskej plemenitbe (Day et al. 2003).

Pravdepodobnosť úspešného očistenia genetickej záťaže závisí od genetického zloženia populácie a imigrácie. Pomalšia miera príbuzenskej plemenitby (napríklad prostredníctvom väčšej populácie) by mala mať za následok vyššiu kondíciu, pretože selekcia bude mať viac príležitostí pôsobiť na škodlivé alely. Táto relatívna nevýhoda menšej veľkosti populácie nastáva, keď alela so selekčným koeficientom pod prahovou hodnotou $1/2 N_e$ (kde N_e je efektívna veľkosť populácie) sa stane skutočne neutrálna. Prirodzené populácie môžu zaznamenať kolísanie veľkosti (t.j. úzke miesta) v dôsledku katastrof, chorôb alebo geografickej izolácie. Čistenie škodlivých alel môže krátkodobo optimalizovať zdatnosť, ale stále môže ohroziť dlhodobé pretrvávanie prostredníctvom zníženého evolučného potenciálu. Dôležité je, že alely škodlivé v jednom prostredí môžu byť neutrálné alebo prospešné v inom prostredí. V dôsledku toho môže byť maximálna genetická variácia stále kritická pre perzistenciu malých populácií vystavených environmentálnym novotám. V scenároch kde je nevyhnutná krížová plemenitba, pomalšia alebo premenlivejšia miera príbuzenskej plemenitby môže predĺžiť adaptabilitu na nové prostredie jednoduchým maximalizovaním celkovej genetickej variácie (Day et al. 2003).

3 Metódy skúmania genetickej diverzity

Existuje niekoľko rôznych metód skúmania genetickej diverzity. Asi najznámejšou a zároveň najpoužívanejšou je analýza rodokmeňov, ktorá sa opiera o dáta získané z registračných databáz plemien psov. Vyberie sa plemeno, ktoré bude predmetom štúdie a na základe dostupných záznamov sa hodnotí miera príbuzenského párenia a straty genetických variácií vo vzťahu k zakladateľom populácie v sledovanom období.

V celku novou metódou je skúmanie o genotypu polymorfných mikrosatelitných markerov. Na základe týchto údajov je možné charakterizovať série homozygotnosti, ktoré umožňujú kvantifikáciu rozsahu inbreedingu jedincov, najmä v prípade neúplných, nespoľahlivých alebo chýbajúcich rodokmeňových informácií.

3.1 Analýza rodokmeňov

Identifikácia odlišných fyzikálnych vlastností psov je nekomplikovaný a priamy spôsob kategorizácie plemien psov. Mnoho majiteľov psov a veterinárnych lekárov sa však stále snaží rozlíšiť medzi čistým plemenom a zmiešanými variáciami u určitých plemien psov. V súčasnosti je absencia nástrojov a metód potrebných na potvrdenie psa čistého plemena významným problémom, pretože jedinou ľahko dostupnou metódou na overenie plemien čistého alebo kríženého plemena je oficiálny rodokmeňový systém (Kriangwanich et al. 2020). Táto metóda má však viacero nedostatkov, pretože sa opiera o uvedené záznamy, ktorých pravdivosť, ani úplnosť nie je vždy dostatočujúca a nedá sa spätne overiť ani doplniť. Napriek tomu je často používaná práve vďaka jej ľahkej dostupnosti a finančnej nenáročnosti. Výber plemien pre takéto štúdie by mal byť založený na znalosti faktorov, ako je príbuzenská plemenitba, genetická diverzita a štruktúra populácie, ktoré pravdepodobne závisia od selektívnych vzorcov šľachtenia špecifických pre plemeno. Aby sa vyriešil nedostatok takýchto štúdií, využíva sa jeden z najrozsiahlejších zdrojov na svete pre štúdie populačnej genetiky psov: registračnú databázu Kennel Club Spojeného kráľovstva (UK). Vyberie sa napríklad 10 reprezentatívnych plemien a analyzujú sa ich rodokmene od vzniku elektronických záznamov okolo roku 1970, čo zodpovedá približne ôsmim generáciám pred súčasnosťou. Takmer v každom zvolenom plemene sa nájdu extrémne inbreedne jedince a efektívnu veľkosť populácie inbreedného kríženia medzi 40 a 80 pre veľké množstvo psov z vybranej vzorky. U všetkých plemien okrem 3 sa viac ako 90 % jedinečných genetických variantov stratí počas šiestich generácií, čo naznačuje dramatický vplyv vzorcov šľachtenia na genetickú diverzitu (Calboli et al. 2008).

3.1.1 Analýza rodokmeňov pôvodných švédskych plemien psov

Použili sa záznamy o chove na vyhodnotenie potenciálnych náznakov príbuzenského párenia a straty zakladateľskej alelickej diverzity u 12 pôvodných švédskych plemien psov, tradičných pre túto krajinu, z ktorých desať úrady označili za chránené. Rodokmene sa datujú do polovice roku 1900 a pozostávajú z 5–11 generácií a 350–66 500 jedincov na jeden rodokmeň. Hodnotila sa príbuzenská plemenitba a potenciálne náznaky straty genetických variácií meraním koeficientov príbuzenskej plemenitby a zostávajúceho počtu zakladateľských alel v piatich časových bodoch počas rokov 1980–2012. Údaje boli získané

zo Švédskeho kynologického klubu (SKC; www.skk.se; chovateľský klub). Databáza obsahuje rodokmene takmer všetkých plemien psov chovaných vo Švédsku a približne 90 percent pôvodných psov vo Švédsku je zahrnutých v týchto záznamoch. Analyzovali sa úrovne inbreedingu a straty variácie alely zakladateľa v piatich časových bodoch vrátane psov živých 31. decembra v rokoch 1980, 1990, 2000, 2006, 2012 (Jansson & Laikre 2018).

Rodokmeňová analýza sa použila na hodnotenie príbuzenského párenia a straty genetických variácií vo vzťahu k zakladateľom populácie v sledovanom období. Zakladateľ je jednotlivец, ktorý nie je príbuzný so všetkými ostatnými jedincami v rodokmeni, okrem jeho potomkov; v ľubovoľnom náhodnom mieste nesie dve hypotetické, jedinečné zakladateľské alely. Koeficient inbreedingu (F) a príbuzenstva (MK) kvantifikujú pravdepodobnosti identity zostupom (IBD) takýchto alel v rámci jedinca i medzi jednotlivcami. Genetická variácia sa meria ako počet zostávajúcich zakladateľských alel a počet ekvivalentov zakladateľského genómu (f_{ge}). F_{ge} je počet rovnako prispievajúcich zakladateľov, od ktorých nedošlo k náhodnej strate alel, ktoré predstavujú rovnaké množstvo variácií, aké sa zachováva v žijúcej populácii. Mal by sa porovnávať so skutočným počtom zakladateľov; rozdiel je výsledkom straty zakladateľských alel a nerovnomerného genetického prínosu samostatných zakladateľov pre v súčasnosti žijúcich. Mieru inbreedingu, z hľadiska efektívnej veľkosti populácie (N_e), možno definovať dvoma spôsobmi:

1) ako priemerná efektívna veľkosť populácie za generáciu v priebehu časového rozpätia analýzy a

2) ako „súčasná efektívna veľkosť populácie“ žijúcich populácia založená na počte žijúcich samcov a samíc, ktoré plodili potomkov (Jansson & Laikre 2018).

Predpokladalo sa, že všetky psy všetkých plemien žijú 12 rokov a potom zomierajú. Je zrejmé, že to nie je presné a je potrebné zvážiť, či a ako tento predpoklad ovplyvňuje všeobecnosť výsledkov. Samotné rodokmene samozrejme nebudú ovplyvnené predpokladmi dlhovekosti, ale hodnotenie príbuzenského párenia a straty alel zakladateľov v konkrétnych časových bodoch by mohlo byť. Podobne by mohla byť ovplyvnená aj generačná dĺžka a počet zakladateľov živých zvierat v rôznych časových bodoch, a teda kvantifikácia priemerného N_e po celé generácie. Vykonali sa teda ďalšie analýzy, kde bol predpoklad týkajúci sa životnosti stanovený na 6 rokov a výsledky sú veľmi podobné ako pri predpoklade životnosti 12 rokov (Jansson & Laikre 2018).

Tabuľka 3 - tabuľka nameraných hodnôt pre predpokladaný vek 6 rokov (Jansson & Laikre 2018).

	Lifespan (years)	Year				
		1980	1990	2000	2006	2012
Number of breeds	6	12	12	12	12	12
possible to analyze	12	12	10	11	10	11
Average inbreeding coefficient (<i>F</i>)	6	0.036	0.050	0.065	0.068	0.067
Mean kinship (<i>MK</i>)	12	0.033	0.045	0.060	0.065	0.066
	6	0.066	0.059	0.076	0.080	0.083
	12	0.063	0.055	0.068	0.076	0.080
Proportion of founder alleles remaining ¹	6	0.544	0.450	0.314	0.273	0.245
	12	0.661	0.565	0.424	0.350	0.291
<i>fge</i> /founder ²	6	0.237	0.157	0.115	0.095	0.089
	12	0.237	0.178	0.123	0.114	0.094
<i>N_e</i> ³	6	45.2	48.5	52.3	55.9	61.2
	12	46.7	44.1	51.0	52.7	59.1
Number of generations (<i>G</i>)	6	3.5	5.1	6.9	7.9	8.9
	12	3.3	4.3	6.1	7.0	8.2
Current <i>N_e</i> ⁴	6	201.0	164.8	111.2	104.4	99.6
	12	799.5	330.3	368.9	223.0	282.4
Current <i>N_e</i> / <i>N</i> ⁵	6	0.073	0.071	0.052	0.052	0.052
	12	0.180	0.129	0.113	0.114	0.116

¹The proportion of the initial number of founder alleles (defined as twice the number of founders) that is retained in one or more copies among living dogs.

²The number of founder genome equivalents divided by the number of founders that are genetically represented in living animals.

³Average genetically effective size over generations.

⁴ $N_e = 4N_mN_f / (N_m + N_f)$, where N_m = number of live males that have reproduced and N_f = number of living females that have reproduced.

⁵Current N_e divided by the current census size (N) i.e., the number of living animals when assuming a maximum life span of either 6 or 12 years.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0202849.t003>

Napriek nedostatkom použitej metódy z obrázkov 1 a 2 môžeme vidieť nasledujúce výsledky:

- Koeficient inbreedingu sa zvyšuje
- Vzniká veľká strata zakladateľských alel
- Zakladateľská alelická variácia génových zásob z roku 2012 bola ekvivalentná iba 3–20 zakladajúcim zvieratám
- Efektívna veľkosť populácie je pre väčšinu plemien len mierne nad kritickou úrovňou
- Miera príbuzenského párenia a straty variácií je zbytočne rozsiahla vzhľadom na veľkosti sčítania týchto plemien (Jansson & Laikre 2018).

Tieto výsledky vyvolávajú obavy, pretože znížená genetická diverzita, strata zakladateľských alel a zvýšený koeficient inbreedingu ukazujú na nesprávne postupy v chove, ktorým treba venovať zvýšenú pozornosť. Tento postupný úpadok spôsobujú chybné kritéria výberu chovných párov zvierat. Jedným z dôvodov môžu byť spomínané nedostatky v evidenciách. Ďalším dôvodom sú trendy naznačené v šľachtiteľských záznamoch, pod čím si môžeme predstaviť uprednostňovanie určitého fenotypu, čo ma pre plemeno katastrofálnejšie následky ako vyradovanie heterozygotných prenášačov dedičných chorôb.

U niekoľkých švédskych národných plemien psov sa vyskytujú dedičné chyby a existujú takzvané programy kontroly chorôb pre niektoré z týchto porúch. Takéto programy na kontrolu chorôb vo všeobecnosti znamenajú, že zvieratá by mali mať diagnózu defektu pred chovom. Diagnóza môže vyžadovať veterinárne vyšetrenie (potrebné na diagnostiku napr.

dysplázie bedrového kĺbu, ktorá sa vyskytuje u mnohých plemien) alebo genotypový skrining. Kontrolný program umožňuje zaradenie heterozygotných prenášačov (typ B), ale nie postihnutých psov (typ C) do chovu. Program vyžaduje na stanovenie genotypu jednotlivých psov test DNA. V uvedenej štúdií sa analyzoval vplyv odstránenia nielen psov typu C, ale aj psov typu B (heterozygotných prenášačov) z populácie na zachovanie genetického stavu populácie švédskeho lapfunda. Z populácie zvierat klasifikovaných ako živé (pri predpoklade maximálneho veku 12 rokov) sa k 31. 12. 2012 odstránili psy typu B a C. To malo za následok odstránenie 34 percent populácie. Odstránenie neovplyvnilo priemernú príbuzenskú plemenitbu medzi zostávajúcimi zvieratami ($F = 0,079$ oproti $0,081$ s odstránením a bez odstránenia), ani stredná príbuznosť ($MK = 0,085$ verzus $0,084$) alebo počet ekvivalentov zakladateľského genómu ($f_{ge} = 5,95$ verzus $5,93$) medzi zostávajúcimi postihnutými zvieratami (Jansson & Laikre 2018).

Tieto výsledky ukazujú, že vyradenie heterozygotných prenášačov ochorení, rovnako ako chorých jedincov sa nijakým výrazným spôsobom neprejaví na prosperite plemena. Treba však mať na pamäti, že vyradením psov kvôli jednému génu môžeme prísť o množstvo ďalších génov, čím sa genetická diverzita znižuje. Súčasná veľkosť sčítania uvedených plemien naznačuje, že ak sa pri chove použije viac psov, čím sa zabráni extrémnym rozdielom v produkcii potomkov medzi jednotlivými psami, budúci nárast príbuzenskej plemenitby a strata genetických variácií by mali byť nepatrné. Je však dôležité aby sa pre tieto a ďalšie psy uskutočňovali doplnujúce genomické štúdie.

3.1.2 Analýza populácie plemena psov border kólie v Maďarsku za pomoci rodokmeňov

Znižovanie genetickej diverzity z dôvodov nasledovania šľachtiteľských trendov sa v zvýšenej miere prejavuje u populárnych plemien psov. Chovatelia buď uprednostňujú určitý exteriér psa, podľa toho čo je práve v kurze, alebo sa zameriavajú na pracovné výsledky. V oboch prípadoch sa cielene volia zvieratá, ktoré by podľa predpokladu chovateľov mali byť v požadovanom fenotypovom znaku čo najlepší, inak povedané vyberajú sa najlepší rodičia. Tento takzvaný líniový chov sa snaží vyhnúť sa úzko príbuzenskému páreniu; chovateľské združenie to však niekedy umožňuje. Z tohto dôvodu sa opakovane pripúšťa len vybraná skupina jedincov, čím sa postupne zvyšuje koeficient inbreedingu. Zvieratá, ktoré sú v požadovanom znaku priemerné, alebo podpriemerné nijakým výrazným spôsobom do následnej populácie neprispievajú napriek faktu, že môžu byť prínosom do genofondu plemena. S prihliadnutím na definíciu heterózneho efektu a vplyvu inbreednej depresie sa tento postup nezdá byť správnym. Tomuto problému, konkrétne u populácie plemena border kólie v Maďarsku sa venuje nasledujúca štúdia. Cieľom tejto štúdie bolo analyzovať účinky uzavretého chovu na populačnú štruktúru plemena border kólií v Maďarsku a preskúmať genetickú rozmanitosť v rámci subpopulácií a medzi nimi (Virág et al. 2019).

Psy Border Collie sa v Maďarsku chovajú na základe uzavretej plemennej knihy, ktorá predisponuje k zvýšeniu príbuzenskej plemenitby populácie, pretože je bežnou praxou, že si chovatelia psov vyberajú plemena a matky so spoločným predkom, aby si upevnili niektoré špecifické črty vzhľadu alebo pracovných schopností. Celosvetovo existujú v rámci

plemena tri špeciálne línie, ktoré sú zastúpené aj v Maďarsku, napríklad výstavná línia, pracovná línia a takzvaná „zmiešaná“ línia pochádzajúca z Austrálie a Nového Zélandu (Virág et al. 2019).

Súbor údajov o pôvode maďarskej populácie border kólií bol zostavený pomocou dostupných elektronických plemenných kníh a rodokmeňov od maďarských chovateľov. Referenčná populácia bola tvorená 1566 psami (703 psami a 863 fenami) narodených od roku 2010 do roku 2016. Vytvorený súbor s rodokmeňom maďarskej border kólie obsahoval 13 339 jedincov (5649 samcov a 7750 samíc) a do softvéru “Equihun Pedigree Builder” , ktorý slúži na vyhodnocovanie základných parametrov populácií psov, boli zadané informácie, na základe ktorých štruktúru maďarskej border kólie charakterizovali nasledujúce parametre:

- Počet zakladateľov = 894
- Efektívny počet zakladateľov = 117
- Efektívny počet predkov = 20
- Počet predkov zodpovedných za 50% genetickej variability = 8 (Virág et al. 2019).

Počet zakladateľov bol 894, ale osem jedincov bolo zodpovedných za 50% podiel na genetickej variabilite. Referenčná populácia mala úplnosť rodokmeňa 99,6% až do 15 generácií a koeficient inbreedingu 9,86%. Efektívna veľkosť populácie sa medzi rokmi 2010 a 2016 podstatne znížila. Intervaly generovania sa pohybovali medzi 4,09 a 4,71 rokmi, kde boli cesty otcov dlhšie kvôli neskoršiemu počiatočnému veku chovu u samcov v porovnaní so samicami. Pretože populácia plemena border kólia v Maďarsku je pomerne veľká, zvýšenie úrovne príbuzenského párenia bolo relatívne malé (10% za 23 rokov) (Virág et al. 2019).

Zníženie priemerných koeficientov príbuzenského párenia medzi rokmi 2011 a 2014 možno vysvetliť intenzívnou podporou chovu zvierat. Jedným z dôvodov znižovania efektívnej veľkosti populácie je, že väčšina šteniatok narodených v Maďarsku sa predáva do zahraničia kvôli nedostatku vhodných majiteľov pre toto plemeno. Prispôsobenie sa štandardom plemena tiež znižuje efektívnu veľkosť populácie (Virág et al. 2019). V chove psov je párenie blízkych príbuzných bežnou praxou, ktorej cieľom je vytvoriť vynikajúceho jedinca; po niekoľkých generáciách však zvýšená úroveň inbreedingu stupňuje úmrtnosť mladistvých. Okrem toho je toto nenáhodné párenie schopné zvýšiť krížovú depresiu (uviedenie alel do homozygotného stavu), čo ovplyvňuje budúce genetické zdravie plemena.

Plánovanie chovateľských prác je v prípade chovu psov zložité, pretože ide o spoločenské zvieratá chované väčšinou pre potešenie a ich chov sa považuje za hobby. Táto situácia je zdrojom mnohých problémov, pretože chovatelia psov sa zameriavajú na výber a výber párov zvierat na párenie, pričom neberú do úvahy príbuznosť vybraných zvierat a stupeň príbuzenského párenia. V uvedenej štúdií o genetickej diverzite plemena border kólií už bolo spomenuté, že sa jedná o plemeno veľmi populárne a jeho populácia je početná. U nízkočetných plemien psov je situácia diametrálne odlišná a aj pohľad na príbuzenské párenie sa vplyvom podmienok mení.

3.1.3 Rodokmeňová analýza populácie plemena hovawart v Poľsku

Pre porovnanie uvediem štúdiu, ktorej cieľom bolo analyzovať úroveň príbuzenskej plemenitby a príbuzenstva v poľskej populácii hovawartských psov, ktoré narozdiel od border kólií z predchádzajúcej štúdie nepatria medzi populárne a často chované plemená. V súčasnosti je najväčšia populácia hovawartských psov (asi 10 000) chovaná v Nemecku. Psy tohto plemena sa nachádzajú v Rakúsku, Švajčiarsku, Holandsku, Dánsku, Fínsku, Švédsku, Nórsku, Francúzsku, Veľkej Británii, USA, Českej republike, Poľsku, Kanade, Maďarsku a Rusku. Poľská populácia hovawartov je založená predovšetkým na zvieratách českého a nemeckého rodokmeňa. V súčasnosti poľskí chovatelia hovawartských psov naďalej používajú nemecké a české zvieratá na párenie. V dnešnej dobe je oveľa jednoduchšie cestovať za účelom párenia alebo dovozu chovných zvierat. Ak sa do poľskej populácie dostanú nepríbuzné zvieratá, bude genofond čoraz bohatší, čo môže mať priaznivý vplyv na budúce výsledky chovu. Je však potrebné zdôrazniť, že ak je v danom plemene iba 100 šteniat ročne, je len malá šanca nájsť medzi nimi vynikajúce zvieratá (Jolanta et al. 2013). Z tohto dôvodu môžeme považovať Hovawartov za plemeno s malou populáciou. Preto je príbuzenská plemenitba prakticky nevyhnutná.

Ďalšie analýzy na zistenie miery príbuzenského párenia sa uskutočňovali na rodokmeňoch 845 zvierat registrovaných v klube hovawart v Poľsku (113 psov a ich predkov). Stupeň príbuzenskej plemenitby sa vypočítal pre celú populáciu (0,0026) a osobitne pre psy (0,0021) a sučky (0,0031). Získané koeficienty príbuzenstva sú nižšie ako tie, ktoré sa odhadujú pre poľské populácie iných plemien psov. Vypočítaný efektívny počet zakladateľov (268) a predkov (233) naznačuje nízku genetickú diverzitu. Diskutovali sa preferencie chovateľov týkajúce sa farby srsti. Najskôr dominovali psy s čiernym a opáleným kabátom, potom s blond'avými a za posledných päť analyzovaných rokov sa objavili psy s čiernym kabátom (Jolanta et al. 2013).

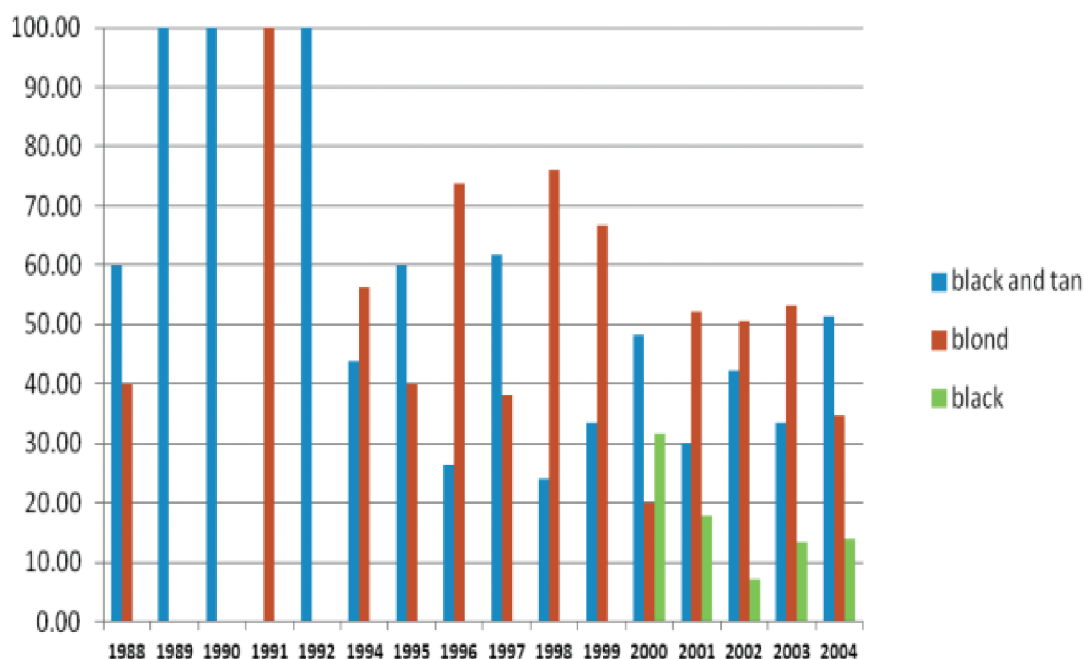
Priemerná hodnota miery koeficientu inbreedingu v poľskej populácii hovawartských psov bola 0,0026. Z 845 zvierat bolo 70 inbredných, čo predstavuje 8,28% populácie. Koeficient príbuzenskej plemenitby vypočítaný iba pre inbredné zvieratá bol 0,0318. Medzi zvieratami samca bolo inbredných 6,63% psov, s koeficientom príbuzenskej plemenitby 0,0316 a koeficient príbuzenskej plemenitby u všetkých súk bol 0,0031. Inbredné feny tvoria 9,71% populácie, zatiaľ čo koeficient inbreedingu pre inbredné feny bol 0,0320. Najvyšší priemerný stupeň vzťahu medzi príbuznými zvieratami (0,0833) sa zistil medzi otcami a fenami (Jolanta et al. 2013).

Testovanie potomstva smerom k plemennej hodnote nie je možné, pretože väčšina psov nemá dostatočný počet šteniat. Hovawart je pracovné, strážne a strážne plemeno psa. Vysoko vyvážená psychika je nevyhnutnou podmienkou pre primeranú prácu strážneho psa. Bohužiaľ, vyrovnanosť a absencia plachosti sú vlastnosti, ktoré sú obzvlášť citlivé na účinok depresie spôsobenej príbuzenským párením. Čím je dané zviera homozygotnejšie, tým väčšia je šanca, že by nespĺňalo požiadavky kladené na pracovné psy. U takýchto inbredných psov je tiež pravdepodobnejšie, že budú mať zlé zdravie a budú citliví na nepriaznivé životné podmienky. Vitalita, vitalita a primeraná psychika sú vlastnosti typické pre heterozygotných psov (Jolanta et al. 2013).

Vo všetkých špecifikáciách štandardov plemien psov môžeme nájsť informácie o tom, aké typy farby srsti sa u daného plemena nachádzajú, ktoré sú preferované alebo prípustné a ktoré sú chyby. Farba srsti, ktorá je charakteristická pre dané plemeno, je však najčastejšie prejavom estetických preferencií jeho tvorcov a chovateľov. Chovateľ zameraný na konkrétnu farbu srsti je obmedzený na značne úzky výber zvierat. Ak je to smerované iba farbou srsti, môže to viesť k množeniu a k použitiu slabších zvierat, ktorých ďalšie dôležité vlastnosti nie sú ani zďaleka dokonalé (Jolanta et al. 2013). Z dlhodobého hľadiska vedie takýto prístup k výraznému zhoršeniu úrovne chovu.

V počiatkových fázach chovu boli hovawarty so zlatou farbou srsti a čiernou tvárou, sivou alebo pomerne častou vlčou farbou srsti. V nemeckej populácii hovawartských psov prevládali zvieratá čiernej a zlatej, ktoré predstavovali približne 60% populácie, zatiaľ čo približne 30% tvorili zlaté psy a približne 10% tvorili čierni hovawartovci (Jolanta et al. 2013). Podobné podiely farby srsti sa v Poľsku začali objavovať až v roku 2004. Ako je možné vidieť na *obrázku 3*, prvé čierne šteniatka sa narodili v Poľsku v roku 2000. V súčasnosti oficiálne štandardy chovu pripúšťajú tri štandardné farby srsti, to znamená zlatú, čiernu a čiernu s pálením. Na záver sa zistilo, že koeficienty príbuzenského párenia a vzťah odhadovaný pre analyzovanú populáciu sú v porovnaní s inými plemenami psov nízke (Jolanta et al. 2013). Poľská populácia tohto plemena je pomerne malá a nie veľmi geneticky rozmanitá, čo v prípade nezodpovedného chovu môže mať za následok rýchly nárast príbuzenského párenia.

Graf 1 - graf vývoja farebných variánt psov plemena hovawart v Poľsku (Jolanta et al. 2013).



3.1.4 Analýza rodokmeňov plemena český strakatý pes

Straty genetickej diverzity majú osobitný vplyv na národné plemená s malým registrom. Medzi ne je možné zaradiť plemeno český strakatý pes, ktorého variabilita je od začiatku chovu nízka. Štúdie jeho záznamov o pôvode zaznamenali silnú stratu genetickej variability a vysokú príbuznosť medzi zvieratami (Machová et al. 2020).

Toto plemeno bolo chované Františkom Horákom pre laboratórne účely. Chov bol zameraný na vytvorenie psa s pokojnou, miernou povahou a vysokou plodnosťou, s vhodnou stavbou tela, veľkosťou a osrstením. Zakladajúcimi jedincami boli dva hybridy neznámeho pôvodu s požadovaným fenotypom. Chov však bol (hlavne zo začiatku) z veľkej časti založený na príbuzenskom párení (Machová et al. 2020). Ako môžeme vidieť z údajov z obrázku 4 jedná sa o málopočetné plemeno a z tohto dôvodu je nemožné ho očistiť od geneticky prenosných chorôb, ktoré sa u českých strakatých psov vyskytujú vo zvýšenej miere.

Najbežnejšia je dysplázia bedrového kĺbu s prevalenciou 63,58%, luxácia pately sa vyskytla u 53,44% jedincov alebo zubné abnormality takmer u každého siedmeho jedinca (Machová et al. 2020).

Tabuľka 4 - tabuľka vývoja počtu jedincov plemena český strakatý pes v ČR (Machová et al. 2020).

Period	Mothers	Fathers	Progeny	Registrations	Total Registrations	Founders
?-1954	1	1	2	7	7	5
1955-1960	1	4	6	6	13	0
1961-1978	8	8	19	19	32	0
1979-1983	2	2	4	4	36	0
1984-1985	3	1	3	3	39	0
1986-1987	3	2	6	6	45	0
1989	1	1	1	2	47	1
1990	0	0	0	1	48	1
1991	0	0	0	1	49	1
1993	2	2	11	11	60	0
1994	2	2	15	16	76	1
1995	1	1	7	7	83	0
1996	5	3	46	47	130	1
1997	1	1	2	2	132	0
1998	5	4	28	28	160	0
1999	6	5	31	31	191	0
2000	10	7	55	55	246	0
2001	10	7	59	59	305	0
2002	11	8	61	61	366	0
2003	11	8	65	65	431	0
2004	11	8	71	71	502	0
2005	16	14	79	79	581	0
2006	13	10	68	68	649	0
2007	15	14	71	71	720	0
2008	16	12	92	92	812	0
2009	20	17	105	105	917	0
2010	15	11	94	94	1011	0
2011	19	15	119	119	1130	0
2012	25	19	160	160	1290	0
2013	20	15	125	125	1415	0
2014	22	15	137	137	1552	0
2015	26	19	155	155	1707	0
2016	29	24	165	165	1872	0
2017	22	21	138	138	2010	0

Chovatelia nie sú schopní udržať rovnakú heterogenitu v novovzniknutých subpopuláciách ako v pôvodnej populácii, čo spôsobuje, že heterozygotita teda klesá s následnými generáciami a prírastok chovu (Machová et al. 2020). Negatívne dôsledky súčasných stratégií chovu sú čoraz zreteľnejšie z hľadiska zdravotného stavu populácie. Za posledných desať rokov sa genetická variabilita mnohých plemien analyzovala v rôznych krajinách a všetky vykazovali znepokojujúce údaje aspoň u jedného študovaného plemena. Český strakatý pes nie je výnimkou.

Pre túto štúdiu boli údaje o pôvode získané z chovateľského klubu KCHMPP (Klub Chovateľů Málopočetných Plemen Psů O.S., Vrdy, Česká republika) a obsahovali zaregistrovaných psov od 4. augusta 1954 do 28. septembra 2017 s ohľadom na ich pohlavie. Na výpočet pravdepodobnosti pôvodu génu sa použila populácia 114 psov a 120 súk. Vypočítal sa celkový a efektívny počet zakladateľov a predkov a ekvivalentný genóm zakladateľa. Následne boli identifikovaní zakladatelia a predkovia s najvyšším genetickým príspevkom k referenčnej populácii. Počet efektívnych zakladateľov genómu (f_{ge}) bol stanovený ako polovica inverznej hodnoty priemerného spoločného pôvodu referenčnej populácie a strata genetickej diverzity bola vypočítaná na základe genetického driftu a efektu úzkeho miesta (1-GD). Nakoniec sa strata variability genetickým posunom zistila jednoduchým odčítaním hodnôt (Machová et al. 2020).

Na *obrázku 5* a *obrázku 6* môžeme vidieť nasledovné výsledky:

- 14,6% genetickej variability základnej populácie dosiahlo súčasnú referenčnú populáciu a 85,4% sa stratilo počas generácií. Na vysvetlenie 50% genetického príspevku k referenčnej populácii by boli potrební iba dvaja predkovia a iba päť predkov by sa podieľalo na viac ako 90% celej genetickej diverzity referenčnej populácie.
- Priemerná hodnota F a AR pre celú populáciu bola 35,61%, respektíve 75,94%.
- Väčšina plemenných zvierat má koeficient inbreedingu medzi 0,50 a 0,60. Do roku 1987 bol najvyšší nárast F až 0,67.
- Efektívna veľkosť populácie pre referenčnú populáciu, vypočítaná na základe individuálneho prírastku inbreedingu k ekvivalentnému počtu úplných generácií, bola 10,28 (Machová et al. 2020).

Tabuľka 5 - tabuľka priemerov príbuzenského párenia (F) a priemernej príbuznosti (AR) v rodokmeni priradenom ku každej generácii (Machová et al. 2020).

Generation	Number of Animals	AR (%)	F (%)	The Proportion of Inbred Animals (%)	Aver. F of Inbred Animals (%)
0	10	10.00	0.00	0.00	0.00
1	2	42.32	0.00	0.00	0.00
2	2	45.33	12.50	50.00	6.25
3	4	60.14	34.38	100.00	34.38
4	3	71.56	42.19	100.00	42.19
5	6	75.47	47.40	100.00	47.40
6	6	77.67	51.46	100.00	51.46
7	3	79.43	57.42	100.00	57.42
8	3	85.43	55.99	100.00	55.99
9	4	89.96	59.21	100.00	59.21
10	4	91.82	68.60	100.00	68.60
11	9	67.83	30.13	44.44	13.39
12	30	65.83	21.98	56.67	12.45
13	49	81.17	38.09	75.51	28.76
14	104	72.77	32.83	88.46	29.04
15	222	72.26	33.02	100.00	33.02
16	294	71.51	32.64	100.00	32.64
17	337	74.02	35.33	99.70	35.22
18	391	74.34	36.00	100.00	36.00
19	300	76.80	39.19	100.00	39.19
20	193	77.01	39.39	100.00	39.39
21	34	77.34	40.04	100.00	40.04

Tabuľka 6 - tabuľka jednotlivých príbuzenských koeficientov v populáciách (Machová et al. 2020).

Fc	In the Whole Population	In the Reference Population
<0.00; 0.05	58	2
<0.15; 0.20	0	0
<0.25; 0.30	82	0
<0.30; 0.35	109	9
<0.35; 0.40	156	9
<0.40; 0.45	335	16
<0.45; 0.50	629	38
<0.50; 0.55	501	80
<0.55; 0.60	78	70
<0.60; 0.65	33	9
<0.65; 0.70	21	0

Podľa štatistík chovu bolo medzi rokmi 2007 a 2017 priemerne 6 kusov šteniat a najväčšie vrhy nepresahovali 11 šteniat. Päťpercentný limit bol najvyšší v roku 2017, ktorý bol identifikovaný v základni hranice jeho ôsmej metodiky na 37,1 šteniatkach. Na základe týchto skutočností boli uvedené rovnaké počty šteniat pre nadmerne využívanú matku alebo otca na každý rok jednotlivo a osobitne pre roky 2001–2017. To znamená, že takto identifikované zvieratá by nemali byť použité na chov v konkrétnom roku, pretože už prekročili limit počítaný z predchádzajúcich piatich rokov (Machová et al. 2020).

Až 75% genetických strát bolo spôsobených nerovnomerným príspevkom zakladateľov. Aj keď je súčasný podiel nadmerne využívaných plemien a matiek v súčasnej populácii českého strakatého psa zanedbateľný, je pravdepodobné, že sa v ďalších generáciách zvýši a bude ďalej negatívne ovplyvňovať genetické parametre populácie. Rozsah tohto vplyvu je väčší, pretože veľkosť populácie je menšia. Ekvivalent zakladajúceho genómu (f_{ge}) tiež naznačuje pokles genetickej variability v porovnaní s pôvodnou populáciou (Machová et al. 2020).

Aj keď je prepojenie jednotlivcov, ktorí sú vo vzájomnom vzťahu, vo väčšine združení chovateľov v súčasnosti zakázané a spojenie jedincov príbuzných s druhým stupňom sa dôrazne neodporúča, stále je v praxi párenie vzdialene príbuzných zvierat bežné. Najmä vo veľmi malom registri je to veľký problém, pretože v priebehu času je takmer nemožné nájsť nepríbuzných jedincov a koeficient inbreedingu sa stále zvyšuje. Pre českého strakatého psa je priemerný koeficient inbreedingu pre referenčnú populáciu 0,365 a je takmer isté, že koeficient príbuzenskej plemenitby bude v nadchádzajúcich rokoch naďalej narastať a že populácia plemena sa bude zvyšovať stále rovnomerne. Pretože sa jedná o mladé národné plemeno chované takmer výhradne v Českej republike, nie je možnosť osvieženia krvi zo zahraničia. Jedinou možnosťou zostáva infúzia krvi iného plemena, čo má len krátkodobý vplyv na zvýšenie genetickej diverzity, pokiaľ sa nebude pravidelne opakovať. Potomkovia regenerujúcich sa jedincov sú navyše fenotypovo odlišní od štandardov plemena, čo ich robí menej cennými pre chovateľských posudkov a chovateľov. Tvrdý výber a očistenie populácie od škodlivých alel nie sú vhodné kvôli jej malému registru (Machová et al. 2020).

Podobnou štúdiou je skúmanie údajov o pôvode deviatich francúzskych plemien psov, a to Barbet (BAR), Basset fauve de Bretagne (BAF), Beauceron (BEN), Berger des Pyrénées (BRP), Bouledogue Français (BUF), Braque Saint-Germain (BQG), Dogue de Bordeaux (DOB), Epagneul Breton (EPB) a Montagne des Pyrénées (MOP). Zisťovali sa efektívne počty predkov psov narodených v rokoch 1997 až 2001 a porovnávali sa koeficienty príbuzenstva u skúmaných psov s koeficientami príbuzenstva ich rodičov. Efektívne počty predkov psov narodených v rokoch 1997 až 2001 boli rovné 6,7 (BAR), 40,2 (BAF), 36,5 (BEN), 16,0 (BRP), 37,0 (BUF), 13,1 (BQG), 28,9 (DOB), 33,3 (EPB) a 34,0 (MOP). Priemerný koeficient príbuzenskej plemenitby psov narodených v rokoch 1997 až 2001 so známymi oboma rodičmi bol rovný 12,4 % (BAR), 3,9 % (BAF), 5,4 % (BEN), 7,2 % (BRP), 3,3 % (BUF), 6,0 % (BQG), 4,1 % (DOB), 4,5 % (EPB) a 4,0 % (MOP). Zistilo sa, že tieto hodnoty sú výrazne vyššie ako priemerný koeficient príbuzenstva medzi rodičmi samcov a samičiek týchto zvierat, s výnimkou BAR a BQG, čo odhaľuje obvyklú prax párenia medzi príbuznými zvieratami s rastúcou tendenciou (Leroy et al. 2006)

3.2 Analýza za pomoci údajov o genotype polymorfných mikrosatelitných markerov

Historicky sa odhad príbuzenského párenia opieral o hĺbkové rodokmene, pričom koeficienty príbuzenského párenia sa odhadovali z rodokmeňových vzťahov medzi predkami. Údaje o genotype polymorfných mikrosatelitných markerov sa použili na vyhodnotenie genetickej diverzity u psov a v poslednej dobe sa údaje o genotype pre celý genóm s jedným nukleotidovým polymorfizmom použili u niekoľkých plemien. Na základe týchto údajov je možné charakterizovať série homozygotnosti, ktoré umožňujú kvantifikáciu rozsahu inbreedingu u diploidných jedincov, najmä v prípade neúplných, nespoľahlivých alebo chýbajúcich rodokmeňových informácií. Ďalej možno dĺžku pozorovaných segmentov použiť na rozlíšenie medzi nedávnym a starodávnym príbuzenským párením a na vyvodenie záverov o populačnej histórii plemien (Letko et al. 2020).

Už viac ako 10 rokov chovatelia hospodárskych zvierat generujú obrovské množstvo údajov o genotypoch a implementujú schémy genómovej selekcie, ale u psov sa tieto údaje generujú hlavne na účely mapovania génov. Prvé použitie získaných údajov na preskúmanie asociácie mier reprodukčnej zdatnosti u psov bolo zaznamenané u zlatých retrieverov. Všeobecne sú štúdie založené na údajoch o genotypizácii s variabilnou hustotou markerov a spravidla pre menej ako 100 vybraných jedincov na plemeno (Letko et al. 2020).

3.2.1 Využitie analýz dát genotypu na záchranu ohrozených populácií psov

V súčasnosti najlepšie študovaným plemenom psov, ktoré na hodnotenie genetickej diverzity využíva sekvencie celého genómu, je nórsky lundehund, o ktorom je známe, že je vystavený riziku pre multifaktoriálny život ohrozujúci syndróm špecifický pre dané plemeno. Súčasná populácia lundehundov je vysoko inbreedná a samotný výber optimálneho príspevku nevedie k zlepšeniu z dôvodu extrémne vysokej príbuznosti celej populácie. Analýzy dát genotypu odhalili podstatne nízku genetickú diverzitu lundehunda, a preto sa na záchranu ohrozenej populácie odporúča i kríženie s úzko príbuznými plemenami (Letko et al. 2020).

Úspešným príkladom nahradenia patogénnej alely krížením je dalmatínske plemeno, ktoré trpí hyperurikozúriou a má extrémne vysokú frekvenciu škodlivej recesívnej alely génu. V tomto prípade bol jedinec z plemena anglický pointer, ktorý bol homozygotný pre danú alelu, použitý na produkciu neovplyvnených heterozygotných psov, ktoré boli následne spätne krížené na produkciu zdravých jedincov ktoré sú takmer na nerozoznanie od čistokrvných dalmatíncov. Ďalšie podobné štúdie umožnil vytvorenie veľkého katalógu genetických variácií, ktorý zachytáva väčšinu variácií, ktoré existujú u moderných psov. Komplexná sada variantov spolu s frekvenciami ich alel a genotypov v rámci plemien a medzi nimi pomáha odlíšiť funkčne relevantné varianty od neutrálnych variantov a identifikovať potenciálne oblasti variácií špecifické pre dané plemeno. Ukázalo sa, že tieto údaje sú veľmi užitočné na analýzu fenotypových variácií a na identifikáciu lokusov, ktoré prispievajú k jednoduchej aj komplexnej náchylnosti na ochorenie u psov. Výsledná identifikácia príčinných variantov prispieva k udržaniu udržateľnosti plemien znížením počtu zdedených zdravotných problémov. Údaje o mitochondriálnom genóme, ktoré sa tiež

sekvencujú, sa môžu použiť ako ďalší indikátor na hodnotenie rozmanitosti a na získanie komplexnejšieho obrazu o pôvode a histórii populácií psov (Letko et al. 2020).

3.2.2 PCR amplifikácia pomocou metódy ISSR

Na vyhodnotenie genetických variácií a diferenciácií sa tiež úspešne používajú markery opakovania sekvencie, metóda ISSR – Inter simple sequence repeat. Jedná sa o metódu založenú na PCR, ktorá využíva mikrosatelitové sekvencie ako primery. Mikrosatelity (SSR), tiež nazývané STR (short tandem Repeats - krátke tandemové opakovanie) sú jednoduché, krátke, opakujúce sa sekvencie niekoľkých nukleotidov (1-4 bázy), tzv. repetície (Košnar 2001). Tieto repetitívne jednotky sa vyskytujú často, náhodne, v celom genome u všetkých eukaryot a líšia sa počtom opakovaní. Počas PCR dochádza k amplifikácii úsekov DNA medzi dvoma rovnakými mikrosatelitovými repetitívnymi sekvenciami, ktoré sú umiestnené v reťazci DNA v opačnom smere. Výsledkom sú rôzne dlhé úseky DNA medzi mikrosatelitami (Kriangwanich et al. 2020).

Mikrosatelity sú najčastejšie tvorené opakovaním mono-, di-, tri- alebo tetranukleotidov, napr. (A)_n, (AT)_n, (ATA)_n pod. Počet opakovaní jednotky (repetície) v konkrétnom mieste DNA (lokuse) definuje alelu. Každý jedinec má v jadrovej DNA dve kópie každého mikrosatelitu, jeden zdedený po matke, druhý po otcovi. U diploidných jedincov tak môžeme odhaliť dve alely, u tetraploidných až štyri atď (Košnar 2001).

Dĺžku alel (y) zistíme PCR amplifikáciou daného lokusu pomocou primérov priliehajúcich k mikrosatelitnej sekvencii. Pre analýzu mikrosatelitov teda potrebujeme poznať okolité sekvencie. PCR fragmenty potom rozdelíme podľa dĺžky v automatickom sekvenátore tzv. fragmentačnou analýzou. Ku každému vzorky sa pridá fluorescenčne značený štandard (500-Liz), obsahujúci fragmenty DNA o známej dĺžke, aby bolo neskôr možné identifikovať dĺžku každého fragmentu (alely) a jednoznačne ju porovnávať s dĺžkou fragmentov v akomkoľvek inom behu (Košnar 2001).

Mikrosatelity sú považované za jedny z najvhodnejších genetických markerov vďaka ich hojnému výskytu v celom genome, extrémnej variabilite (polymorfizmu) a kodominantnej dedičnosti (umožňuje rozlíšiť heterozygotov). V populačnej biológii nachádza využitie pri identifikácii príbuzných jedincov, až po odvodzovanie demografických parametrov (Košnar 2001).

Jadrové mikrosatelity sú často veľmi druhovo špecifické, musíme teda pracovať s druhom, pre ktorý sú primery už publikované. Používajú sa na vnútrodruhovej úrovni. Na základe tzv. konsenzuálnych primérov môžeme určité lokusy amplifikovať pre druhy z mnohých rôznych čeladi. Sú teda využiteľné pre hodnotenie variability medzi druhmi (Košnar 2001).

Pre amplifikáciu konkrétneho úseku DNA, ktorý obsahuje repetitívnu mikrosatelitovú sekvenciu použijeme dva špecifické primery, jeden z primérov je fluorescenčne značený (používame farby 6-FAM, VIC, NED a PET). Ak je potrebné analyzovať viac mikrosatelitových lokusov (často sa analyzuje 8-10), je výhodné pokúsiť sa zostaviť tzv. Multiplex PCR. Je to v podstate bežná PCR reakcia, do ktorej pridáme viac primerových párov naraz a amplifikuje tak viac lokusov (až napríklad päť) v jednej PCR

reakcii. Môžeme tak výrazne znížiť finančné i časové náklady na analýzu. Pre úspešnú a dostatočnú amplifikáciu všetkých lokusov musíme zaručiť, aby priméry mali približne rovnakú teplotu, aby priméry v jednej PCR reakcii nevytvárali diméry a aby lokusy s prekrývajúcim sa rozsahom predpokladaných dĺžok fragmentov boli označené inou fluorescenčnou farbou.

Do 1.5 ml eppendorfky napipetujeme zmes pre príslušný počet vzoriek + 1. pracujeme stále na ľade.

- sterilné Milli-Q voda 5,7 µl
- 2 × Plain PP Master Mix (Top-Bio) .. 7,5 µl
- forward primer (10 pmol / mikrolitrov) 0,4 µl
- reverse primer (10 pmol / mikrolitrov) 0,4 µl (Košnar 2001).

Premiešame na vortexe, krátko stočíme v centrifúge a po 14 µl napipetuje do PCR skúmaviek (prípadne stripov). Pridáme 1 ml nariadenej DNA (5 ng / mikrolitrov), premiešame na vortexe a vložíme do termocykléra s príslušným teplotným programom. Po prebehnutí reakcie otestujeme úspešnosť amplifikácie na 1% agarosovom gélu v TBE pufri.

Príprava pre fragmentačnú analýzu:

Pripravíme zmes obsahujúcu 0,25 µl veľkostného štandardu (Size štandard, 500-LIZ), 0,5 µl z každého PCR produktu a doplníme deionizovaným formamidom (tzv. Hi-Di formamid = high deionized) na výsledný objem 10 ml. Postupujeme tak, že si najprv pripravíme zmes formamidu a veľkostného štandardu pre príslušný počet vzoriek +1. Premiešame, krátko stočíme, a rozpipetujeme do označených 0,5 ml eppendorfiiek. Pridáme PCR produkt (y). Premiešame na vortexe, krátko stočíme v centrifúge a odnesieme do sekvenčného centra (Košnar 2001).

3.2.3 Posúdenie genetickej diverzity plemena a odhad užitočnosti markerov na testovanie rodičovstva a individuálnu identifikáciu plemena Kangal sheperd dog

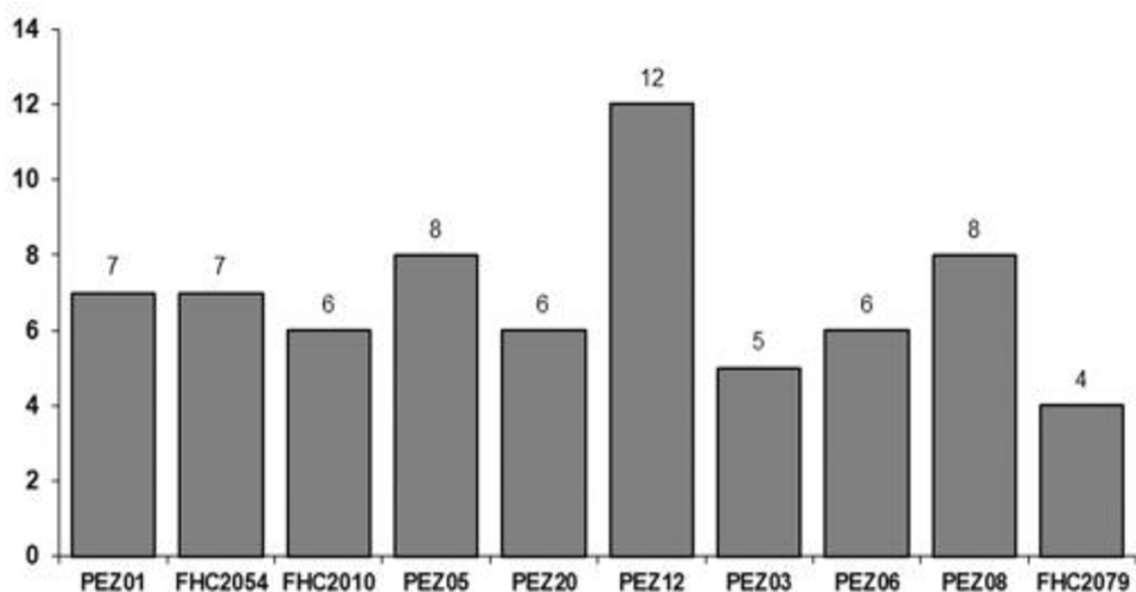
Boli vykonané rôzne štúdie genetickej diverzity naprieč, ako aj v rámci rôznych plemien psov, údajov o tureckých pôvodných plemenách je však dosť málo. Kangalský, akbashský a karský ovčiak pochádzajú z Turecka a boli zoskupené do jedného plemena nazývaného anatolský ovčiak. Tieto tri plemená sa vyznačujú odlišnými genetickými štruktúrami a všeobecné zoskupenie plemien je neopodstatnené (Vladimir 2020).

Kangal Shepherd Dog bol uznaný Fédération Cynologique Internationale (FCI) ako domáce turecké plemeno v roku 2018 a bol klasifikovaný v skupine FCI 2, oddiel 2.2 podľa normy č. 331. Považuje sa za najbežnejšieho psa v Turecku, ktorý sa dodnes veľmi často používa ako strážny pes hospodárskych zvierat. Štandard plemena bol prvýkrát ustanovený tureckou štandardnou inštitúciou v roku 1997 a krátko potom bola zahájená iniciatíva na ďalšiu štandardizáciu a ochranu plemena. Uskutočnil sa systematický kynologický výskum, ktorým sa dosiahol cieľ triedenia medzi mnohými rôznymi plemenami pastierskych psov (Vladimir 2020). Rovnako ako u každého z plemien psov si implementácia opatrení na zachovanie genetickej diverzity a predchádzanie geneticky prenášaným chorobám pri zachovaní požadovaných fenotypových znakov vyžaduje údaje o genetickej štruktúre.

Cieľom tejto štúdie bolo zistiť odchýlky v 10 autozomálnych mikrosatelitných markeroch na účely posúdenia genetickej diverzity plemena a odhadnúť užitočnosť markerov na testovanie rodičovstva aj na individuálnu identifikáciu plemena. Na účely analýz DNA sa vzorky odoberali od 51 psov zaznamenaných v pôrodnej knihe Tureckej asociácie pre psov. Všetci psi zahrnutí do študovanej populácie neboli v prvej generácii nijako príbuzní, v čase odberu vzoriek boli starší ako 12 mesiacov a boli lokalizovaní v oblasti mesta Sivas v strednej Anatólii. Psy, ktoré odoberali vzorky, boli vo vlastníctve jednotlivých majiteľov a boli to pracovné psy používané ako chovatelia dobytku. Mikrosatelitná analýza DNA bola extrahovaná podľa štandardného protokolu pre organickú extrakciu nukleových kyselín z eukaryotických buniek (Vladimir 2020).

Boli stanovené nasledujúce parametre: celkový počet alel, priemerný počet alel na jeden lokus, pozorovaná HO a očakávaná HE heterozygotnosť, odchýlky od Hardy-Weinbergovej rovnováhy, väzbová nerovnováha medzi párami lokusov a polymorfný informačný obsah pre všetky alely. Celkový počet alel v študovanej populácii bol 69. Počet alel na jeden lokus sa pohyboval od 4 do 12 a bol priemerne 6,9 ako môžeme vidieť na *obrázku 7*. Z 12 rozpoznávaných alel mala alela 4 najvyššiu frekvenciu v testovanej populácii, konkrétne 20%, zatiaľ čo frekvencie iných identifikovaných alel boli skôr nízke. Na *obrázku 8* vidíme, že priemerné hodnoty HO a HE boli 0,55, respektíve 0,77. HO sa pohybovala od 0,44 do 0,72, zatiaľ čo HE kolísala medzi 0,60 a 0,89. Testy na odchýlku od HWE preukázali signifikantný ($P < 0,005$) rozdiel medzi pozorovanou a očakávanou frekvenciou genotypov iba na dvoch lokusoch. Parametre genetickej diverzity založené na mikrosatelitných markeroch stanovených v tejto štúdii naznačujú vysokú úroveň genetickej diverzity. V porovnaní s výsledkami niektorých skorších výskumov bol počet alel pomerne vysoký: 4–12, v priemere 6,9 (Vladimir 2020).

Graf 2 - graf ukazujúci počet alel na mikrosatelit v 10 skúmaných lokusoch v populáciách plemena Kangal (Vladimir 2020).



Tabuľka 7 - tabuľka hodnôt Hardy-Weinbergovej rovnováhy (HWE) v sledovanej populácii plemena Kangal (Vladimir 2020).

Locus	H _O	H _E	p	SD
PEZ01	0.58140	0.78194	0.06224	0.00024
FHC2054	0.44444	0.87582	0.00046	0.00002
FHC2010	0.50000	0.71270	0.02729	0.00016
PEZ05	0.58696	0.68251	0.01285	0.00011
PEZ20	0.62500	0.78004	0.08515	0.00025
PEZ12	0.51613	0.89635	0.00000	0.00000
PEZ03	0.50000	0.74242	0.16955	0.00042
PEZ06	0.53333	0.84598	0.11147	0.00026
PEZ08	0.72727	0.82288	0.80294	0.00042
FHC2079	0.50000	0.60320	0.06745	0.00028
Mean value	0.55145	0.77439		

HO – observed heterozigosity; HE – expected heterozigosity, p – p value, SD – standard deviation.

Plemeno kangal sheperd dog si zachováva vysokú úroveň genetickej diverzity, najmä v porovnaní s plemenami, ktoré sú predmetom intenzívnejších šľachtiteľských programov. Jedným z predpokladaných dôvodov vystavenej rozmanitosti by mohla byť príležitostná hybridizácia s európskymi vlkami počas severoázijskej migrácie ľudí (Vladimir 2020). Údaje vyplývajúce z tohto výskumu boli použité na podporu rozpoznávania plemien a prispeli k rozvoju šľachtiteľského programu upraveného podľa špecifických charakteristík kangalského ovčiaka ako cenného genetického zdroja euroázijského regiónu.

3.2.4 Analýza úrovne príbuzenskej plemenitby plemena nemeckého krátkosrstého stavača z genomického a genealogického hľadiska

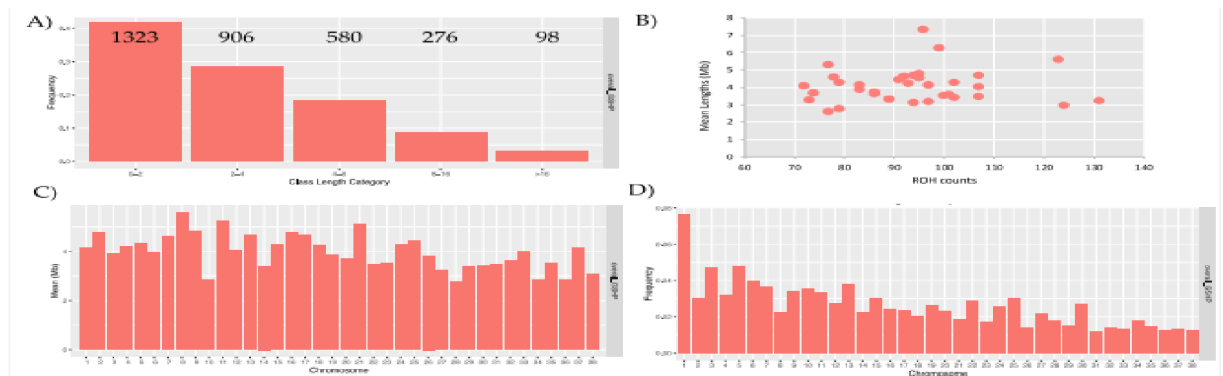
Autori tejto štúdie popisujú genomickú architektúru plemena nemecký krátkosrstý stavač a analyzujú úrovne príbuzenskej plemenitby z hľadiska genomického a genealogického. 24 psov z Talianska bolo genotypizovaných a analyzovaných spoločne s 10 psami z USA pomocou sérií homozygotnosti - priame meranie podielu homozygotnej DNA. Niektoré vlastnosti jasne odhalili výberové ciele, ktorým sa plemeno venuje (Boccardo 2020). Výsledky popisujú nízko inbrednú populáciu s celkom dobrou úrovňou genetickej variability.

Z dvadsiatich štyroch rodokmeňových vzoriek nemeckého krátkosrstého stavača (12 samcov a 12 samíc) bola DNA extrahovaná zo zvyšku vzorky bežnej krvi odobratej na rutinnú kontrolu zdravotného stavu. Vzorky boli odobraté z nesúvisiacich psov druhej generácie rôznych talianskych regiónov. Tento prístup umožnil, aby vzorka bola považovaná za reprezentanta talianskej populácie a jej genetickej variability. Podľa protokolov o uskladnení bola identita psov po kontrole čipom potvrdená veterinárnym lekárom: číslo čipu, registračné číslo plemennej knihy ENCI, meno, pohlavie a dátum narodenia. Celkovo bolo odobratých 34 vzoriek (24 Talianov, 10 USA) a boli vypočítané

genomické a rodokmeňové koeficienty príbuzenskej plemenitby. Bolo identifikovaných 3 183 sérií homozygotnosti u všetkých 34 psov. Minimálny a maximálny počet jednoduchých nukleotidových polymorfizmov (SNP) definujúcich všetky dĺžky nástupu homozygotnosti ROH je 40 a 3060 (Boccardo 2020).

Detekcia genomických oblastí, ktoré sú základom fenotypových charakteristík alebo postojov špecifických pre plemeno, môže poskytnúť indikáciu o špecifickej genetickej štruktúre populácie alebo plemena. ROH v súlade s ich dĺžkou informujú o možnom umelom alebo prírodnom selekčnom tlaku. Dlhé ROH (~ 10 Mb) sa vyskytujú v dôsledku nedávneho príbuzenského párenia a keď udalosti rekombinácie neruší dlhé segmenty chromozómov. Krátke ROH (~ 1 Mb) sa namiesto toho produkujú genomovými regiónmi IBD (identický vývoj) od starých predkov (pred 50 generáciami). Priemerný počet ROH pre vzorku bol 93,6. ROH sa našli na všetkých chromozómoch. Celkom 854 SNP definovalo 11 oblastí ROH, v ktorých bol gén už spojený s behaviorálnymi a morfológickými znakmi psa. Podiel priemerne pozorovaných homozygotov odhadovaných na celkovom počte SNP bol 0,70. Koeficient genomického inbreedingu na základe ROH bol 0,17. Priemerná príbuzenská plemenitba založená na genealogických informáciách viedla k 0,023. Výsledky popisujú nízko inbreednú populáciu s celkom dobrou úrovňou genetickej variability. Analýza tiež odhalila, že nemecký krátkosrstý stavač ITALY a USA zdieľali rovnakého predka. Pokiaľ ide o počet a dĺžku ROH u jednotlivcov, boli zistené výrazné rozdiely. Minimálny a maximálny počet SNP definujúcich všetky ROH je 40, respektíve 3060. ROH majú hlavne malú dĺžku; v skutočnosti sú ROH 0-2 Mb a 2-4 Mb najbežnejšie identifikované triedy dĺžky (t. j. 70%) (obrázok 9). ROH sa tiež našli v triede dĺžky > 16 Mb (obrázok 9A). Počet ROH na jednotlivca sa pohyboval od 71 do 131, so stredným počtom ROH pre vzorku 93,6. Iba tri vzorky vykazovali veľmi veľký počet ROH s počtom 123, 124 a 131. Priemerná veľkosť ROH týchto troch jedincov je napriek tomu podobná ako u ostatných psov. *Obrázok 9B* ukazuje vzťah medzi počtom ROH a priemernou celkovou dĺžkou ROH pre každého jednotlivca (hlavne v rozmedzí 3 až 5 Mb). Menej ako 50% chromozómov (*obrázok 9C*) má priemernú dĺžku nad 4,072 Mb a nie je zrejماً korelácia medzi dĺžkou a priemerom chromozómov. Výsledkom bola dĺžka ROH. Grafické znázornenie frekvencií ROH na autozómoch je znázornené na *obrázku 9D* (Boccardo 2020).

Graf 3 - graf štatistík o dĺžkach nástupu homozygotnosti (ROH). A) Frekvencie a počty ROH pre každú triedu dĺžky; B) Vzťah medzi počtom a priemernou celkovou dĺžkou (Mb) ROH u každého psa; C) stredná dĺžka (Mb) pre každý chromozóm; D) Frekvencie ROH na chromozómoch



Získané výsledky možno považovať za silný a objektívny nástroj v manažmente ochrany plemien. Genómové údaje, ktoré sa tu analyzovali, ukazovali dôležitosť homozygotity, morfológie a behaviorálnych znakov, ktorých expresiu tvoria známe gény (Boccardo 2020). Výsledky výskumu tiež podčiarkujú dôležitosť integrácie genealogických a molekulárnych informácií o plemenách psov, aby sa získali zmysluplné údaje o ochranných opatreniach plemien.

3.2.5 Analýza genetickej rozmanitosti a genómovej štruktúry pôvodných čínskych plemien psov

V Číne existujú takmer tri desiatky pôvodných plemien psov. Na základe geografického rozšírenia je možné psy pôvodom z Číny rozdeliť do troch skupín: horské psy, psy na plošine Qinghai Tibet a obyčajné psy (Yang 2019). Pôvodné domáce plemená sú veľmi prispôsobené miestnym podmienkam prostredia.

Ľudia všeobecne triedia čínskych domorodých psov do kategórií podľa toho, ako sa používajú (napr. pastierske psy, strážne psy, domáce zvieratá atď.); umelý výber pre konkrétne fenotypy je dôležitou hnacou silou rozmanitosti čínskych plemien psov. Preto sú pôvodní čínski psy dôležitými genetickými zdrojmi na štúdium formovania špecifických plemien a na identifikáciu génov zodpovedných za súčasné fenotypové variácie. V posledných rokoch sa objavilo oveľa viac štúdií o domestikácii a vývoji čínskych psov. Bolo tiež opísaných niekoľko príčinných génov zodpovedných za fenotypové variácie pôvodných čínskych psov. Podľa našich najlepších vedomostí však u mnohých pôvodných čínskych plemien psov chýba výskum genetickej rozmanitosti, genómovej štruktúry, vývojových vzťahov a selekčných podpisov (Yang 2019). Cieľom tejto štúdie bolo preskúmať genetickú variabilitu čínskej populácie psov a porovnať ju so západnými psami dúfajúc že prostredníctvom týchto porovnaní sa získa viac informácií o vývoji domácich psov.

Genotypovalo sa 173 psov, vrátane 157 psov z 15 pôvodných čínskych plemien psov, 10 rotvajlerov a 3 papilónov ako kontroly a 3 ázijských vlkov. Vzorky ázijského vlka boli odoberané zo zoo Nanchang. Vzorky 10 rotvajlerov a 3 papilónov sa odobrali zo stanice služobných psov v Nanchangu v provincii Jiangxi. Pred odberom vzoriek pre každé plemeno sa starostlivo skontrolovali záznamy o pôvode, aby sa predišlo príbuzným vzorkám. Vyškolení veterinári odobrali všetky vzorky krvi podľa čínskej normy verejnej bezpečnosti. Okrem toho boli údaje o genotypizácii od 458 západných psov stiahnuté zo súboru údajov a boli použité na porovnanie genetickej diverzity medzi čínskymi a západnými psami (*obrázok 10*) (Yang 2019).

Tabuľka 8 - tabuľka genetických parametrov a rozsah nerovnovážnej väzby čínskych a západných populácií psov (Yang 2019).

Population	Origin	No.	Abb.	N _{SNP}	Indices of Genetics Diversity				r ² _{0.3} (kb)	inbreeding coefficient	Genotyping data from
					P _n	A _n	H _e	H _o			
Asian grey wolf	China	3	C_AGW	43,966	0.48	1.48	0.19	0.26	–	0.35	*
Chuangdong hound	Chongqing	12	C_CDH	64,219	0.87	1.88	0.29	0.30	45.51	0.31	*
Chinese country dog	Guangdong	9	C_CRD	81,323	0.96	1.96	0.36	0.36	22.72	0.17	*
Guangxi hound	Guangxi	12	C_GXH	73,850	0.94	1.95	0.34	0.34	21.51	0.21	*
Kazakhstan shepherd dog	Xinjiang	4	C_KzS	84,325	0.92	1.92	0.36	0.39	–	0.09	*
Liangshan hound	Sichuan	12	C_LSH	67,104	0.90	1.91	0.31	0.32	46.35	0.26	*
Linzi dog	Tibet	12	C_LzD	80,221	0.97	1.98	0.37	0.37	26.37	0.14	*
Mongolia Xi dog	Inner Mongolia	12	C_MGX	82,543	0.98	1.99	0.38	0.40	27.16	0.08	*
Pekingese	Beijing	3	C_Pkg	75,408	0.82	1.82	0.33	0.36	–	0.17	*
Qingchuan hound	Sichuan	12	C_QCH	75,664	0.95	1.96	0.35	0.35	27.54	0.20	*
Shandong Xi dog	Shandong	12	C_SDx	77,731	0.96	1.97	0.36	0.38	35.45	0.14	*
SharPei	Guangdong	21	C_SrP	74,964	0.97	1.98	0.35	0.34	46.33	0.22	*
Shanxi Xi dog	Shanxi	12	C_SXX	65,413	0.86	1.87	0.30	0.31	77.79	0.28	*
Hequ Tibetan mastiff	Gansu	7	C_HTM	73,909	0.90	1.90	0.34	0.39	53.09	0.10	*
Tibetan mastiff	Tibet	15	C_TMF	84,308	0.98	1.99	0.38	0.36	23.23	0.17	*
Xiasi hound	Guizhou	12	C_XSH	74,280	0.95	1.96	0.34	0.34	18.95	0.21	*
Belgian Tervuren	Belgium	12	W_BeT	69,429	0.89	1.89	0.32	0.33	89.00	0.24	**
Beagle	England	10	W_Bgl	73,144	0.89	1.89	0.31	0.32	72.66	0.27	**
Bernese Mountain dog	Switzerland	12	W_BMD	59,370	0.83	1.84	0.28	0.29	150.8	0.35	**
Border Collie	England	16	W_BoC	73,276	0.95	1.98	0.34	0.35	66.91	0.19	**
Border Terrier	England	25	W_BoT	63,539	0.85	1.85	0.28	0.28	168.5	0.37	**
Brittany Spaniel	France	12	W_BrS	77,530	0.96	1.97	0.36	0.35	50.71	0.20	**
Papillon	France	3	W_Pap	74,624	0.81	1.81	0.33	0.41	–	0.05	*
Cocker Spaniel	England	14	W_CoS	76,410	0.95	1.95	0.34	0.32	71.99	0.26	**
Dachshund	Germany	12	W_Dac	79,874	0.97	1.97	0.37	0.35	44.15	0.19	**
Doberman Pinscher	Germany	25	W_Dob	60,009	0.88	1.93	0.27	0.25	205.2	0.42	**
English Bulldog	England	13	W_EBD	60,468	0.84	1.85	0.27	0.25	138.4	0.42	**
Elkhound	England	12	W_Elk	77,561	0.95	1.96	0.36	0.35	49.50	0.21	**
English Setter	England	12	W_ESt	71,106	0.92	1.93	0.33	0.33	73.24	0.24	**
Eurasier	Europe and Asia	12	W_Eur	72,411	0.93	1.93	0.33	0.35	65.84	0.21	**
Finnish Spitz	Finland	12	W_FSp	65,032	0.86	1.87	0.30	0.31	100.9	0.30	**
Gordon Setter	England	25	W_GoS	80,738	0.98	2.03	0.36	0.34	53.52	0.22	**
Golden Retriever	Canada	14	W_GRe	76,318	0.96	1.96	0.34	0.33	60.09	0.25	**
Greyhound	Italy	11	W_Gry	63,515	0.87	1.87	0.30	0.27	101.9	0.37	**
German Shepherd	Germany	12	W_GSh	61,418	0.85	1.85	0.28	0.28	123.9	0.36	**
Greenland sledge dog	Canada	12	W_GSI	53,982	0.82	1.82	0.25	0.25	90.36	0.43	**
Irish Wolfhound	Ireland	11	W_IrW	54,601	0.74	1.74	0.26	0.26	225.6	0.41	**
Jack Russell Terrier	England	12	W_JRT	83,934	0.99	1.99	0.39	0.40	37.48	0.10	**
Labrador Retriever	Canada	14	W_LRe	79,979	0.96	1.96	0.36	0.34	59.63	0.21	**
Newfoundland dog	Canada	25	W_NFd	76,133	0.95	2.00	0.34	0.33	77.60	0.25	**
Nova Scotia Duck Tolling Retriever	Canada	23	W_NSD	70,421	0.91	1.91	0.32	0.32	101.6	0.26	**
Rottweiler	Germany	22	W_Rtw	64,439	0.89	1.90	0.30	0.29	132.2	0.33	***
Schipperke	Belgium	25	W_Sci	76,758	0.95	2.06	0.34	0.35	73.33	0.21	**
Standard Poodle	France	12	W_SiP	76,733	0.95	1.95	0.35	0.36	69.01	0.18	**
Terrier Yorkshire	England	12	W_TYo	77,523	0.96	1.96	0.36	0.36	51.77	0.17	**
Weimaraner	Germany	26	W_Wei	59,404	0.88	1.88	0.28	0.27	172.1	0.37	**
Chinese indigenous dogs	China	170	C_dog	108,242					8.49	0.19	
Western dogs	Western	458	W_dog	117,869					15.07	0.27	
All dogs		628	All_dog	119,427							

No. indicates the number of individual for each breed; Abb. represents the breed abbreviation that used in this article; N_{SNP}, the number of SNPs with MAF >0.1; P_n, the proportion of the SNPs which displayed polymorphism in each dog breed in the all 131,927 SNPs passed the quality control; A_n, allelic richness; H_e, expected heterozygosity; H_o, observed heterozygosity; r²_{0.3} were calculated between all pairs of SNPs with MAF ≥5% and <10% missing data in each population.
*Genotyping data from this study, and **from Vayssie et al. (2011). ***10 samples of Rottweiler were collected from service dog station in Nanchang, Jiangxi province, and genotyped in this study.

Z výsledkov analýzy genetickej diverzity (parametre genetickej variability) vyplýva, že pôvodní čínski psi majú vyššiu úroveň genetickej diverzity v porovnaní so západnými psami. Toto zistenie možno vysvetliť dvoma primárnymi dôvodmi. Po prvé, k domestikácii domorodých čínskych psov došlo oveľa skôr ako k domestikácii západných psov. Po druhé,

rovnako ako dedinské psy, aj pôvodné čínske psy môžu podstúpiť menej intenzívny výber, pretože pri formovaní plemien neexistoval žiadny špecifický účel selekcie v porovnaní s väčšinou moderných plemien psov. Alternatívne, aj keď sa zhromaždili vzorky od niekoľkých nepríbuzných jedincov, aby sa pokryla široká pokrvná príbuznosť, použité vzorky mohli nedostatočne predstavovať genomický súbor tohto plemena (Yang 2019).

Prírodný a umelý výber dramaticky formoval genomickú variabilitu psov počas domestikovania a formovania plemien. V tejto štúdii sa detekovali selekčné podpisy v genóme psa pomocou štatistických hodnôt u každého z jednotlivých plemien a troch ďalších skupín plemien. Analýza umožnila identifikovať možné kandidátske gény pre špecifické fenotypy. Tibetský doga a psy Linzhi žijú po stáročia na Qinghai-tibetskej náhornej plošine, čo vyústilo do úprav vo vysokých nadmorských výškach. Táto skutočnosť nám pomáha identifikovať kandidátske gény na adaptáciu do vysokých nadmorských výšok pomocou selekčnej analýzy. EPAS1 je gén zodpovedný za adaptáciu na vysoké nadmorské výšky. Niekoľko génov spojených s krvotvorbou, erytropoézou a morfológiou srdca sa nachádza v regiónoch, kde sa našli silné selekčné signály. Tieto gény sú dôležitými kandidátskymi génmi na vysokohorskú adaptáciu psov. Rýchlosť behu, vytrvalosť a agresia sú dôležité vlastnosti pre poľovné psy. Sú výsledkom silného umelého výberu. Čínske psy Xi sú známe rýchlym behom a vytrvalosťou v love. NOL8 je gén spojený s hladinami cirkulujúcej glukózy nalačno. Cirkulujúca glukóza dodáva energiu pre vytrvalosť. Avšak možné vzťahy všetkých génov ukazujúcich signály selekcie opísané vyššie s fenotypmi psov boli odvodené z funkcií génov, ktoré sa predtým uvádzali u psov alebo iných zvierat (Yang 2019).

Tiež plemená strážnych psov hospodárskych zvierat zo západného Balkánu sú dobrým príkladom toho, ako sa komplexný vzor genetickej diverzity pozorovaný u plemien psov formoval prechodom v praktikách chovu psov. Napriek ich spoločnému geografickému pôvodu a relatívne nedávnomu formálnemu uznaniu ako samostatné plemená, krasový ovčiak, Sarplaninac a Tornjak vykazujú odlišnú populačnú dynamiku, hodnotenú na základe rodokmeňov, mikrosatelitov a údajov mtDNA (Ceh & Dovic 2014).

4 Záver

Medzi chovateľmi psov je párenie príbuzných zvierat predmetom častých sporov. Niektorí používajú túto metódu často a bez rozdielu, iní sú toho názoru, že takáto činnosť vedie k úplnej degenerácii zvierat. Všeobecne sa predpokladá, že populácia je veľmi geneticky rôznorodá, ak je počet efektívnych zakladateľov a efektívnych predkov vysoký v porovnaní so skutočnou veľkosťou populácie.

Príbuzenské párenie má špecifické dôsledky, pozitívne aj negatívne. Po prvé, podporuje genetickú konsolidáciu populácie a stanovenie požadovaných genotypov. Zohráva pozitívnu úlohu vo fáze vývoja nového plemena. Po druhé, homozygotnosť podporuje manifestáciu a elimináciu nevýhodných génov, zvyčajne maskovaných dominantnými génmi. Po tretie, párenie vo vzťahu k elitnému predkovi sa často používa pri chove domácich zvierat, pretože akumulácia požadovaných génov vynikajúceho predka v jeho inbreednom potomstve prispieva k zlepšeniu produkčných vlastností. Je potreba si však uvedomiť nevýhodné javy súvisiace s príbuzenským párením, najmä javy ohrozujúce malú populáciu a populáciu pochádzajúcu z malého počtu predkov. K vyššie uvedeným účinkom príbuzenského párenia musíme pridať aj psychické poruchy, ktoré spočívajú v hyperaktivite alebo plachosti zvierat. Všetky doteraz spomenuté príznaky sú spojené nielen pôsobením nevýhodných génov, ale aj výrazným znížením genetických variácií v populácii. Nedostatok genetických variácií je kľúčovým problémom, ktorý vedie ako dlhodobý efekt k vyhynutiu daného plemena alebo druhu.

V situácii, keď neexistujú žiadne nepríbuzné zvieratá je však príbuzenské párenie oprávnené. U plemien malých populácií je potrebné podniknúť akékoľvek kroky vedúce k rozšíreniu ich chovnej základne. Jednotlivé zvieratá, aj keď sú elitné, sa nemusia používať príliš intenzívne. Niekedy sa pri chove vzácneho plemena oplatí vzdať sa vysokých požiadaviek na konkrétny znak, ak vďaka takémuto rozhodnutiu môžeme dosiahnuť zlepšenie v ostatných znakoch. Chovateľská politika v prípade plemien s malou populáciou nemusí byť príliš obmedzujúca.

U cicavcov je nevyhnutný určitý stupeň heterozygotnosti. Inak sú tieto zvieratá vysoko citlivé na environmentálne faktory. Veľa však závisí od intenzity príbuzenského párenia. Čím vyššia je, tým vyššia je pravdepodobnosť negatívnych dôsledkov a tým silnejšie sa môžu prejaviť. Účinky príbuzenského párenia sa navyše môžu líšiť v rôznych chovných líniiach alebo konkrétnych chovných staniach. Odporcovia inbreedingu zabúdajú, že nejde o ľudský koncept - svorka vlkov je malá rodina, v rámci ktorej dochádza k inbreedingu. Dlhodobé používanie inbreedingu však môže viesť k výskytu inbreednej depresie - klesá plodnosť a sila zvierat a zhoršuje sa ich fyzická a psychická sila.

Z uvedených štúdií a analýz je evidentné že k strate genetickej diverzity dochádza u všetkých spomenutých plemien psov. U málopočetných, alebo naopak veľmi často chovaných, populárnych plemien je táto strata výraznejšia ako u plemien, ktoré sú menej obľúbené. Ani jedna z uvádzaných metód analýzy úrovne inbreedingu a straty genetickej diverzity nie je dostačujúca. Aj keď nie je možné databázy doplniť spätne, do budúcnosti by sa situácia mohla zlepšiť zmenou evidencie chovaných jedincov. Ako ideálny koncept vidím úplné rodokmene so všetkými potrebnými údajmi doplnené o potrebné genetické testy,

sprevádzané nezávislými štúdiami a následnými zásahmi do chovu od vyškolených poradcov chovu chovateľských klubov. Táto forma by predstavovala zvýšené náklady pre chovateľské kluby aj pre samotných chovateľov, ale výsledky by mohli výrazne zlepšiť momentálnu situáciu viacerých plemien psov, niektoré dokonca zachrániť. Rovnako by som navrhovala individuálne zvažovať zaradenie heterozygotných prenášačov niektorých dedičných ochorení do chovu. Tomuto kroku by musela predchádzať štúdia a analýza, aby sa utvrdila či vyvrátila nutnosť jedincov používať v chove. Tiež by chovatelia mali dbať nie len na zachovanie exteriéru psov, ale aj na možný vplyv selekcie chovných jedincov na znižovanie genetickej variability pre dané plemeno. Vyhodnocovanie údajov o genotype polymorfných mikrosatelitných markerov je síce otázka posledných rokov, ale veda ide rýchlo vpred a je potrebné využiť všetky dostupné prostriedky pre elimináciu straty genetickej diverzity a pre zachovanie zdravia budúcich generácií všetkých plemien psov.

Vedecká hypotéza bola potvrdená, z literatúry vyplýva, že dochádza k strate genetickej diverzity.

5 Zoznam použitých zdrojov

Albrecht, T., Bryja, J., Hájková, P., Mikulíček, P., Zima, J., 2005. Genetická diverzita a metodické aspekty jejího výzkumu, in: Ukazatele Změn Biodiverzity. Academia.

Anna Letko, Katie M. Minor, Vidhya Jagannathan, Franz R. Seefried, James R. Mickelson, Pieter Oliehoek and Cord Drögemüller: Genomic diversity and population structure of the Leonberger dog breed, 2020, <https://doi.org/10.1186/s12711-020-00581-3>

Boccardo, Antonio, Stefano P. Marelli, Davide Pravettoni, Alessandro Bagnato, Giuseppe A. Busca, and Maria G. Strillacci. 2020. "The German Shorthair Pointer Dog Breed (*Canis lupus familiaris*): Genomic Inbreeding and Variability" *Animals* 10, no. 3: 498. <https://doi.org/10.3390/ani10030498>

Bryja J., P. Hájková, P. Janšta, J. Kirschner, M. Vinkler, B. Zemanová a J. Zima. Koncepce ochrany genetické diverzity planě rostoucích rostlin a volně žijících živočichů v České republice 2010.

Calboli, F. C., Sampson, J., Fretwell, N., Balding, D. J. 2008. Population structure and inbreeding from pedigree analysis of purebred dogs. *Genetics*. 179 (1). 593-601

Ceh, E., Dovc, P. 2014. Population structure and genetic differentiation of livestock guard dog breeds from the Western Balkans. *Journal of Animal Breeding and Genetics*. 131 (4). 313-325

Day, Stacey B., Bryant, Edwin H., and Meffert, Lisa M 2003. The influence of variable rates of inbreeding on fitness, environmental responsiveness and evolutionary potential, url: <https://doi.org/10.1554/02-713>

Ehrlich P. a A. Ehrlich. *Extinction: the causes and consequences of the disappearance of species*. New York: Balantine Book, 1983. ISBN 03-452-8895-5.

Falconer, D.S., 1960. *Introduction to quantitative genetics*. New York,: Ronald Press Co.

Francesca Cecchi, Gisella Paci, Andrea Spaterna & Roberta Ciampolini (2015) Morphological Traits and Inbreeding Depression in Bracco Italiano Dog Breed, *Italian Journal of Animal Science*, 14:3, 3721, DOI: 10.4081/ijas.2015.3721

Frankham, R., Briscoe, D.A., Ballou, J.D., 2002. *Introduction to Conservation Genetics*. Cambridge University Press.

Chloupek, O., 2008. Genetická diverzita, šlechtění a semenářství, Česká matice technická. ed. Academia, Praha.

Jansson M, Laikre L (2018) Pedigree data indicate rapid inbreeding and loss of genetic diversity within populations of native, traditional dog breeds of conservation concern. PLoS ONE 13 (9): e0202849. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0202849>

Jolanta Rozanska – Zawieja, Anna Nienartowicz – Zdrojewska, Marta Mucha, Zbigniew Sobek, Daniel Stanislawski, Maciej Gierdziewicz, Joanna Kania – Gierdziewicz: Evaluation of inbreeding and relationship coefficients in hovawart dogs and analysis of trends in coat colour changes, Ann. Anim. Sci., Vol. 13, No. 2 (2013) 253–262, DOI: 10.2478/aoas-2013-0007

Karolína Machová, Anita Kranjčevičová, Luboš Vostrý a Emil Krupa. Analysis of Genetic Diversity in the Czech Spotted Dog, 2020

Košnar J. 2001. Molekulární techniky přímé analýzy DNA - Metody: Analýza mikrosatelitů. Katedra botaniky PrF JU. available from: <https://botanika.prf.jcu.cz/laboratory/mikrosatelity.html> (accessed April 2021)

Kresovich S. a J. R. McFerson. Assessment and management of plant genetic diversity – consideration of intraspecific and interspecific variation. Field Crop Research, 1992.

Kriangwanich W, Nganvongpanit K, Buddhachat K, Siengdee P, Chomdej S, Ponsuksili S, Thitaram C. 2020. Genetic variations and dog breed identification using inter-simple sequence repeat markers coupled with high resolution melting analysis. Peer J 8:e10215 <http://doi.org/10.7717/peerj.10215>

Leroy, G. 2011. Genetic diversity, inbreeding and breeding practices in dogs: results from pedigree analyses. The Veterinary Journal. 189 (2). 177-182

Leroy, G., Rognon, X., Varlet, A., Joffrin, C., Verrier, E. 2006. Genetic variability in French dog breeds assessed by pedigree data. Journal of Animal Breeding and Genetics. 123 (1). 1-9

Reed D. H. and Richard Frankham. Correlation between Fitness and Genetic Diversity, 2003, <https://doi.org/10.1046/j.1523-1739.2003.01236>

Šípek, A. jr. 2004. Genetika - Biologie; Váš zdroj informací o genetice a biologii. Online. Available from: <http://www.genetika-biologie.cz> (accessed April 2021)

Virág Ács, Árpád Bokor and István Nagy 2019. Population Structure Analysis of the Border Collie Dog Breed in Hungary

Vladimir D.,Marko R.,Ljubodrag S.,Darko D.,Milivoje U.,Umit O. and Zoran S. (2020) Use of Microsatellites in Genetic Diversity Assessment, Parentage Testing and Individual Identification of the Kangal Shepherd Dog. *Acta Veterinaria*, Vol.70 (Issue 2), pp. 170-181. <https://doi.org/10.2478/acve-2020-0012>

Weir B. S., Sampling properties of gene diversity. In :*Plant population genetics, breeding and genetic resources*. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Ass. Inc. 1990

Yang Q, Chen H, Ye J, Liu C, Wei R, Chen C and Huang L (2019) Genetic Diversity and Signatures of Selection in 15 Chinese Indigenous Dog Breeds Revealed by Genome-Wide SNPs. *Front. Genet.* 10:1174. doi: 10.3389/fgene.2019.01174

6 Zoznam tabuliek

Tabuľka 1 - tabuľka nameraných hodnôt pre predpokladaný vek 12 rokov (Jansson & Laikre 2018).....	19
Tabuľka 1 - tabuľka nameraných hodnôt pre predpokladaný vek 12 rokov (Jansson & Laikre 2018).....	19
Tabuľka 2 - tabuľka nameraných hodnôt pre predpokladaný vek 6 rokov (Jansson & Laikre 2018).	20
Tabuľka 3 - tabuľka vývoja počtu jedincov plemena český strakatý pes v ČR (Machová et al. 2020).	25
Tabuľka 4 - tabuľka priemerov príbuzenského párenia (F) a priemernej príbuznosti (AR) v rodokmeni priradenom ku každej generácii (Machová et al. 2020).	27
Tabuľka 5 - tabuľka jednotlivých príbuzenských koeficientov v populáciách (Machová et al. 2020).	27
Tabuľka 6 - tabuľka hodnôt Hardy-Weinbergovej rovnováhy (HWE) v sledovanej populácii plemena Kangal (Vladimir 2020).	33
Tabuľka 7 - tabuľka genetických parametrov a rozsah nerovnovážnej väzby čínskych a západných populácií psov (Yang 2019).....	36

7 Zoznam grafov

Graf 1 - graf vývoja farebných variánt psov plemena hovawart v Poľsku (Jolanta et al. 2013).	24
Graf 2 - graf ukazujúci počet alel na mikrosatelit v 10 skúmaných lokusoch v populáciách plemena Kangal (Vladimir 2020).	32
Graf 3 - graf štatistík o dĺžkach nástupu homozygotnosti (ROH). A) Frekvencie a počty ROH pre každú triedu dĺžky; B) Vzťah medzi počtom a priemernou celkovou dĺžkou (Mb) ROH u každého psa; C) stredná dĺžka (Mb) pre každý chromozóm; D) Frekvencie ROH na chromozómoch.....	34