

Česká zemědělská univerzita v Praze  
Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů  
Katedra genetiky a šlechtění



**Variabilita D-smyčky mtDNA a gonozomálních SSR  
lokusů u plemen psů odvozených ze záměrných křížení s  
vlkem obecným (*Canis lupus L.*)**

Diplomová práce

Autor práce: Bc. Petra Prokešová

Vedoucí práce: doc. Dr. Ing. Pavel Vejl

### Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "**Variabilita D-smyčky mtDNA a gonozomálních SSR lokusů u plemen psů odvozených ze záměrných křížení s vlkem obecným (*Canis lupus L.*)**" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušil autorská práva třetích osob.

V Praze dne \_\_\_\_\_

## **Poděkování**

Touto cestou bych chtěla poděkovat doc. Dr. Ing. Pavlu Vejlovi za odborné vedení, rady, podporu a věcné připomínky při zpracování diplomové práce. Dále bych chtěla poděkovat Ing. Daniele Čílové, Mgr. Martině Melounové, Ph.D. a Ing. Jakubovi Vaškovi, Ph.D. za cenné rady a pomoc při zpracování experimentální části této diplomové práce. A především bych chtěla vyjádřit dík mé rodině, která mě při studiu plně podporovala.

# **Variabilita D-smyčky mtDNA a gonozomálních SSR lokusů u plemen psů odvozených ze záměrných křížení s vlkem obecných (*Canis lupus L.*)**

## **Souhrn**

V rámci diplomové práce byla posuzována variabilita D-smyčky mtDNA a SSR lokusů u plemen psů odvozených ze záměrných křížení s vlkem obecným (*Canis lupus L.*).

První částí diplomové práce je část teoretická, pojednává o popisu historie rodiny psovitých, původu a domestikaci psa domácího, popisu vlka obecného. Je zde rozebírána problematika křížení psa a vlka a vzniku těchto kříženců, Saarloosova vlčáka a československého vlčáka. V dalších kapitolách je nastíněno dělení a vlastnosti genetických markerů, které jsou využívány v praktické části. Konkrétně se jedná o mitochondriální DNA a mikrosatelitní DNA. Také byla popsána problematika fylogenetiky a tvorba kladogramů na základě jednotlivých metod.

V praktické části této práce byla hodnocena variabilita genetických markerů u plemen psů, vlků a jejich vzájemných kříženců. Do analýzy bylo zahrnuto 539 jedinců plemene československý vlčák a 42 jedinců plemene Saarloosův vlčák. Pro studium variability haplotypů D-smyčky mtDNA byly sekvenční analýzy provedeny u zástupců dalších 24 plemen, která nemají svůj původ odvozen ze vzájemného křížení psa a vlka. Databáze haplotypů získaných při řešení diplomové práce byla doplněna ještě o sekvence D-smyčky mtDNA u dalších plemen a zástupců vlků a kojota pocházející z mezinárodní nukleotidové databáze NCBI. Důležitým krokem byla optimalizace metod všech analýz. Jednalo se o izolaci DNA z bukálních sliznic, navržení vhodných primerů a optimalizace metod PCR-RFLP. Vzhledem k tomu, že u plemene československý vlčák byly identifikovány dva haplotypy, byl navržen PCR-RFLP marker, který je dokázal vzájemně spolehlivě odlišit. Při řešení diplomové práce byly na základě studia D-smyčky mtDNA pomocí programu MEGA6 sestaveny kladogramy vyjadřující sekvenční či evoluční podobnosti jednotlivých haplotypů. Na základě čtyř vybraných mikrosatelitních markerů byla zvolena vhodná metoda a následně byla provedena identifikace gonozómu Y.

Z výsledků vyplývá, že ani u jednoho ze současných zástupců plemen československý a Saarloosův vlčák se nevyskytují mitochondrie pocházející ze samice vlka. Statistickým a bioinformatickým porovnáním získaných sekvencí bylo identifikováno celkem

17 haplotypů. Na základě genealogické studie propojené s molekulárními sekvenčními analýzami D-smyčky mtDNA u potomků po mateřské linii byla potvrzena stabilita sekvencí. U všech zkoumaných potomků byl identifikovaný zcela identický haplotyp. Byla potvrzena hypotéza, že pomocí mikrosatelitních markerů lokalizovaných na heterologní části gonozómu Y lze identifikovat původ gonozómu Y (psí nebo vlčí) u plemene československý vlčák. Tyto rozdíly byly potvrzeny dvěma SSR markery, které se lišily 2 bp. U plemene Saarloosův vlčák bylo zjištěno, že existuje pouze jediný donor gonozómu Y – německý ovčák.

**Klíčová slova:** *Canis lupus familiaris* L., *Canis lupus* L., pes, vlk, křížení, mtDNA, D-smyčka, gonozómy, SSR markery

# **Variability of mtDNA D-loop and Gonosomal SSR Loci in Dog Breeds Derived from Deliberate Crossbreedings with Wolves (*Canis lupus L.*)**

## **Summary**

In this work the variability of mtDNA D-loop and SSR loci in dog breeds derived from deliberate crossbreedings with wolves (*Canis lupus L.*) was assessed.

The first part of this work is theoretical and deals with description of the canid family history, origin and domestication of the dog, description of the wolf. There is analyzed the issue of dog crossbreeding with wolf and creation of these hybrids, Saarloos wolfdog and czechoslovakian wolfdog. In next chapters there are described the division and characteristics of genetic markers that are used in the practical part. Specifically, the mitochondrial DNA and the microsatellite DNA. Also there is discussed the issue of phylogenetics and cladogram creation based on different methods.

In the practical part of this work variability of genetic markers in dog breeds, wolves and their hybrids was evaluated. The analysis included 539 individuals of czechoslovakian wolfdog and 42 individuals of Saarloos wolfdog. To study the variability of haplotypes mtDNA D-loop sequencing analyses in representatives of 24 other dog breeds that have their origin derived from crossing of dog and wolf were performed. Haplotype database obtained from diploma work was complemented by sequences of mtDNA D-loop in other breeds and representatives of wolves and coyote from international nucleotide database NCBI. An important step was the optimization of analytic methods. It was the isolation of DNA from buccal mucosa, the design of appropriate primers and the optimization of PCR-RFLP method. According to identification of two haplotypes in czechoslovakian wolfdog, it was designed PCR-RFLP marker which is able to reliably distinguish each other. Based on study of the mtDNA D-loop by using MEGA6 programme the cladograms expressing sequential or evolutionary similarity of individual haplotypes were compiled. Based on the four selected microsatellite markers the suitable method was chosen and identification of gonosome Y was performed subsequently.

The results show that not a single one of the present czechoslovakian and Saarloos wolfdog representatives occur mitochondria derived from the female wolf. 17 haplotypes were identified by statistical and bioinformatical comparison with the obtained sequences.

Sequences stability was confirmed based on genealogical studies connected with molecular sequential analysis of mtDNA D-loop in the maternal line offsprings. Completely identical haplotype was identified for all the studied offsprings. We confirmed the hypothesis that by using microsatellite markers located on heterologous gonosome of Y can be identified the origin of gonosome Y (dog or wolf) in czechoslovakian wolfdog. These differences were confirmed by two SSR markers that differed in 2 bp. In Saarloos wolfdog it was found that there is only one gonosome Y donor – German shepherd.

**Keywords:** *Canis lupus familiaris* L., *Canis lupus* L., dog, wolf, breeding, mtDNA, D-loop, gonosomes, SSR markers

# Seznam příloh

Příloha 1: Vlk obecný (*Canis lupus* L.)

Příloha 2: Československý vlčák

Příloha 3: Saarloosův vlčák

Příloha 4: Složení pufrů použitých pro gelovou elektroforézu



# Obsah

1	Úvod .....	13
2	Vědecké hypotézy a cíle práce .....	14
2.1	Vědecké hypotézy .....	14
2.2	Cíle práce .....	16
3	Literární rešerše .....	17
3.1	Psovité šelmy .....	17
3.1.1	Vlk obecný ( <i>Canis lupus L.</i> ) .....	18
3.1.2	Pes domácí a domestikace .....	19
3.1.3	Hybridizace .....	20
3.1.4	Charakteristika plemen vzniklých hybridizací vlka a psa .....	22
3.1.5	Genom psa .....	24
3.2	Genetické markery a jejich dělení .....	24
3.2.1	Repetitivní DNA .....	25
3.2.2	Mitochondriální DNA .....	28
3.3	Polymerázová řetězová reakce (PCR) .....	31
3.4	Fylogenetika .....	33
3.4.1	Fylogenetická analýza .....	33
3.4.2	Konstrukce fylogenetických stromů .....	34
3.4.3	Metody konstrukce fylogramu .....	35
4	Materiály a metodika .....	37
4.1	Výběr plemen psů odvozených od záměrného křížení <i>Canis lupus familiaris</i> x <i>Canis lupus lupus</i> .....	37

4.1.1	Výběr plemen a počty hodnocených jedinců .....	37
4.1.2	Studium rodokmenů zástupců plemen československý vlčák a Saarloosův vlčák	39
4.2	Izolace DNA a hodnocení její kvality a kvantity.....	39
4.2.1	Izolace genomické DNA.....	39
4.2.2	Stanovení kvality a kvantity izolované DNA .....	39
4.3	Metody studia variability D-smyčky mtDNA .....	40
4.3.1	Amplifikace D-smyčky mtDNA u rodu <i>Canis</i> .....	40
4.3.2	Elektroforetické ověření výsledků amplifikace .....	41
4.3.3	Sekvence amplikonů D-smyčky mtDNA.....	42
4.3.4	PCR-RFLP metoda umožňující odlišit některé haplotypy D-smyčky mtDNA u plemen československý vlčák a Saarloosův vlčák .....	44
4.4	Metody studia mikrosatelitních lokusů lokalizovaných na gonozómu Y.....	47
4.4.1	Výběr SSR lokusů.....	47
4.4.2	Sekvence použitých primerů a první amplifikace.....	47
4.4.3	Sekvence primerů umožňující značení fragmentů a druhá amplifikace .....	50
4.4.4	Příprava vzorků amplifikovaných SSR markerů gonozómu Y pro fragmentační analýzu	52
4.4.5	Podmínky fragmentační analýzy multiplex-SSR markerů .....	53
4.5	Bioinformatické a statistické zpracování získaných molekulárních dat.....	53
4.5.1	Konstrukce rodokmenů.....	53
4.5.2	Porovnání získaných sekvencí D-smyčky mtDNA.....	54
4.5.3	Konstrukce kladogramů na základě sekvenčních polymorfismů D-smyčky mtDNA.....	54
5	Výsledky.....	56

5.1	Kvalita a kvantita izolované DNA.....	56
5.2	Variabilita D-smyčky mtDNA.....	56
5.2.1	Identifikované haplotypy D-smyčky mtDNA.....	56
5.2.2	Původ mtDNA u plemen odvozených na základě křížení psa a vlka .....	56
5.2.2.2	Saarloosův vlčák .....	60
5.2.3	Konstrukce kladogramů na základě sekvencí D-smyčky mtDNA .....	61
5.3	Variability mikrosatelitních markerů lokalizovaných na gonozómu Y.....	73
5.3.1	Identifikované haplotypy mikrosatelitních markerů gonozómu Y u plemen odvozených na základě křížení psa a vlka.....	73
5.3.2	Vztah mezi haplotypy a původem gonozómu Y u plemene československý vlčák .....	73
5.3.3	Vztah mezi haplotypy a původem gonozómu Y u plemene Saarloosův vlčák.....	73
5.3.4	Vztah mezi haplotypy a původem gonozómu Y u vlka a kříženců vlka a psa .....	74
6	Diskuze.....	77
6.1	Volba plemen určených pro genetické analýzy .....	77
6.2	Metody izolace DNA.....	78
6.3	Sekvenční polymorfismus mitochondriálních markerů.....	78
6.4	Hodnocení variability markerů D-smyčky mtDNA pomocí kladogramu .....	80
6.5	Hodnocení variability markerů D-smyčky mtDNA .....	80
6.6	Mikrosatelitní markery lokalizované na gonozómu Y .....	81
6.6.1	Optimalizace metody detekce alel mikrosatelitních markerů .....	81
6.6.2	Alely detekované pomocí SSR .....	81
6.6.3	Identifikace gonozómu Y u plemene československý vlčák .....	82
6.6.4	Identifikace gonozómu Y u plemene Saarloosův vlčák.....	82

6.6.5	Identifikace gonozómu Y u vlka.....	83
7	Závěr.....	84
8	Seznam literatury.....	87
9	Seznam použitých zkratek.....	99
10	Seznam tabulek.....	100
11	Seznam obrázků.....	101
12	Přílohy .....	103

# 1 Úvod

Pes domácí (*Canis lupus familiaris* L.) je považován za jedno z prvních domestikovaných zvířat, u něhož tento proces započal asi před 15 000 lety. Původním místem domestikace psa je podle většiny autorů přiřazováno Asii. Dnes je již potvrzeno, že jediným předkem psa je vlk obecný (*Canis lupus* L.). Člověka pes doprovází dlouhá léta a cílenou genetickou selekcí bylo dosaženo velké variability v různých vlastnostech, a proto je v dnešní době známo více jak 400 plemen psů. Hodnocení této variability je založeno na použití genetických markerů, které jsou vysoce polymorfní. Pro genetickou analýzu se využívá zkoumání polymorfismu DNA, a to hlavně mitochondriální a mikrosatelitní DNA.

Mitochondriální DNA vykazuje cytoplazmatickou dědičnost a je tedy využívána pro zkoumání příbuzenských vztahů po maternální linii. Tato analýza je založena na variabilitě tzv. D-smyčky (hypervariabilní úsek mtDNA), která se u psů nachází mezi 15 458. až 16 727. nukleotidem. Mikrosatelity jsou krátké tandemově se opakující genomové sekvence, které se využívají pro zjištění paternity a příbuzenských vztahů v dané populaci. Tyto genetické markery mohou být snadno amplifikovány polymerázovou řetězovou reakcí (PCR).

Princip paternity a maternity je založen na základě zákonů Mendelistické dědičnosti. Každý jedinec zdědí od svých rodičů alely, pokud se však u potomka daná alela nevyskytuje, je vhodné uvažovat, zda je rodič opravdu rodičem. Pro potvrzení nebo vyvrácení daného zjištění je nutno vyhodnotit data získaná analýzou více mikrosatelitních lokusů. Touto analýzou můžeme také zjistit a porovnat fylogenetický původ jedince a vztahy mezi populacemi. Vztahy mezi jedinci či populacemi lze vyjádřit graficky pomocí kladogramů, které jsou konstruovány na základě algoritmů různých statistických metod.

V této diplomové práci byla zkoumána variabilita D-smyčky mtDNA a SSR lokusů u plemen psů odvozených ze vzájemného křížení s vlkem obecným (*Canis lupus* L.). A to hlavně u plemen československý vlčák a Saarloosův vlčák.

## 2 Vědecké hypotézy a cíle práce

### 2.1 Vědecké hypotézy

Na začátku řešení diplomové práce jsem si na základě studia vědecké literatury zvolila následující vědecké hypotézy:

- Pes domácí patří mezi jedno z nejdéle domestikovaných domácích zvířat a lze tudíž předpokládat, že budou existovat genetické rozdíly mezi ním a vlkem (*Canis lupus* L.). Existují plemena psů, která vznikla ve 20. století na základě záměrného křížení mezi psem domácím a vlkem. Lze předpokládat, že u těchto plemen se bude vyskytovat určitý podíl genomu vlka.
- Plemena, která takto vznikla, jsou československý vlčák a Saarloosův vlčák, kde na základě záměrné plemenitby je udržován podíl genomu vlka v rozmezí 28 – 32 %. Lze tudíž hypoteticky předpokládat, že v genomu zástupců těchto plemen se mohou nacházet sekvence DNA charakteristické pro vlka.
- Problematika křížení ferálních populací psů a vlků je aktuálně studována. Variabilita záměrně vytvořených kříženců psa a vlka může hypoteticky představovat vhodný model pro genetické studie těchto křížení.
- D-smyčka mtDNA představuje sekvenci charakteristickou výskytem neutrálních mutací vykazujících matroklinní dědičnost. Variabilita D-smyčky mtDNA je používána v celé řadě populačních studií u psovitých šelem a lze ji teoreticky použít i při hodnocení genetické variability cytoplazmy plemen odvozených ze záměrného křížení psa a vlka.
- Vzhledem k matroklinní dědičnosti D-smyčky mtDNA je možné charakterizovat každého hodnoceného jedince z hlediska haplotypu, který odpovídá fenám – zakladatelkám plemene. Pokud jsou známy úplné rodokmeny jedinců plemene československý a Saarloosův vlčák, je možné na základě molekulárních analýz vyhodnotit stabilitu mutací D-smyčky mtDNA u současných reprezentantů obou plemen.
- Nejpřesnější metodou pro charakterizaci mutací vyskytujících se v D-smyčce mtDNA je přímá sekvenace PCR amplikonů, které vznikly při použití primerových párů umístěných do konzervativních sekvencí mtDNA. Na základě těchto sekvencí lze identifikovat haplotypy, které jsou definovány jako sekvence D-smyčky mtDNA, které mají v rámci jednoho haplotypu vždy identicky se vyskytující mutace.

- Variabilitu haplotypů D-smyčky mtDNA lze hodnotit na základě statistických a bioinformatických metod například formou kladogramů, které vykazují sekvenční podobnosti a potenciální evoluční vztahy mezi hodnocenými haplotypy. Lze předpokládat, že různé typy statistického – kladistického vyhodnocení využívají různé matematické algoritmy a tudíž i vytváření větví v kladogramech získaných různými metodami může být odlišné.
- Hypoteticky lze předpokládat, že jedno plemeno, které vzniklo použitím více fen zakladatelek, může být charakteristické větším počtem haplotypů i u současných představitelů plemen. Pokud rozdíly mezi haplotypy D-smyčky mtDNA budou způsobovat vznik nebo ztrátu palindromatické sekvence rozpoznávané restriční endonukleázou, lze navrhnout PCR-RFLP marker, který umožní tyto haplotypy vzájemně odlišit bez nutnosti sekvenačních analýz.
- Pokud jsou u plemen odvozených ze záměrného křížení psa a vlka známe kompletní rodokmeny, lze identifikovat i původní donory gonozómu Y, který se nachází u současných psů. Hypoteticky lze předpokládat, že existují mikrosatelitní markery lokalizované na heterologní části gonozómu Y, které umožní odlišit gonozóm Y psiho a vlčího původu.
- Variabilita mikrosatelitních markerů je způsobena rozdílným počtem tandemově se opakujících motivů. V současné době existují techniky kapilární elektroforézy, které jsou schopny spolehlivě odlišit i jednonukleotidové rozdíly mezi porovnávanými fragmenty DNA. Tyto techniky lze použít pro hodnocení polymorfismů mikrosatelitních markerů.

## 2.2 Cíle práce

Cíle práce vycházejí z konkrétních experimentů, které byly použity pro potvrzení nebo vyvrácení hypotéz uvedených v předcházející kapitole. Cíle práce lze charakterizovat následujícími body:

1. Izolovat vysokomolekulární DNA od vybraných zástupců plemen československý vlčák, Saarloosův vlčák, referenčních genotypů vlka a některých křížení F<sub>1</sub> generace mezi psem domácím a vlkem.
2. Optimalizovat metodu PCR amplifikace v oblasti D-smyčky mtDNA s pomocí publikovaných primerů nasedajících do konzervativních sekvencí mtDNA.
3. Na základě studia rodokmenů plemen československý a Saarloosův vlčák identifikovat u současných představitelů plemen jednotlivé haplotypy mtDNA odpovídající fenám zakladatelkám.
4. Optimalizované PCR markery D-smyčky mtDNA aplikovat na vybrané zástupce předem definovaných potenciálních haplotypů a vyhodnotit jejich polymorfismus.
5. Pro získání dalších dat nutných pro statistické, bioinformatické a kladistické vyhodnocení aplikovat PCR markery D-smyčky mtDNA na další plemena psů, která nejsou odvozena ze záměrného křížení psa a vlka.
6. Bioinformatické vyhodnocení získaných sekvencí D-smyčky mtDNA, nalezení polymorfismů a posouzení sekvenční popřípadě evoluční podobnosti pomocí kladogramů.
7. U plemene československý vlčák navrhnout PCR-RFLP marker, pomocí kterého lze hodnotit variabilitu haplotypů D-smyčky mtDNA.
8. Na základě studia rodokmenů plemen československý a Saarloosův vlčák identifikovat u současných představitelů plemen jednotlivé haplotypy na základě původu gonozómu Y.
9. Optimalizovat mikrosatelitní markery lokalizované na gonozómu Y s cílem nalézt takové markery, které u plemene československý vlčák umožní odlišit gonozóm Y pocházející od německého ovčáka a vlka.



## 3 Literární rešerše

### 3.1 Psovité šelmy

Za první předky všech šelem se považují *Creodonti* (Zack, 2012; Šebková, 2001). Heinrich et al. (2012) uvádějí, že je za společného předka psovitých šelem považován *Miacis*, který je společným předkem vlků, šakala a kojota. *Miacis* svou velikostí a stavbou těla připomínal lasici a chrupem psovitou šelmu. Pravděpodobně vyhynul před 20 miliony lety př. n. l. Za tzv. nejstaršího prapsa je uváděn *Tomarktus*, kterého popsal v roce 1873 Cope. Avšak dnes je již známo, že na přímém vývoji psa domácího nemá zásluhu, jelikož se jednalo o slepou vývojovou větev. Wang (1993) uvádí jako předka psa *Leptocyona*.

Vilà et al. (1997) publikovali, že moderní rodina carnivorů vznikla před 40-50 miliony lety. Údaje DNA hybridizace potvrzují, že se řád *Carnivora* dělí do dvou sesterských rodin, *Caniformia* a *Feliformia*. První sesterská rodina *Caniformia* zahrnuje psovité (*Canidae*), skunkovité (*Mephitidae*), lasicovité (*Mustelidae*), medvídkovité (*Procyonidae*), medvědovité (*Ursidae*), a tři rodiny mořských savců (tuleňovité *Phocidae*, lachtanovité *Otariidae*, mrožovité *Odobenidae*). Druhá sesterská rodina *Feliformia* zahrnuje kočkovité (*Felidae*), cibetkovité (*Viverridae*), promykovité (*Herpestidae*) a hyenovité (*Hyaenidae*).

Podle Ruvinskeho a Sampsona (2001) řadíme do rodu *Canis* šakala pruhovaného (*Canis adustus*), šakala obecného (*C. aureus*), kojota (*C. latrans*), vlka obecného (*C. lupus*), šakala čabrakového (*C. mesomelas*), vlka rudohnědého (*C. rufus*), vlčka etiopského (*C. simensis*) a psa domácího (*C. lupus familiaris*).

Parra et al. (2008) uvádějí, že rozdíly pozorované v mtDNA znamenají, že všichni psi pocházejí ze společného genofondu. Srovnání sekvence mtDNA mezi druhy *Canis* naznačují, že psi pocházejí z vlků. Jaderné markery podporují blízký vztah psů a vlků (Vilà et al., 1997; Savolainen et al., 2000; Pang et al., 2009; Parker, 2012). Moderní analýza mitochondriální DNA ukazuje, že vlk šedý (*Canis lupus*) byl jediným předkem moderních psů (Boyko, 2011). Analýza mtDNA ukázala, že DNA domestikovaných psů a šedých vlků se liší pouze v 0,2 % (Ostrander et al., 2000). Galibertova et al. (2011) studie ukázala, že pes a vlk sdílejí 98 % mitochondriální DNA, která kontrastuje s 7,5% rozdílem mezi vlkem a kojotem (*Canis latrans*), druhem, který je jejich nejbližší divoký příbuzný.

### 3.1.1 Vlk obecný (*Canis lupus* L.)

**Říše:** *Animalia*

**Kmen:** *Chordata*

**Třída:** *Mammalia*

**Řád:** *Carnivora*

**Čeleď:** *Canidae*

**Rod:** *Canis*

(Zdroj: biolib.cz)

Vlk (*Canis lupus* L.) je nejrozšířenějším velkým masožravcem v Evropě (Baltrūnaite et al., 2012; Randi et al., 2011). Vlci byli rozšířeni po celém kontinentu, žili na různých stanovištích od tundry až po stepi a pouště. Během 18. a 19. století byli však postupně vyhubeni a to hlavně v celé západní Evropě, přežili zde pouze jedinci v Ibérii a Itálii. V současné době čítá populace vlků v Evropě 18000 – 20000 jedinců (Hindrikson et al., 2012; Randi et al., 2011). Sundqvist et al. (2001), Vilà et al. (2003) zjistili, že populace skandinávských vlků dosahuje cca 100 jedinců. Sundqvist et al (2001) a Godinho et al. (2011) uvádějí, že vlci se dnes vyskytují kromě Evropy také v Severní Americe, na Blízkém východě a v Asii.

Vlci jsou velmi mobilní a obývají rozsáhlá teritoria. Mladí jedinci obou pohlaví jsou schopni se rozptýlit na více než stovky kilometrů (Randi, 2011). Baltrūnaite et al. (2013) uvádějí, že jejich rozšíření je nerovnoměrné, s poloizolovanými populacemi měnicích se ve velikostech od méně než padesáti po několik tisíc jedinců. Dle Hindrikson et al. (2012) přetrvávají malé a roztříštěné populace, ale často jen v přítomnosti velkého množství psů, kteří zvyšují potenciál pro jejich hybridizaci.

Pilot et al. (2010) analyzovali fylogenetické vztahy a geografické rozložení haplotypů mtDNA 947 současných evropských vlků. Srovnávali také sekvence současných vlků s publikovanými sekvencemi starověkých evropských vlků. Zjistili, že haplotypy představující dvě haploskupiny se překrývají geograficky, ale podstatně se liší, co do četnosti mezi populacemi z jihozápadní a východní Evropy. Srovnání mezi haplotypy z Evropy

a dalších kontinentů ukázalo, že obě haploskupiny jsou rozšířeny po celé Euroasii, zatímco pouze haploskupina 1 se vyskytuje u současných severoamerických vlků. Všechny vzorky starých vlků ze západní Evropy, které se datují mezi 44 000 a 1 200 lety př. n. l., patřily k haploskupině 2, což naznačuje dlouhodobou převahu této haploskupiny v oblasti. Kromě toho, porovnání současných a minulých frekvencí a distribucí obou haploskupin v Evropě naznačují, že haploskupina 2 převažovala nad haploskupinou 1 v průběhu několika posledních tisíc let. Paralelní náhrada haploskupiny, haploskupina 2 je zcela nahrazena haploskupinou 1, byla hlášena u severoamerických šedých vlků. Na základě výzkumu Pilot et al. (2010) rozdělili vlky východní Evropy do deseti podpopulací (na základě 257 bp kontrolní oblasti) a k podpopulacím s relativně nízkou rozmanitostí haplotypů následně přiřadili jednotlivé země - Litvu, Lotyšsko, Bělorusku, východní Polsko, severní Ukrajinu a západním Rusko. Podobných výsledků dosáhli také Baltrūnaite et al. (2012).

### **3.1.2 Pes domácí a domestikace**

Fenotypová a genotypová rozmanitost psů jasně ukazuje, že pes domácí (*Canis lupus familiaris* L.), považovaný za první domestikované zvíře, pochází z populace vlka obecného (*Canis lupus* L.), vysoce mobilního a přizpůsobivého masožravce, který byl před několika staletími rozšířen po celé Holarktidě (Vilà et al., 1997; Wayne a Ostrander, 1999; Savolainen et al., 2000; Rokas et al., 2003; Parker et al., 2004; Boyko et al., 2011; Wade, 2011).

Nejstarší fosilie psa jsou tvořeny dvěma lebkami z naleziště v Eliseyevichi (Centrální Ruská planina před 13 - 17 000 př. n. l.) a čelistí z naleziště v Oberkasselu (Německo, 14 000 př. n. l.). Kostí vlků a raných hominidů byly nalezeny společně na několika místech, jako jsou Zhoukoudian na severu Číny datované 300 000 let př. n. l. nebo jeskyně Lazaret na jihu Francie datované 150 000 let př. n. l. Tyto nálezy neprokazují, že by domestikace již byla přítomna, ale naznačují, že lidé a vlci zřejmě sdíleli stejné území a žili v blízkém kontaktu.

Z nálezů velkých fosilií psovitých je zřetelná odlišnost od posledních vlků, pravděpodobně připomínajících prehistorické psy. Tento pes je identifikován jako Paleolitický pes (Lindblad-Toh et al., 2005; Germonpré et al., 2009). Nález z jeskyně Goyet byl totožný s nálezem v jeskyni Chauvet (26 000 př. Kr.) a Mezhirich na Ukrajině (15 000 př. Kr.), kde ho identifikovali jako prehistorického psa. Tyto výsledky naznačují, že domestikace psa byla již zahájena během období Aurignacian. Nicméně ne všichni jsou o tomto zjištění přesvědčeni (Druzhkova et al., 2013) a diskutuje se, že v této rané době nebyli hominidé ještě schopni provádět proces domestikace. Lze spíše předpokládat, že vlci

byli v rámci hledání potravy přitahováni k lidským příbytkům, kde mohli najít zbytky, a tak si postupně zvykli na přítomnost lidí. Lidé lovci, také pravděpodobně zabíjeli vlky hledající potravu okolo táborů a jejich kůži používali jako oblečení. Někdy se také starali o štěňata, která si zvykla na rodinu a zkrotla. Tito ochočení vlci byli vzdáleni mnoho generací od pravých domestikovaných psů, ale byli pravděpodobně jejich předchůdci.

Galibert et al. (2011) uvádějí, že domestikace psa začala pravděpodobně velmi brzy během období mladého paleolitu, tedy mnohem dříve, než domestikace jakéhokoli jiného zvířete či rostliny. Tento časný proces, pravděpodobně neuvědomělý, se nazývá proto-domestikace, aby se odlišil od skutečné domestikace, která se datuje kolem 14 000 př. n. l. Oskarsson et al. (2011) na základě analýzy mtDNA datují proces domestikace na 10 000-16 000 př. n. l.

Podle Galiberta et al. (2011) ukázaly nedávné analýzy genomické DNA, že domestikace začala na Blízkém Východě a šířila se rychle do všech lidských populací. Tuto teorii potvrzuje i Li et al. (2012) a Druzhkova et al. (2013). Avšak Wang et al. (2011) publikovali, že původním centrem domestikace psa je jihovýchodní Asie. Dle Oskarssona et al. (2012) je to přesně jižní Čína. Ding et al. (2012) uvádějí, že archeologické nálezy přiřazují původ Evropě nebo v Jihovýchodní Asii nebo dokonce více oblastem.

Mezi mnoha druhy živočichů, které byly domestikovány, drží psi první místo. Domestikace je dlouhý proces, během kterého jsou lidé selekcí zvířat pro budoucí křížení schopni upravit řadu fyziologických a behaviorálních vlastností, generace po generaci (Galibert et al., 2011; Jensen, 2006). Gagliardi et al. (2011), Parker et al. (2004) uvádějí, že většina psích plemen se vyvinula v průběhu 19. století. Na rozdíl od ostatních domestikovaných zvířat má rychlá fenotypová selekce za následek vznik mnoha různých plemen. Silný selekční tlak, který byl použit k rozvoji různých plemen, vedl ke ztrátě genetické variability v rozsahu, který se liší v závislosti na historii plemene a na použitém postupu plemenitby. Různé genetické markery jsou použity pro analýzu genetického polymorfismu a heterozygotnosti psích plemen. Tyto markery vykazují vysoký stupeň polymorfismu, náhodné distribuce v genomu a neutrality s ohledem na selekci.

### **3.1.3 Hybridizace**

Muñoz-Fuentes et al. (2010) uvádějí, že hybridizace mezi divokými canidy a psy domácími se vyskytuje jen ojediněle. Přítomnost haplotypu mtDNA psa domácího u kojotů (*Canis latrans*) se vyskytuje pravděpodobně v důsledku přítomnosti pouze mladých samců kojotů, kteří vyrážejí na lov. Přítomnost hybridů ve velmi roztráštěné a malé populaci vlka

etiopského (*Canis simensis*) vyplývá z křížení samic vlka a samců psa (Anderson et al., 2002; Muñoz-Fuentes et al., 2010).

Muñoz-Fuentes et al. (2010) ve své práci zjistili, že poklesy populace vlků způsobené lidmi mohou nastavit podmínky pro hybridizaci mezi divokými vlky a psy domácími. Není známo, zda přítomnost mtDNA psa u těchto vlků může mít fenotypový efekt, ale přesto ukazuje na možnost, že samci vlků a samice psů mohou produkovat potomstvo, které se za určitých okolností může zpětně křížit do divoké populace vlků.

Sindičić et al. (2011) publikovali, že vlk a pes mají shodné karyotypy, mohou se křížit a produkovat plodné potomstvo. Jejich interakce se může pohybovat od formy predátor-kořist po vzájemné soužití, což může vést k hybridizaci. Anderson et al. (2002) uvádějí, že hybridizace má potenciál přinést morfologické, fyziologické a behaviorální změny u canidů žijících v zajetí nebo volně. Zatímco se linie psa a vlka v případě analýzy jaderných genů oddělují špatně, tak při analýze mitochondriální DNA jsou linie jasně rozlišitelné a díky tomu lze dobře vyhodnotit rozdíly mezi těmito druhy (Sindičić et al., 2011).

Hindrikson et al. (2012) publikovali, že nejčastějším případem je hybridizace mezi samicemi vlka a samci psa. Avšak tento tým ve své studii odhalil první důkazy páření mezi samci vlka a samicemi psa v Evropě. Godinho et al. (2011) uvádějí, že hybridizace mezi volně žijícími druhy a jejich domácími protějšky může představovat hlavní hrozbu přírodních populací. Ve skutečnosti šíření „domestikovaných genů“ do přirozených populací může narušit místní přizpůsobení nebo zvýšit genetickou homogenizaci, případně může vést k vyhynutí druhů přes introgresivní hybridizaci. Kromě toho nerovnováha mezi počtem populace domestikovaných a divokých forem může usnadnit jednosměrný tok genů a naznačuje, že hybridizace je vážnou hrozbou pro genetické integrity přírodních populací.

Randi a Lucchini (2000) zjistili, že v Itálii počet volně žijících psů převyšuje počet vlků. Je tedy možné, že tato nerovnováha, společně s nízkou hustotou a rozlišitelností vlčí populace, zvyšuje riziko hybridizace se psy. Bohužel vysoká genetická podobnost psů a vlků odhaluje hybridy obtížně, což může vysvětlovat, proč je důkazů hlášení výskytu hybridních vlků v Evropě málo a význam této problematiky pro ochranu vlků zůstává do značné míry neznámý.

Vilà et al. (2003) ve své práci potvrdili přítomnost F1 hybridů vzniklých křížením samic vlka a samců psa ve velmi malé a nedávno znovu obnovené skandinávské populaci. Bylo potvrzeno, že mtDNA psa se neintrodukovala do žádné vlčí populace. To naznačuje, že je hybridizace buď asymetrická nebo že samice F1 hybridů se mtDNA psa se nemnoží, jelikož nepřežijí do dospělosti nebo že nejsou schopny se socializovat do vlčí populace (Vilà

et al., 1997; Randi et al., 2000). Vilà et al. (1999b) uvádějí, že v Itálii a Španělsku se mohou vlci obecní křížit s polodivokými populacemi domestikovaných psů. Takové hybridizace mohou opravdu ohrozit genetickou integritu divokých populací vlků, ačkoli četnost výskytu nemusí být tak vysoká jak se dříve myslelo.

Vilà et al. (1997), Randi et al. (2000) zjistili, že nukleotidová sekvence hypervariabilní části kontrolní oblasti mtDNA definuje haplotypy, které jsou ve většině populací evropských vlků různé, a nejsou sdíleny žádným z dosud studovaných plemen. Haplotypy kontrolní oblasti mtDNA mohou být použity jako maternální genetické markery pro detekci hybridizace vlk-pes. Randi et al. (2000) použili panel mitochondriálních lokusů psa, hypervariabilní biparentální genetický marker, který může být použit pro identifikaci jednotlivých genotypů vlka a psa a pro detekci případů hybridizace a introgrese genu.

Podle Hindriksona et al. (2012) znamená zvyšující se počet domestikovaných zvířat doprovázející lidi, že potenciál pro hybridizaci mezi divokými a blízce příbuznými domestikovanými zvířaty se zvyšuje. Existuje stále více důkazů, že se mnoho živočišných druhů může křížit. Současné odhady ukazují, že nejméně 6 % evropských druhů savců podstupuje určitý stupeň hybridizace. Hybridizace dávající životaschopné potomstvo se může objevit mezi všemi druhy rodu *Canis*. Sindičić et al. (2011) uvádějí, že pro zjištění hybridizace byly vyvinuty speciální genetické metody pro detekci stupně a toku genů mezi vlky a psy. Mezi tyto metody patří analýza mtDNA, variability autosomálních mikrosatelitů a mikrosatelitů Y gonozómu.

### **3.1.4 Charakteristika plemen vzniklých hybridizací vlka a psa**

#### **3.1.4.1 Saarloosův vlčák**

Zakladatelem tohoto plemene je Leendert Saarloos z Nizozemí (1884 – 1969), jehož záměrem bylo navrátit psovi jeho přirozené vlastnosti vlka, které díky lidem postupně ztratil (Räber, 1994).

V roce 1932 tedy došlo ke zkřížení německého ovčáka Gerarda van der Fransenum (pes klasického pruského typu) s vlčicí Fleur z Blijdorp Zoo v Rotterdamu (pocházející ze sibiřské větve evropského typu) (Císařovský, 2008). Toto křížení zpět na otce několikrát ještě opakoval. Potomci však byli plaší a jejich vztah k lidem nebyl spolehlivý. Proto tyto potomky dále křížil s německými ovčáky a doufal, že dosáhne svého cíle. Během této experimentální části s přísnou selekcí došlo k vytvoření nového plemene, tzv. „evropského

vlčáka“. Tito jedinci byli využiti jako průvodci slepců. Ale i nadále tito jedinci zůstávali, stejně jako vlci, plaší a opatrní.

Nové plemeno, ne pracovního psa, ale psa s vlastnostmi téměř přírodními, málem opět vymizel, kdyby „Raad van Beheer op Kynologisch Gebied in Nederland“ 5. července 1975 neuznal vlčáka jako 10. nizozemské plemeno, a dal mu jméno Saarloosův vlčák podle jeho zakladatele. Řadíme ho do první skupiny klasifikace F.C.I., kde je zapsán pod číslem 331.

#### **3.1.4.2 Československý vlčák**

Plemeno československý vlčák vzniklo vzájemným křížením německého ovčáka a vlka eurasijského (*Canis lupus lupus*). První pokusy o spojení vlka a psa proběhly v roce 1955. V roce 1958 došlo pod vedením Ing. Karla Hartla ke spojení vlčice Britty a německého ovčáka Cézara z Březového háje. První vrh kříženců se narodil v chovné stanici Pohraniční stráže v Libějovicích. Vybraní jedinci z této F<sub>1</sub> generace byli dále kříženi s nepříbuznými jedinci plemene německý ovčák. V roce 1966 již existovaly čtyři filiální generace kříženců první linie (vlčice Britta x německý ovčák Cézar z Březového háje) a dvě filiální generace druhé linie (vlčice Britta x německý ovčák Kurt z Václavky). V roce 1968 proběhlo v chovné stanici v Býchorech další křížení a to vlka Arga s fenou německého ovčáka Astou z SNB. V této chovné stanici byli odchováni i jedinci druhé filiální generace z této linie. Meziliniovní kříženci dostali označení ČV, tj. český vlčák. V sedmdesátých letech byla populace obohacena třetím jedincem – vlkem Šarikem, kterým byla kryta kříženka třetí filiální generací Xela z Pohraniční stráže a fena československého vlčáka Urta z Pohraniční stráže (Hartl a Jedlička, 1996).

Plemeno československý vlčák byl uznán jako národní plemeno v roce 1982. Problémem však bylo udržet přirozenou strukturu populace plemene a nedovolit erozi genofondu. Řešením bylo nové křížení. Došlo ke zkřížení německého ovčáka Bojara von Schotterhof s vlčicí Lejdy. Z tohoto spojení byl vybrán Kazan z Pohraniční stráže, který byl dále použit v plemenitbě československých vlčáků (Hartl a Jedlička, 1996).

Za vznikem plemene československý vlčák stojí tedy čtyři vlci – Britta, Argo, Šarik a Lejdy. Plemeno československý vlčák byl uznán F.C.I. dne 13. června 1989. V roce 1989 bylo zapsáno pod číslem 332. Náleží do první skupiny klasifikace F.C.I. (ovčáčtí a honáčtí psi) a zemí původu je Československo. Patronem se po rozdělení republiky stalo Slovensko.

### 3.1.5 Genom psa

Vilà et al. (1999b) uvádějí, že stejně jako genomy ostatních savců, se psí genom vyznačuje několika obecnými třídami opakujících se prvků. První z nich, satelitní DNA, existuje jako heterochromatin a je složen z dlouhých tandemových opakování úzce spojených sekvencí, které nejsou přepsány. Z výsledků výzkumu zjistili, že Southern blotting ukazuje druhově specifické vzory pro čtyři hlavní studované *Canidy* – červená liška, pes, liška a mýval. První skupinou jsou tzv. BSP prvky, druhou velkou skupinou opakující se savčí DNA jsou krátké a dlouhé roztroušené nukleotidové prvky známé jako SINE a LINE, které vznikají retro Přesunem. Třetí třídou repetitivních elementů, které jsou společné všem savčím genomům, jsou mikrosatelity, které jsou malými úseky DNA sestávající se z mono-, di-, tri- nebo tetranukleotidových sekvencí. Tyto opakující se prvky jsou v obecném zájmu, protože jsou velmi užitečné v genetickém mapování. Podle Sugiyama et al. (2013) je kompletní nukleotidová sekvence mitochondriálního genomu domestikovaného psa, *Canis lupus familiaris* L., dlouhá přibližně 16728 bp, obsahuje 13 protein kódujících genů, 22 tRNA a 2 rRNA. Stejně jako lidská mtDNA obsahuje psí mtDNA polymorfní nekódující oblasti uváděné jako hypervariabilní oblasti (HVR) (Verginelli et al. 2005).

### 3.2 Genetické markery a jejich dělení

Dle Iriona et al. (2003) jsou pro zjištění genetického polymorfismu, heterozygotnosti a fylogeneze využívány různé markery – autosomálně mikrosatelitní markery, Y chromozomové markery, mtDNA a v dnešní době využívané jednoduché nukleotidové polymorfismy (SNPs).

Použití těchto markerů má svá omezení pokud jsou použity samostatně. Analýza Y chromozomálních markerů a variability mtDNA sekvence je omezena pouze na jedno pohlaví. mtDNA vykazovala 20ti násobné zvýšení rychlosti mutací v celém hypervariabilní oblasti v poměru k jaderné DNA, Y chromozomální mikrosatelity mají stejně vysokou míru mutace s autozomálními markery. Autozomální markery se používají pro studium genetické diverzity u různých plemen psů, a to především pro účely stanovení rodičovství, řešení forenzních případů a pro charakterizaci vazebných vztahů mezi konkrétními plemeny (Irion et al., 2003).

Arif et al. (2011) uvádějí, že molekulární markery hrají důležitou roli při odhadování příbuznosti mezi jedinci srovnáváním genotypů v řadě polymorfních lokusů. K dispozici je několik typů genetických markerů, ale žádný z nich není optimální pro všechny aplikace.



Většina systematických a fylogenetických studií využívá přístupy se sekvenováním mtDNA. Nicméně fylogeneze mtDNA představuje pouze genealogii určitého genu, který je téměř výhradně děděn maternálně. Proto je pro přesnější interpretaci populační genetiky, biodiverzity, fylogeneze a forenzních věd potřeba použít další genetické markery zaměřené na jadernou DNA – např. RAPD, AFLP nebo mikrosatelity.

Pro získání a analýzu genetických markerů lze využít různé metody, jejichž principem je restriční štěpení, hybridizace, amplifikace či jejich kombinace (Kenis, 2003).

### **3.2.1 Repetitivní DNA**

Benson (1999) uvádí, že tandemová repetice DNA představuje dvě nebo více souvislých kopií vzorku nukleotidů. Podle Sharmy et al. (2004) obsahují genomy všech eukaryot opakující se prvky různé délky, které mohou zabírat značnou část celkového obsahu DNA. Alberts et al. (1998) publikovali, že 30 % z celkové lidské DNA obsahuje tuto, tzv. repetitivní DNA. V genomu eukaryot existují dvě hlavní skupiny repetitivních prvků. Jedná se o tandemové repetice, které jsou obvykle omezeny na specifické chromozomální oblasti (Denoeud et al., 2003; Sharma et al., 2004; Alberts et al., 1998; Liping et al., 2007).

#### **3.2.1.1 Roztroušené repetice**

Sharma et al. (2007) uvádějí, že stejně jako se dělí tandemově se opakující repetitivní DNA, tak se mohou dělit i roztroušené repetice. Tyto repetice dělíme paralogy, transpozony, tDNA a retro (pseudo-) geny. Rozlišujeme dvě třídy transpozonů. Podle van Dellen et al. (2002), Wicker et al. (2007) a Richard et al., (2008) představují první třídu krátké roztroušené repetitivní DNA elementy (SINE), dlouhé roztroušené repetitivní DNA elementy (LINE), dlouhá terminální opakování (LTR transpozony), PLE (*Penelope*-like elementy) a DIR (*Dictyostellium* středně repetitivní sekvence), naopak druhou třídu představují DNA transpozony.

#### **3.2.1.2 Tandemové repetice, tj. tandemově se opakující repetitivní DNA**

Tandemové repetice jsou seskupeny do tří hlavních tříd- tandemové paralogy, rDNA a satelitní DNA. Satelitní DNA se dále dělí na satelity, minisatelity a mikrosatelity. Tyto podtřídy sdílí několik vlastností, ale liší se na základě jejich rozložení chromozomů a délce opakujících se motivů (Zajc, 1997; Richard et al., 2008).

Běžná satelitní opakování se skládají z velmi dlouhých tandemových polí 5 - 171 bp repetitivních jednotek, obvykle přítomných na centromerách. Minisatelity se skládají z tandemových opakování krátkých jednotek o 6 – 64 bp nacházejících se v blízkosti telomery. Mikrosatelity jsou vysoce repetitivní sekvence skládající se z 1 – 4 bp opakujících se až 50 x a rozptýlených ve všech chromozomech (Sharma et al., 2007).

### **Minisatelity**

Zajc et al. (1999), Chambers et al. (2014) uvádějí, že i když to není pravidlem, minisatelity neboli také VNTR (variable number of tandem repeats) mnoha organismů mají tendenci být seskupeny do proterminálních konců chromozomů. Délka opakující se jednotky se mění od 10 po 60 bp. Kvůli jejich extrémně vysokému stupni intrapopulačního polymorfismu, jsou testy minisatelitů použitelné ve forenzní vědě, testování rodičovství u lidí a při identifikaci jedinců domestikovaných zvířat. Metodou založenou na polymorfismu minisatelitů je například fingerprinting.

### FINGERPRINTING

Fingerprinting neboli „DNA otisky prstů“ je metoda založená na polymorfismu minisatelitů. Zakladatelem metody fingerprintingu neboli „DNA otisků prstů“ je Alec Jeffreys, který ji objevil na základě identifikace opakujících se motivů v genu lidského betaglobinu. Southern blotting testy hypervariabilní oblasti DNA se používají k odhalení genotypu. První využití fingerprintingu bylo v případě testování rodičovství (Travis et al., 1995; Jobling, 2013).

Vzorek se enzymy naštěpí na různě dlouhé fragmenty, které jsou separovány gelovou elektroforézou a přeneseny metodou Southern blotting na nylonovou membránu, která je poté hybridizována radioaktivně značenou sondou. Po následném odmytí nenavázaných sond se při autoradiografii zobrazí „žebříček“ fragmentů, jež odpovídá „DNA otisku prstů“. Tyto „otisky“ se vizuálně porovnají a určí se biologický otec a matka (Awise et al., 1989; Wayne et al., 1999; Jobling, 2013).

Chamber et al. (2014) uvádějí, že použití fingerprintingu na bázi minisatelitů bylo nahrazeno mikrosatelity. Použití DNA fingerprintingu na bázi mikrosatelitů se stává stále více rozšířené. Technicky méně náročné aspekty izolace a běžné amplifikace DNA mikrosatelity (ve srovnání s multilokusovými minisatelity) a jejich užitečnost pro jednoznačné přiřazení rodičovství má za následek exponenciální růst studií reprodukčního systému zvířat.

Podle Joblinga (2013) je vývoj genotypingu jedinců na bázi PCR pomocí polymorfismu mikrosatelitů a jejich použití při určování otcovství koncepčně zakořeněn v průkopnické práci Aleca Jeffreysa.

Nejčastěji používanými genetickými markery pro fingerprinting jsou RAPD (náhodně amplifikovaná polymorfni DNA), AFLP (polymorfismus délek amplifikovaných fragmentů) a mikrosatelity neboli SSR (krátké tandemové repetice). Jak RAPD, tak AFLP markery nevyžadují předchozí molekulární informace, zatímco SSR markery vyžadují sekvenční informace k přípravě primerů. Všechny tyto markery jsou hojně využívány pro analýzu genetické diverzity z důvodu velkého počtu lokusů, které mohou být promítány současně. Rozlišovací síla těchto markerů působí v následujícím pořadí SSR > AFLP > RAPD. RAPD i AFLP markery mají dvě alely na lokus a proto jsou považovány za dominantní (přítomnost nebo absence bandu). Naproti tomu jsou SSR schopny rozpoznat jak alely (kodominantní marker), tak mohou také snadno rozlišit mezi homozygotem a heterozygotem. RAPD a AFLP jsou multilokusové systémy s využitím primerů, které se zároveň vážou k různým částem genomu, což vede k amplifikaci mnoha lokusů ve stejný čas (Arif et al., 2011).

### **Mikrosatelity**

Mellersh et al. (1997) a Chistiakov et al. (2006) publikovali, že jednoduché repetitivní sekvence (SSRs), krátké tandemové repetice (STR) neboli mikrosatelity představují jedinečný typ tandemově se opakujících genomových sekvencí, které jsou hojně distribuovány v celých genomech a prokazují vysokou úroveň polymorfismu alel. Mikrosatelity jsou založeny na opakování krátkých úsecích (1 – 5 bp), které jsou náhodně rozděleny v celém genomu obratlovců (Zajc et al., 1999).

Podle Sharmy et al. (2007) byly mikrosatelity vyvinuty do jedné z nejpobulárnějších tříd genetických markerů vzhledem k jejich vysoké reprodukovatelnosti, kodominantnímu typu dědičnosti, hojnosti a širokému genomickému pokrytí. Přes jejich všude přítomný výskyt se hustota mikrosatelitů a distribuce výrazně liší napříč genomy. Vysoká proměnlivost v mikrosatelitních lokusech hraje roli ve vývoji genomu tím, že vytváří genetickou variabilitu v rámci genofondu. Mikrosatelity jsou kodominantními markery poměrně malé velikosti, které mohou být snadno amplifikovány polymerázovou řetězovou reakcí (PCR). Analýza (AC)<sub>n</sub> mikrosatelitů u pěti tříd obratlovců (savci, ptáci, plazi, obojživelníci a ryby) ukázala, že délka je významným faktorem, který ovlivňuje míru mutace (Chistiakov et al., 2006).

Ačkoliv jsou lokusy mikrosatelitů obecně méně variabilní než většina minisatelitů, mohou nabídnout cennou alternativu k minisatelitům při testování rodičovství u lidí (Zajc et al., 1999).

V genomu psa může být přítomno tisíce sad společných opakování (např. (CA)<sub>n</sub>, (GATA)<sub>n</sub> nebo (CAG)<sub>n</sub>. Podle Vilà et al. (1999b) jsou jednotlivé alely spojené s každým markerem (značkou) sledovány skrz generace rodin použitím testů na bázi PCR. Každý jednotlivý marker se odlišuje od ostatních PCR primery získanými z unikátních sekvencí DNA, které obklopují každé opakování. Ačkoli se často jeví jako unikátní distribuce alel v rámci jednotlivých plemen, primery, které definují každý marker, fungují dobře u všech domácích plemen, a samozřejmě u jiných *Canidů*.

DNA profilování analýzou STR lokusů je široce používán v soudních kauzách od roku 1993. Testování krátkých tandemových repetitiv se využívá pro testování paternity. Stále častější využívání této metody vedlo k vytvoření 20 nebo více vhodných STR systémů, které jsou k dispozici buď komerčně, nebo pomocí publikovaných sekvencí primerů (Thomson et al., 1999).

Zajc et al. (1997) uvádějí, že mikrosatelity se dědí podle Mendelistického modelu a vyjadřují kodominantní povahu alelických variant. Vzhledem k intenzivní umělé selekci a hlavnímu inbreedingu vyjadřují čistokrevní psi poměrně vysokou genetickou homogenitu. I přes tuto nízkou genetickou variabilitu byly mikrosatelity psů úspěšně použity v testování otcovství u psů.

### **3.2.2 Mitochondriální DNA**

Rokas et al. (2003) uvádějí, že mitochondriální DNA je malá, kruhová molekula DNA, která se vyskytuje v mitochondriích a obsahuje geny, jež podporují aerobní dýchání. Arif et al. (2011) publikovali, že mitochondriální DNA u zvířat obvykle dosahuje 36 nebo 37 genů, dva pro rRNA, 22 pro tRNA a 12 nebo 13 pro podjednotky multimerních proteinů vnitřní mitochondriální membrány. Součástí mtDNA je také nekódující sekvence nazývaná kontrolní oblast. Ačkoliv se mitochondriální DNA vyvinula rychleji než jaderný genom, tempo vývoje se liší pro různé oblasti mtDNA. Tento typ DNA se využívá k prověření různých fylogenetických vztahů.

Podle Pfeiffera et al. (2004) a Sindičiče et al. (2011) mtDNA dosahuje u psů 16 728 kb. mtDNA je genetický marker často používaný v soudní analýze a v populační genetice a fylogenetickém výzkumu (Klüttsch et al., 2011). Výhodou tohoto ukazatele je velká rozmanitost. Vysoký počet kopií v buňkách umožňuje analýzu malého množství buněčného

materiálu, který je zvláště důležitý pro forenzní studie, kde vzorky často obsahují malé množství a nebo vysoce degenerovanou DNA. Kvůli vysoké míře mutace, ve srovnání s jadernou DNA, analýza oblasti relativně krátké mtDNA je často dostačující pro forenzní identifikaci nebo jemné měřítko fylogeografických studií. Snustad a Simmons (2009) uvádějí, že při srovnávání dvou sekvencí mtDNA, je každý rozdíl v jednom páru bází považován za mutaci. Na tomto základě jsou sestavovány fylogenetické stromy pro zjišťování vztahů mezi organismy. Konstrukce fylogenetických stromů se provádí shlukováním nejvíce podobných DNA sekvencí a minimalizací počtu mutací nutných k vysvětlení rozdílů mezi všemi sekvencemi DNA.

Tsuda et al. (1997) se ve své práci zabývali testováním hypotézy, že domestikovaní psi vznikli z několika různých rodových populací šedého vlka. Srovnávali sekvence posunů D-smyčky mitochondriální DNA u 24 plemen domestikovaných psů (34 jedinců) a 3 poddruhů vlka obecného (*Canis lupus lupus*, *C. l. pallipes* a *C. l. chanco*; 19 jedinců). Vnitrodruhové variace sekvence mezi domestikovanými psy a mezi vlky byly srovnávány s mezidruhovými variacemi mezi psy a vlky. Repetitivní sekvence s opakujícími se jednotkami (TACACGTA/GCG), která způsobuje velikost odchylky (variability) v oblasti D-smyčky, byla nalezena jak u psů, tak u vlků. Nicméně žádné nukleotidní substituce a repetitivní sady nebyly specifické pro domestikované psy a vlky. Tyto výsledky ukázaly a potvrdily, že je zde blízký genetický vztah mezi psy a vlky.

### **3.2.2.1 Dědičnost mtDNA**

Somatické buňky obsahují 100-1000 mitochondrií, zatímco oocyt obsahuje 104-105 mitochondrií, každý s několika molekulami DNA. Tyto molekuly mtDNA mohou být uvnitř mitochondrií nehybné, protože jsou připojeny k vnitřní membráně mitochondrie, kde se shlukují do nukleotidů. Každá somatická buňka obsahuje mnohem více kopií mtDNA k porovnání s jedinou kopií jaderné DNA a analýza mtDNA je tedy více spolehlivou forenzní metodou (Angleby et al., 2005; Rokas et al., 2003).

Podle Chan et al. (2012) vykazuje většina eukaryotních buněk uniparentální dědičnost mtDNA. U lidí dědí potomstvo mtDNA výhradně od matky. Z uniparentální dědičnosti mtDNA souvisí řada výhod (např. omezení šíření škodlivých mtDNA mutací) a proto je výhodné zajistit uniparentální dědičnost a to pomocí mechanismů odstraňující otcovskou mtDNA z oplodněného vajíčka. S výjimkou některých rodin mlžů je maternální dědičnost mtDNA pravidlem u všech živočišných druhů, ale způsoby, jak zabránit paternálnímu přenosu se liší (Rokas et al., 2003). Například spermie u některých druhů raků postrádají

mitochondrie. U některých pláštěnců, nevstupuje mitochondrie do vajíčka, zatímco u savců až 100 otcovských mitochondrií do vajíčka vstupuje, ale jsou během několika prvních hodin po oplození zničeny. K selektivní destrukci mitochondrií savčích spermií dochází po vstupu do vaječné cytoplasmy, jelikož jsou označeny ubiquitinem, univerzální proteolytickou značkou. Ačkoli tyto mechanismy existují, aby zajistily, že zygota bude obsahovat pouze maternální mitochondrie, maternální dědičnost mtDNA u živočichů je často kvantitativní jev. Přesněji řečeno, existují situace, ve kterých mechanismus pro uznávání paternálních mitochondrií v oplodněném vajíčku může selhat, což umožňuje vznik tzv. otcovské netěsnosti (unikání).

White et al. (2008) publikovali, že otcovský únik byl skutečně pozorován u taxonomicky široké škály druhů bezobratlých a obratlovců, nedávno byl případ paternální dědičnosti mtDNA prokázán také u lidí. Bohužel míra otcovského úniku u zvířat nebyla studována žádným systematickým způsobem. K dispozici jsou pouze hrubé odhady pocházející ze studia myši a *Drosophil*. Více extrémní výjimka pro standardní maternální dědičnost mtDNA je dvojnásobně uniparentální dědičnost, která byla pozorována u několika rodin mlžů. Podle dvojnásobné uniparentální dědičnosti dědí samičí potomstvo mtDNA od matky, zatímco samci dědí mtDNA od obou rodičů, což vede k samčímu potomstvu, jenž je heteroplazmatické.

Chan et al. (2012), DeLuca et al. (2012) uvádějí, že *Drosophila melanogaster* v průběhu jejich vývoje odstraňuje mtDNA ze spermií. Děje se tak pomocí dvou mechanismů. V průběhu spermatogeneze se postupně ze spermií ztrácejí nukleotidy mtDNA. V okamžiku, kdy jsou spermatidy plně prodloužené, jsou molekuly mtDNA do značné míry odstraněny. Pro tuto ztrátu mtDNA je důležitá mitochondriální endonukleáza EndoG, jejíž mutace má za následek přetrvání mtDNA v plně prodloužené spermii. Druhý mechanismus byl pozorován například u plozených vajíček primátů a krav, kde jsou mitochondrie spermií označeny ubiquitinem, který označuje organely, jenž mají být zničeny proteozomálním systémem.

Jiný mechanismus byl pozorován u ryb či hlístic. U ryb zmizí mtDNA před ztrátou samotné mitochondrie, což naznačuje, že je DNA enzymaticky stravitelná. V případě hlístic stojí za odstraněním otcovské mtDNA proces autofágie. Během spermatogeneze dochází k postupnému snižování obsahu nukleotidů mtDNA (japonská ryba medaka 5x, myš 10x).

Klütsch et al. (2011) uvádějí, že heteroplazmie, směs normálních a mutovaných mitochondrií v organismu, může způsobit náročnou identifikaci jedince na základě mitochondriální DNA (mtDNA) forenzní analýzou. Nicméně variace poměrů heteroplazmie

a segregace heteroplazmatických variací z generace na generaci a v rodinách nebyly systematicky popsány ve velkém měřítku u zvířat, jako je například pes domácí. Heteroplazmatické organismy nesou více než jeden mitochondriální genotyp. Heteroplazmii mohou generovat tři možné mechanismy: otcovský únik, rekombinace a mutace (White et al., 2008).

### **3.2.2.2 Kontrolní oblast mtDNA**

Oskarsson et al. (2012), Verscheure et al. (2013), Sindičić et al. (2011) publikovali, že kontrolní oblast mtDNA psa je vymezena pozicí nukleotidů 15 458 – 16 727 (16 039) v mitochondriálním genomu. Savolainen et al. (2000) uvádějí, že kontrolní oblast mitochondriální DNA psů a vlků obsahuje řadu nedokonalých opakujících se tandemů 10 bp začínajících na nukleotidu 16130, které dělí kontrolní oblast mtDNA do dvou podoblastí (hypervariabilní oblasti - HV1 a HV2).

Sindičić et al. (2011) uvádějí, že bylo zjištěno, že haplotypy kontrolní oblasti mtDNA vlka nejsou sdíleny s žádným ze studovaných plemen psů. Pouze Vilà et al. (1997) zjistili, že jeden haplotyp vlka z Rumunska a západního Ruska je sdílen se psy, což naznačuje nedávnou hybridizaci. Vilà et al. (1999c) publikovali, že srovnání 261 bp sekvence mtDNA z kontrolní oblasti psů, vlků obecných, kojotů, etiopských vlků a zlatých šakalů podporuje původ psů z vlka obecného. Sekvence psů a vlků se lišila 0-12 substitucemi a psi se vždy lišili od kojotů, etiopských vlků a šakalů v nejméně 20 substitucích. Některé sekvence nalezené u psů byly identické s těmi, které byly nalezeny u vlků. Jedna skupina sekvence psů se shodovala s 18 z 26 haplotypů nalezených u vlků. Po potvrzení, že zde nebyly rozdíly v rychlosti substituce psů a vlků, čas potřebný pro dosažení takové rozmanitosti byl odhadnut na cca 135 000 let. Tento odhad je založen na analýze 1030 bp kontrolní oblasti sekvence ve vzorcích psů a vlků.

### **3.3 Polymerázová řetězová reakce (PCR)**

Detekce polymorfismů D-smyčky mtDNA a mikrosatelitních lokusů je nejčastěji založena na principu amplifikace opakujících se sekvencí pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR).

Polymerázová řetězová reakce (PCR) je *in vitro* (bez použití buněk) metoda pro enzymatickou syntézu specifických sekvencí DNA použitím dvou oligonukleotidových primerů (každý obvykle o délce 16 – 30 nukleotidů), které hybridizují k opačným vláknům a které lemují oblast zájmu k cílové DNA. Tyto oligonukleotidy nasedají na oddělená templátová DNA vlákna a párují se s nimi na základě komplementarity. Metoda využívá

DNA-polymerázu pro opakované kopírování templátové molekuly DNA. PCR je schopna syntetizovat miliony kopií specifické sekvence DNA v jednoduché, rychlé a automatizované reakci. Kapacita pro amplifikaci specifických fragmentů DNA z komplexu templátu má revoluční dopad na výzkum molekulární biologie stejně jako na využití v medicíně (Erlich, 1989; Hadidi et al., 2003).

Metoda PCR probíhá v termocykleru a je založena na opakování třech jednoduchých kroků. Prvním krokem je denaturace templátu na jednotlivá vlákna, druhým krokem je nasedání primerů ke každému původnímu vlákně pro syntézu nové vlákna, třetím krokem je extenze nových DNA vláken z primerů. V prvním kroku dochází k denuraci DNA zahřátím na teplotu 92 – 95 °C po dobu 30 s. Během denaturace je DNA rozpletena a stává se jednořetězovou. Během druhého kroku se denaturovaná DNA se syntetickými oligonukleotidovými primery inkubuje při teplotě 35 – 65 °C po dobu asi 30 s, čímž dojde k její hybridizaci. V třetím kroku dochází k polymeraci při teplotě 72 °C po dobu 60 s. V tomto kroku *Taq*-polymeráza replikuje úsek DNA mezi místy komplementárními k oligonukleotidovým primerům. Tyto kroky se neustále opakují až do dosažení optimálního množství DNA. Po každém cyklu dojde k zdvojnásobení počtu molekul amplifikovaného fragmentu (Mullis et al., 1992; Delidow et al., 1993).

Henegariu et al. (1997) uvádějí, že multiplex PCR je variantou PCR, ve které je v jedné reakci souběžně amplifikovány dva a více lokusů. Na základě experimentů vytvořili protokol pro multiplex PCR. Hedmark et al. (2006) se zabývali studiem rozdílů multiplex preamplifikace a PCR. Z jejich výsledků vyplývá, že je multiplex preamplifikace výhodnější než samostatná PCR (v případě vzorků faeces).

Hedmark et al. (2006) uvádějí, že je genotypizace mikrosatelitů z neinvazivních vzorků (např. faeces nebo vlasy) často náchylná k chybám z důvodu malého množství vzorku nebo z důvodu nízké kvality extrahované DNA. Možnost získat spolehlivé výsledky obvykle vyžaduje mnoho replikací každé PCR, a to činí tuto analýzu pracnou a nákladnou.

Piggott et al. (2004) navrhli dvoukrokou PCR ke zlepšení úspěchu amplifikace, snížení míry chyb a umožňují použití více markerů v analýze mikrosatelitů. Důvodem jejich přístupu, označovaném jako multiplex preamplifikace, je provést počáteční multiplex PCR zahrnující primery pro všechny markery, které mají být genotypovány, a poté použít tyto produkty jako templát v samostatných replikačních amplifikacích pro každý marker. Úspěch amplifikace a míra chyby genotypizace v analýze mikrosatelitů neinvazivních vzorků se značně liší v rámci a mezi druhy.



Ke studiu polymorfismu se využívá PCR v kombinaci s dalšími metodami. Příkladem může být metoda fingerprintingu, při které se používá PCR- AFLP (Vos et al., 1995), PCR-RAPD (Welsh a McClelland, 1990; Williams et al., 1990; Stepniak et al., 2002; Arif et al., 2011), PCR-SSR (Zietkiewicz et al., 1994; Gomes et al., 1998; Brookes et al., 2012), PCR-RFLP (Wolf et al., 1999; Pfeiffer et al., 2004).

## **3.4 Fylogenetika**

### **3.4.1 Fylogenetická analýza**

Potomci společných předků DNA nebo proteinů se nazývají homologní. Tito homologní potomci se mohli od předka již výrazně odlišit. Naopak dvě sobě značně podobné sekvence odvozené od odlišných sekvencí předka se označují jako analogní. Zásadním krokem molekulární fylogenetiky je hledání homologických míst v molekulárních sekvencích, tzv. alignment (Snustad a Simmons, 2009).

Vlivem mutací se v průběhu generací hromadí v DNA změny (Britten, 1986). Pro studium sekvencí jsou nejvýznamnější bodové mutace. Mezi tyto mutace řadíme substituce, delece a inserce. Podle Nei a Kumar (2000) je základním evolučním procesem na úrovni sekvencí DNA nukleotidová substituce. K této mutaci dochází při replikaci DNA, kdy se do nově vznikajícího řetězce začlení nekomplementární nukleotid. Rozlišují se dva typy nukleotidové substituce-tranzice (4 možné varianty) a transverze (8 možných variant). Během tranzice dochází ke změně pyrimidinového nukleotidu v jiný pyrimidinový či ke změně purinového v jiný purinový. Při transverzi dochází k záměně purinového nukleotidu na pyrimidinový a naopak. Rychlost této mutace je ovlivněna řadou faktorů. Důležité je odlišovat mutační rychlost, což je rychlost změn bez ohledu na to, zda se přenáší do další generace, a rychlost evoluční nukleotidové substituce, kdy dochází ke změně sekvencí u jedinců v přirozených populacích. Nejčastěji dochází k záměně G za A a C za T. Bejdák (2006) uvádí, že pro fylogenetickou analýzu je nutné zvolit vhodnou sekvenci.

### SEKVENOVÁNÍ DNA

Alberts et al. (1998) uvádějí, že nejrozšířenější metoda sekvenování DNA je založena na Sangerově enzymatické metodě. Jedná se o metodu, která využívá terminaci syntézy komplementárního řetězce DNA pomocí dideoxynukleotidu. K denaturované DNA pro analýzu se pomocí DNA-polymerázy syntetizuje komplementární řetězec. V reakční

směsi jsou přítomny normální 2'-deoxyribonukleosid-5'-trifosfáty a 2', 3'-dideoxyribonukleosid-5'-trifosfáty (ddNTP). Tyto ddNTP se v průběhu syntézy náhodně začlení do řetězce, čímž dojde k ukončení syntézy. Důvodem je nemožnost připojení dalšího nukleotidu na pozici ribózy 3'. Vzniklé komplementární řetězce mají různou délku. Sekvenování probíhá v sekvestorech, ve kterých se nachází kapilára, v níž probíhá elektroforéza. Touto kapilárou postupně prochází jednotlivé fragmenty v závislosti na jejich délce. Následně jsou tyto fragmenty detekovány stacionárním laserovým detektorem, který určí zakončující ddNTP (označen fluorescenčním barvivem). Data jsou zaznamenávána v počítači. Reakce se obvykle provádí dvakrát. Jednou s jedním primerem a následně s primerem pro reverzní komplementární sekvenci. Tento krok slouží k doplnění hůře čitelných konců.

Metody sekvenování DNA se během let postupně vylepšily, zjednodušily a také zlevnily. Jsou stále více využívány v biologii a především pak ve fylogenetice.

### **3.4.2 Konstrukce fylogenetických stromů**

Evoluční vztahy mezi organismy lze shrnout v diagramech nazývané fylogenetické stromy. Fylogenetické stromy mohou ukázat vztahy mezi organismy či vývoj jednotlivých organismů v čase. Strom může být buď zakořeněný (v tomto případě je na stromě známé místo nejbližšího společného předka zkoumaných druhů), nebo nezakořeněný. Větvení se strom ukazuje vztahy mezi druhy nebo vyššími taxony na základě sdílení společného předka. Na základě zahrnutí blízkého příbuzného vývojové linie do analýzy, můžeme vyhledat daný kořen (Snustad a Simmons, 2009). Tento příbuzný taxon se podle Graur a Li (2006) označuje jako „outgroup“. Na stromu je potom tento kořen umístěn na spojnici outgroup s ostatními zkoumanými taxony. Pro porovnání jednotlivých nukleotidů ve více sekvencích DNA je potřeba tyto sekvence seřadit. Hovoříme o tzv. alignmentu. K tomu slouží odpovídající počítačové programy. Snustad a Simmons (2009) uvádějí, že ze stejných vstupních dat lze získat různé fylogenetické stromy a to podle druhu použité metody. Tyto metody se vyznačují čtyřmi obecnými rysy. Jedná se o seřazení sekvencí umožňující jejich srovnání, zjištění rozsahu podobnosti či rozdílnosti mezi každými dvěma sekvencemi, seskupování sekvencí na základě podobnosti a umístění sekvencí do vrcholu stromu. Nejpoužívanější metodou pro vyhodnocování kvality fylogenetických stromů je tzv. bootstrapping. Hodnota bootstrapu představuje procentuální hodnotu vyjadřující stupeň podpory jednotlivých větvení v závislosti ke vstupním datům (Efron, 1979). Jako přijatelnou statistickou podporu větvení uvádí Felsenstein (1985) hodnotu vyšší než 50, ideálně vyšší než 70.

### **3.4.3 Metody konstrukce fylogramu**

#### **3.4.3.1 Metoda maximální věrohodnosti (ML, Maximum likelihood)**

Je považována za metodu nejspolehlivější. Pro každý sestrojený strom uvede pravděpodobnost, s jakou mohl vytvářet soubory znaků odpovídající vstupním datům. Výhodou této metody je, že zachytí i bodové mutace (Felsenstein, 1981). Pravděpodobnost v tomto případě znamená, že při daném evolučním modelu mohl daný strom podmínit vznik shromážděných dat.

#### **3.4.3.2 Metoda minimální evoluce (MINEVOL, Minimum evolution)**

Rzhetsky a Nei (1992) uvádí, že je tato metoda velmi náročná, počítá sumu délek všech větví pro všechny možné stromy. Na základě tohoto počítání, následně vybere strom, který má součet délek větví nejmenší. Pro zjednodušení této metody lze využít algoritmů, které předem některé stromy vyloučí. Nebo využít algoritmů, jež spojují dva taxony, jejichž spojení vede k maximálnímu minimalizování celkové sumy délek. Mezi tyto algoritmy patří metoda neighbor-joining a shluková analýza (UPGMA).

##### **3.4.3.2.1 Metoda neighbor-joining (NJ)**

Podle Saitou a Nei (1987) je principem této metod nalezení dvojice operačních taxonomických jednotek (OUT, operational taxonomic units = neighbors), které minimalizují celkovou délku větve v každé fázi. V každém kroku dojde ke spojení dvou sousedů v jeden uzel. Tento algoritmus vychází z hvězdicovitého stromu, kdy v počáteční fázi dochází ke spojení všech sousedů v jednom uzlu. Následně jsou jednotlivé větve spojovány a jsou nahrazeny novými uzly. Tento postup se neustále opakuje až do dosáhnutí binárního větvení.

##### **3.4.3.2.2 Metoda UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean)**

Tato metoda je velmi jednoduchá. Z matice jsou vybrány dvě sekvence s nejmenší vzdáleností a tyto sekvence jsou následně spojeny pomocí dvou větví a uzlu. Obě původní sekvence jsou v matici nahrazeny nově vzniklým uzlem a dojde k vypočtení jejich vzdáleností od ostatních sekvencí. Celý proces se opakuje až do spojení všech dvojic operačních taxonomických jednotek (Sneath a Sokal, 1973).

#### **3.4.3.3 Metoda maximální úspornosti (MP, Maximum parsimony)**

Podstatou této metody je zvolit takový strom, který má minimální celkovou délku (počet evolučních kroků, včetně homoplazií). Kroky pro toto zvolení mohou být substituce nukleotidů či nabytí/ztráta restrikčního místa. Tato metoda představuje soubor příbuzných metod se společným jmenovatelem. Tím je minimalizace počtu evolučních kroků lišících se

vstupními předpoklady. Metoda maximální parsimonie je metoda rychlá, výpočetně jednoduchá, avšak trpí častými chybami v případě existence velkých rozdílů v evolučních rychlostech podél jednotlivých větví stromu. Problémem jsou sekvence, u kterých proběhla delší evoluční vzdálenost (Sedlář, 2006).

## 4 Materiály a metodika

### 4.1 Výběr plemen psů odvozených od záměrného křížení *Canis lupus familiaris* x *Canis lupus lupus*

#### 4.1.1 Výběr plemen a počty hodnocených jedinců

Pro experiment byla vybrána dvě plemena a to československý vlčák a Saarloosův vlčák.

##### 4.1.1.1 Genotypy použité pro hodnocení variability D-smyčky mtDNA

Pro hodnocení variability D-smyčky mtDNA byli hodnoceni zástupci plemen československý vlčák, u kterých byla na základě studia rodokmenů předpokládána mtDNA pocházející ze tří možných fen německých ovčáků - Adis z Nezbedova dvora, Asta z Koščakovho dvora, Guma z Pohraniční stráže. Potomků odvozených od feny Adis z Nezbedova dvora bylo hodnoceno 58, od feny Asta z Koščakova dvora 63 a od feny Guma z Pohraniční stráže 88. U plemene Saarloosův vlčák bylo hodnoceno celkem 27 jedinců, u kterých byl jediný možný typ mtDNA odvozený od feny německého ovčáka - zakladatelky plemene - Winda V. D. Kilstroom. Variabilita mtDNA byla dále hodnocena u 5 zástupců euroasijského vlka (*Canis lupus lupus* L.). Jednalo se o matku a její 4 potomky, které vlastní soukromí chovatelé v České republice. Současně byla hodnocena jedna vlčice arktická (*Canis lupus arctos*) a tři její potomci, kteří vznikli křížením se psem plemene německý ovčák. Pro porovnání polymorfismů byli analyzováni zástupci následujících plemen psů, u kterých byla hodnocena vždy jedna fena a jeden pes.

Anglický buldok

Bernský salašnický pes

Border kolie

Cane Corso Italiano

Curly coated retriever

Hovawart

Irský setr

Irský vlkodav

Kavkazský pastevecký pes

Labradorský retriever  
Landseer  
Maďarský ohař krátkosrstý  
Neapolský mastin  
Německá doga  
Německý ovčák  
Nova Scotia duck tolling retriever  
Rhodéský ridgeback  
Ruský černý teriér  
Svatobernardský pes  
Španělský mastin  
Tibetská doga  
Výmarský ohař krátkosrstý  
Západosibiřská lajka  
Zlatý retriever

#### **4.1.1.2 Výběr genotypů pro studium variability mikrosatelitních markerů lokalizovaných na gonozómu Y**

Pro tyto experimenty byli vybráni zástupci plemen československý a Saarloosův vlčák samčího pohlaví. Ze studia rodokmenu vyplynulo, že u některých zástupců plemene československý vlčák bude přítomen gonozóm Y pocházející od evropského vlka se jménem Šarik. Těchto psů bylo hodnoceno celkem 198. Zbývající část samčích zástupců plemene československý vlčák nese gonozóm Y pocházející z německého ovčáka Treu von Hildakloster. Těchto psů bylo hodnoceno 132. Genetické analýzy variability SSR markerů gonozómu Y byly aplikovány rovněž na 15 samčích zástupců plemene Saarloosův vlčák, u kterých se předpokládá, že Y gonozóm pochází z 1 zástupce plemene německý ovčák Gerard van de Fransenum. Molekulární markery byly aplikovány rovněž i na tři potomky samčího pohlaví evropského vlka. Jednalo se o sourozence. Variabilita SSR markerů byla hodnocena i u jednoho potomka samčího pohlaví vzniklého křížením arktické vlčice a německého ovčáka bez PP jménem Armín.

#### **4.1.2 Studium rodokmenů zástupců plemen československý vlčák a Saarloosův vlčák**

Na katedře Genetiky byly k dispozici vzorky tisíce jedinců plemene československý vlčák a třiceti jedinců plemene Saarloosův vlčák. U obou těchto plemen existují neustále aktualizované mezinárodní databáze rodokmenů (<http://saarlooswolfdog.info/>; <http://wolfdog.org/>). V těchto databázích jsou zaneseny kompletní rodokmeny všech jedinců s průkazem původu, které sahají do období, kdy obě plemena vznikala na základě křížení mezi vlkem a německým ovčákem. Rodokmeny uvedené v databázi byly použity pro vyhledání teoretických haplotypů mtDNA, které odpovídají matkám zakladatelkám obou plemen. Stejně databáze byly použity pro identifikace haplotypů mikrosatelitních lokusů lokalizovaných na gonozómu Y, které odpovídají otcům zakladatelům u obou plemen.

### **4.2 Izolace DNA a hodnocení její kvality a kvantity**

#### **4.2.1 Izolace genomické DNA**

Pro analýzu byly využity vzorky získané izolací DNA z bukální sliznice pomocí komerčně dodávaného izolačního kitu. Buňky bukálních sliznic byly odebrány pomocí cytologických kartáčků firmy Lotus Global Co., Ltd., London. Aby se zabránilo kontaminaci vzorku, musí mít odběratel omyté ruce a zvíře nesmí alespoň dvě hodiny před odběrem žrát. Kartáček se vsune mezi tvář a dásně otevřené tlamy zvířete a jemnými krouživými pohyby se odebere epitelální vrstva buněk. Po oschnutí se kartáček vloží do označené obálky a uchovává se při  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Vlastní izolace probíhá pomocí izolační sady, které zaručují zachování naprosto identických podmínek během izolace, jsou vysoce spolehlivé a výrazně urychlují izolaci DNA. Pro tuto práci byl využit kit NucleoSpin® Tissue XS (Macherey-Nagel).

#### **4.2.2 Stanovení kvality a kvantity izolované DNA**

Izolovaná genomická DNA byla separována v elektroforetické cele SubCell (BioRad). Pro tento test byl použit 1% agarózový gel v 1x TBE pufru. Složení pufru je uvedeno v příloze diplomové práce. Separace probíhala za laboratorní teploty při konstantním napětí 120 V po dobu 45 minut. Molekuly DNA byly vizualizovány ethidiumbromidem. Elektroforeogramy byly archivovány pomocí systému GelDoc (BioRad) s programem QuantityOne (BioRad).

Kvantita izolované DNA byla stanovena UV-spektrofotometricky s využitím přístroje NanoPhotometer (Implen). Pro odhalení případných kontaminací izolované DNA různými organickými látkami, byly hodnoceny parametry A260/A280 a A260/A230.

Izolovaná genomická DNA všech vzorků byla naředěna 1x TE pufrem na koncentraci 5 ng .  $\mu\text{l}^{-1}$ . Složení použitých pufrů a roztoků je uvedeno v příloze diplomové práce.

### **4.3 Metody studia variability D-smyčky mtDNA**

#### **4.3.1 Amplifikace D-smyčky mtDNA u rodu *Canis***

Pro amplifikaci PCR produktu byla použita dvojice univerzálních primerů pro rod *Canis*, kterou publikovali Vilà et al. (1999c).

Sekvence primerů je následující:

THR-L 15926:        5' CAATTCCCCGGTCTTGTAAC 3'

DL-H 16340:        5' CCTGGAGTAGGAACAGATG 3'

Složení optimalizované reakční směsi o objemu 12,5  $\mu\text{l}$  uvádí tabulka 1. Amplifikace probíhala v Termocykleru C1000TM Thermal Cycler (BioRad) dle podmínek uvedených v tabulce 2.



Tabulka 1: Složení PCR pro amplifikaci mtDNA

Složka	Koncentrace
DNA	20 ng.12,5 $\mu\text{l}^{-1}$
Tris-HCl, pH 8,8	10 mM
MgCl <sub>2</sub>	1,5 mM
KCl	50 mM
Primer Thr-L 15926	0,4 $\mu\text{M}$
Primer DL-H 16340	0,4 $\mu\text{M}$
dNTP	200 $\mu\text{M}$
BSA	5 ng.12,5 $\mu\text{l}^{-1}$
Enhancer - TMA oxalát (Top Bio)	2 mM
Taq polymeráza (Fermentas)	0,7 U . 12,5 $\mu\text{l}^{-1}$
Objem	12,5 $\mu\text{l}$

Tabulka 2: Teplotní a časový profil amplifikace

Úvodní denaturace	95°C	180 sekund	1 cyklus
Denaturace	95°C	30 sekund	35 cyklů
Annealing	58°C	40 sekund	
Prodlužování	72°C	40 sekund	
Závěrečné prodlužování	72°C	420 sekund	1 cyklus

#### 4.3.2 Elektroforetické ověření výsledků amplifikace

Všechny analyzované vzorky byly podrobeny elektroforetické separaci. Postup byl vždy stejný. Pro vzorky byly separovány v 2% gelu, který byl vyroben přidáním 4 g agarózového prášku do 200 ml 1x TBE. Daný roztok byl rozvařen v mikrovlnné troubě

po dobu 3 – 5 minut. Po rozpuštění byl roztok chlazen na magnetickém míchadle po dobu asi 15 minut. Poté byl přidán 12,5 ml zásobního roztoku ethidium bromidu. Tekutý gel se nalije do nosiče, kde se nechá tuhnout po dobu 30 minut. Následně se gel přenesse do elektroforetické vany s elektrodovým pufrem. Na gel se postupně nanášejí vzorky obsahující 5  $\mu$ l amplifikovaného produktu smíchaného s 2 – 3  $\mu$ l speciální barvy na elektroforézu. Samotný proces elektroforetické separace probíhá při 120 voltech po 45 minut. Vizualizace elektroforeogramů při ultrafialovém záření a jejich aktivace je realizována pomocí systému GelDoc (BioRad) s programem QuantityOne (BioRad).

### **4.3.3 Sekvence ampliconů D-smyčky mtDNA**

#### **4.3.3.1 Gelová purifikace PCR produktů**

Sekvenační reakci mohou negativně ovlivňovat volné nukleotidy či teoreticky vznikající dimery primerů amplifikovaného produktu. Nespecifické dimery primerů a volné nukleotidy byly odstraněny na základě gelové purifikace. Byla připravena PCR reakce podle podmínek uvedených výše o celkovém objemu 50  $\mu$ l u každého sekvenovaného vzorku. PCR produkty byly separovány v 1% agarózovém gelu v prostředí 1x TBE pufru. Separace probíhala při konstantním napětí 120 V po dobu 45 minut při laboratorní teplotě. PCR fragment byl vyříznut pomocí sterilního skalpelu a byl přesunut do označené polypropylenové zkumavky. Vyříznuté bločky s amplicony byly purifikovány pomocí MiniElute PCR Purification Kit (Qiagen). Extrakce proběhla podle postupu doporučeného výrobcem kitu. Získaná DNA byla kvantifikována UV spektrofotometricky a naředěna ddH<sub>2</sub>O na koncentraci 5 ng .  $\mu$ l<sup>-1</sup>.

#### **4.3.3.2 Sekvenační reakce**

Pro sekvenaci PCR produktu byl použit BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Life Technologies). Složení sekvenční reakce uvádí tabulka 3.

Tabulka 3: Složení sekvenační reakce

Složka	Objem	Koncentrace
PCR produkt (5 ng . $\mu\text{l}^{-1}$ )	4 $\mu\text{l}$	1 ng. 1 $\mu\text{l}^{-1}$
5x Sequencing Buffer (Life Technologies)	4 $\mu\text{l}$	1x
Primer F resp. R (1 pmol . $\mu\text{l}^{-1}$ )	3,2 $\mu\text{l}$	0,16 $\mu\text{M}$
Terminator Ready Reaktion Mix (Life Technologies)	2 $\mu\text{l}$	-

#### 4.3.3.3 Purifikace produktů sekvenační reakce

Produkt sekvenační reakce (objem 20  $\mu\text{l}$ ) byl doplněn 2  $\mu\text{l}$  roztoku glykogenu (koncentrace 20 ng.  $\mu\text{l}^{-1}$ , Fermentas), 2  $\mu\text{l}$  3M octanu sodného a 50  $\mu\text{l}$  96% čistého etanolu. Směs byla důkladně promíchána a po 15 minutové inkubaci při laboratorní teplotě byla provedena centrifugace při 13200 otáček .  $\text{min}^{-1}$  po dobu 30 minut ve stolní centrifuze Centrifuge 5415D (Eppendorf). Supernatant byl odstraněn pipetou. Pelet usazený na dně zkumavky byl propláchnut 250  $\mu\text{l}$  70% čistého etanolu. Vzorky byly následně odstředěny při 13200 otáček .  $\text{min}^{-1}$  po dobu 15 minut. Proces oplachování byl ještě jednou zopakován. Pelet byl po odsátí supernatantu vysušen v termobloku Bio TDB-120 (Biosan) při teplotě 50°C po dobu 45 minut. Vysušený pelet obsahující fragmenty DNA určené k sekvenaci byl následně rozpuštěn v 15  $\mu\text{l}$  Hi-Di formamidu. Takto připravené vzorky byly denaturovány v polypropylenových stripech v termocykleru C1000<sup>TM</sup> Thermal Cycler (BioRad) při teplotě 95°C po dobu 5 minut. Stripy byly po dobu denaturace zakryty PCR fólií. Po denuraci byly vzorky ochlazeny na teplotu 0°C a přeneseny do podavače kapilární elektroforézy.

Sekvenace PCR produktů byla provedena pomocí genetického analyzátoru ABI PRISM 310 Genetic Analyser (Applied Biosystems).

V tabulce 4 jsou uvedeny podmínky sekvenace včetně použitého modulu a separačního polymeru.

Tabulka 4: Podmínky sekvenace PCR produktů

Parametry separace	Hodnoty
Délka kapiláry (cm)	36
Modul	P4StdSeq(1ml)E
Polymer	POP4
Virtuální filtr	E
Doba nástřiku (s)	30
Napětí při nástřiku (kV)	1
Teplota při separaci (°C)	50
Napětí při separaci (kV)	11,3
Doba separace (minuty)	28

Výstupem sekvenační reakce byly chromatogramy utvořené programem DNA Sequencing Analysis Software ver. 5.1 (Applied Biosystems). Tímto programem byly získány také sekvence analyzovaných fragmentů.

#### 4.3.4 PCR-RFLP metoda umožňující odlišit některé haplotypy D-smyčky mtDNA u plemen československý vlčák a Saarloosův vlčák

Vzhledem k tomu, že na základě sekvenčních analýz byly u plemene československý vlčák identifikovány dva haplotypy mtDNA, byla navržena metoda na PCR-RFLP umožňující tyto dva haplotypy odlišit. Z porovnání sekvencí obou haplotypů vyplývá, že rozdíl se týkal mutačního místa označeného červeně na následujícím obrázku.

Obrázek 1: Odlišení A a B haplotypů československých vlčáků pomocí mutace typu substitute

Československý vlčák - haplotyp A  
 Československý vlčák - haplotyp B

240 250 260 270 280 290 300 310

CCTTACATAGGACATACTAACTCAATCTCATAAATTCACCTGATCTGTC AACAGTAACCGAATGCATATCACTTAGTCCAAT  
 .....T.....A.....T.....

Z obrázku 1 vyplývá, že se jedná o mutaci typu substituce. Sekvence obou haplotypů byly porovnány z hlediska výskytu variabilních restričních míst pomocí volně dostupné internetové aplikace Webcutter 2.0 (Heiman, 1997), která je volně dostupná na <http://rna.lundberg.gu.se/cutter2/>. Cílem této analýzy bylo zjistit, zda existuje restriční enzym, který je schopen tyto dva haplotypy odlišit.

Bylo zjištěno, že rozdíly mezi dvěma haplotypy u pleme CSV je možné odlišit štěpením enzymem *HincII*.

Pro tento experiment byla pomocí programu Primer3 (Rozen et al., 2012) navržena následující dvojice primerů mtDNA CZU1F: 5' CCCTTCTYCCCTCCCCTATGTAC 3' a CZU1R: 5' AGCGAGAAGAGGGACATTACGAG 3'. Tyto primery umožňovaly amplifikovat fragment o velikost 220 bp, ve kterém se nacházela substituční mutace uvedená na obrázku 1. Amplifikace probíhala v termocykleru C1000TM Thermal Cycler (BioRad).

Tabulka 5: Složení PCR reakce pro amplifikaci PCR-RFLP markeru mtDNA

Složka	Koncentrace
DNA	20 ng. 12,5 $\mu\text{l}^{-1}$
Tris-HCl, pH 8,8	10 mM
MgCl <sub>2</sub>	1,5 mM
KCl	50 mM
primer mtDNA CZU1F	0,4 $\mu\text{M}$
primer mtDNA CZU1R	0,4 $\mu\text{M}$
dNTP	200 $\mu\text{M}$
BSA	5 ng. 12,5 $\mu\text{l}^{-1}$
Enhancer - TMA oxalát (Top Bio)	2 mM
Taq polymeráza (Fermentas)	0,7 U . 12,5 $\mu\text{l}^{-1}$
Objem	12,5 $\mu\text{l}$

Tabulka 6: Teplotní a časový profil amplifikace PCR-RFLP markeru mtDNA

<b>Úvodní denaturace</b>	95 °C	180 sekund	1 cyklus
<b>Denaturace</b>	95 °C	30 sekund	35 cyklů
<b>Annealing</b>	65 °C	40 sekund	
<b>Prodlužování</b>	72 °C	40 sekund	
<b>Závěrečné prodlužování</b>	72 °C	420 sekund	1 cyklus

Amplifikace probíhala v termocykleru C1000TM Thermal Cycler (BioRad). Teplota annealingu byla vybrána na základě teplotního gradientu. Pro teplotní gradient bylo použito stejné složení reakce, které je uvedeno v tabulce xxx. Jednotlivé teploty gradientu byly následující: 59 °C; 59,4 °C; 56,2 °C; 61,4 °C; 62,8 °C; 64,0 °C; 64,7 °C; 65 °C. Výsledek amplifikace teplotního gradientu byl ověřen gelovou elektroforézou v 2% agarózovém gelu v prostředí 1x TBE pufru. Elektroforeogram byl vizualizován ethidiumbromidem.

Na základě výstupu programu Webcutter 2.0 (Heiman, 1997) byly predikovány velikosti restričních fragmentů u haplotypů A a B plemene československý vlčák, které vznikají při použití restriční endonukleázy *HincII*. V případě haplotypu A je předpokládáno restriční štěpení produktu na dva fragmenty o velikosti 87 bp a 133 bp. U haplotypu B k restričnímu štěpení nedochází.

Složení reakce pro restriční štěpení je uvedeno v následující tabulce.

Tabulka 7: Složení štěpicí reakce

<b>Složka</b>	<b>Množství</b>
<b>PCR produkt</b>	5 $\mu$ l
<b>10x TANGO pufr (Fermentas)</b>	2 $\mu$ l
<b><i>HincII</i> (10U . <math>\mu</math>l<sup>-1</sup>)</b>	0,5 $\mu$ l
<b>ddH<sub>2</sub>O</b>	12,5 $\mu$ l

PCR fragmenty byly štěpěny v termocykleru C1000TM Thermal Cycler (BioRad) při teplotě 30 °C po dobu 8 hodin. Pro detekci PCR-RFLP polymorfismu byla použita agarózová gelová separace v 5% gelu v prostředí 1x TBE pufru. Elektroforeogramy byly vizualizovány pomocí ethidiumbromidu.

## **4.4 Metody studia mikrosatelitních lokusů lokalizovaných na gonozómu Y**

### **4.4.1 Výběr SSR lokusů**

Pro tento experiment byly zvoleny mikrosatelitní lokusy lokalizované na gonozomu Y, které charakterizovali Olivier et al. (1999) a Bannasch et al. (2004). Pro detekci polymorfismu mikrosatelitních lokusů byl použit modifikovaný postup, který navrhli Hayden et al. (2008). Tito autoři použili dvoustupňovou PCR reakci, ve které jsou primerové páry ohraničující hledaný polymorfismus prodlouženy na 5' konci o sekvenci o délce 14, resp. 16 bází. Ve druhém stupni amplifikaci do reakce vstupuje druhý primerový pár, který vykazuje komplementaritu právě k sekvenci, o kterou byly prodlouženy původní dva primery. Jeden z dvojice primerů pro druhou amplifikaci je fluorescenčně značen a umožňuje tak následnou fragmentační analýzu s využitím kapilární elektroforézy.

### **4.4.2 Sekvence použitých primerů a první amplifikace**

Pro experimenty byly použity následující dvojice primerových párů, jejichž sekvence je odvozena z výsledků experimentů Olivier et al. (1999) a Bannasch et al. (2004). Tato sekvence je v textu označena modrou barvou. Prodloužení primerů na 5' konci, které bylo provedeno na základě výsledků Hayden et al. (2008), je znázorněno červenou barvou.

Tabulka 8: Sekvence primerů a označení markerů použitých pro studium variability mikrosatelitních lokusů umístěných na gonozómu Y

Markery na gonozómu Y	Sekvence primerů
<b>Marker 1</b>	MS34F: 5'ACGACGTTGTAAAAAAGCATTCTCTTCCAGTTGGTC 3'
	MS34R: 5'CATTAAGTTCCCATTAAGGTCCCCTTTTGCCATAGTGT 3'
<b>Marker 2</b>	MS34AF: 5'ACGACGTTGTAAAAAGCCATTCCTGGCCGAGTGG 3'
	MS34R: 5'CATTAAGTTCCCATTAAGGTCCCCTTTTGCCATAGTGT 3'
<b>Marker 3</b>	MS34BF: 5'ACGACGTTGTAAAAAGCCATTCCTGGCCGAGTCC 3'
	MS34R: 5'CATTAAGTTCCCATTAAGGTCCCCTTTTGCCATAGTGT 3'
<b>Marker 4</b>	MS34F: 5'ACGACGTTGTAAAAAAGCATTCTCTTCCAGTTGGTC 3'
	MS34CAR: 5'CATTAAGTTCCCATTAAGAACCATCATTGTGTATGTGAA 3'

Na rozdíl od multiplex PCR, který použili Hayden et al. (2008), byla v diplomové práci použita dvoustupňová PCR. V prvním kroku byla provedena amplifikace neznačených PCR produktů s využitím následujícího složení reakce a teplotního profilu (tabulka 9). Podmínky amplifikace byly identické pro všechny mikrosatelitní lokusy uvedené v tabulce 10.



Tabulka 9: Složení první PCR pro amplifikaci SSR markerů gonozómu Y

Složka	Koncentrace
DNA	20 ng. 12,5 $\mu\text{l}^{-1}$
Tris-HCl, pH 8,8	10 mM
MgCl <sub>2</sub>	1,5 mM
KCl	50 mM
F primer (viz. tabulka 8)	0,4 $\mu\text{M}$
R primer (viz. tabulka 8)	0,4 $\mu\text{M}$
dNTP	200 $\mu\text{M}$
BSA	5 ng. 12,5 $\mu\text{l}^{-1}$
Enhancer - TMA oxalát (Top Bio)	2 mM
Taq polymeráza (Roche)	0,7 U . 12,5 $\mu\text{l}^{-1}$
Objem	12,5 $\mu\text{l}$

Tabulka 10: Teplotní profil PCR pro amplifikaci SSR markerů gonozómu Y

Úvodní denaturace	95 °C	180 sekund	1 cyklus
Denaturace	95 °C	30 sekund	35 cyklů
Annealing	64 °C	60 sekund	
Prodlužování	72 °C	60 sekund	
Závěrečné prodlužování	72 °C	300 sekund	1 cyklus

Amplifikace probíhala v termocykleru C1000<sup>TM</sup> Thermal Cycler (BioRad). Teplota annealingu byla vybrána na základě teplotního gradientu, který byl použit pro všechny páry primerů uvedené v tabulce 8. Pro teplotní gradient bylo použito stejné složení reakce, které je uvedeno v tabulce 9. Jednotlivé teploty gradientu byly následující: 56 °C; 56,7 °C; 58 °C; 60 °C; 62,4 °C; 64,3 °C; 65,5 °C; 66 °C. Výsledek amplifikace teplotního gradientu

byl ověřen gelovou elektroforézou v 2% agarózovém gelu v prostředí 1x TBE pufru. Elektroforeogram byl vizualizován ethidiumbromidem.

#### **4.4.3 Sekvence primerů umožňující značení fragmentů a druhá amplifikace**

Pro označení amplifikovaných produktů byla použita druhá amplifikace s dvojicí primerů, které navrhli Hayden et al. (2008). Jednalo se o následující primerový pár:

taqF: 5' ACGACGTTGTAAAA 3'

taqR: 5' CATTAAGTTCCCATTA 3'

F- primer použitý v diplomové práci byl na 5'konci značen fluorescenčním barvivem FAM nebo VIC.

Pro druhou amplifikaci byl jako templát použit PCR produkt z první amplifikace, která byla popsána v předchozí kapitole. U každého PCR produktu bylo provedeno naředění, kdy k 1 $\mu$ l PCR produktu bylo přidáno 39  $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O. Do druhé PCR byl jako templát použit 1  $\mu$ l takto naředěného PCR produktu. Složení PCR reakce pro druhou amplifikaci je uvedeno v následující tabulce.

Tabulka 11: Složení druhé PCR pro amplifikaci SSR markerů gonozómu Y

Složka	Koncentrace
DNA	1 $\mu$ l . 12,5 $\mu$ l <sup>-1</sup>
Tris-HCl, pH 8,8	10 mM
MgCl <sub>2</sub>	1,5 mM
KCl	50 mM
primer taqF	0,4 $\mu$ M
primer taqR	0,4 $\mu$ M
dNTP	200 $\mu$ M
BSA	5 ng. 12,5 $\mu$ l <sup>-1</sup>
Enhancer - TMA oxalát (Top Bio)	2 mM
Taq polymeráza (Roche)	0,7 U . 12,5 $\mu$ l <sup>-1</sup>
Objem	12,5 $\mu$ l

Tabulka 12: Teplotní profil PCR pro amplifikaci SSR markerů gonozómu Y

Úvodní denaturace	95 °C	180 sekund	1 cyklus
Denaturace	95 °C	30 sekund	35 cyklů
Annealing	46 °C	60 sekund	
Prodlužování	72 °C	60 sekund	
Závěrečné prodlužování	72 °C	300 sekund	1 cyklus

Amplifikace probíhala v termocykleru C1000<sup>TM</sup> Thermal Cycler (BioRad). Teplota annealingu byla vybrána na základě teplotního gradientu, který byl použit pro všechny páry primerů uvedené v tabulce 8. Pro teplotní gradient bylo použito stejné složení reakce, které je uvedeno v tabulce xxx. Jednotlivé teploty gradientu byly následující: 40 °C; 40,6 °C; 42 °C; 43,9 °C; 46,3 °C; 48,3°C; 49,4 °C; 50°C. Výsledek amplifikace teplotního gradientu byl

ověřen gelovou elektroforézou v 2% agarózovém gelu v prostředí 1x TBE pufru. Elektroforeogram byl vizualizován ethidiumbromidem.

Pro markery 1 a 3 uvedené v tabulce 8 byl použit ve druhé amplifikaci primer F-taq značený fluorescenčním barvivem FAM. Pro markery 2 a 4 byl použit primer F-taq značený fluorescenčním barvivem VIC.

#### 4.4.4 Příprava vzorků amplifikovaných SSR markerů gonozómu Y pro fragmentační analýzu

Před fragmentační analýzou byly vzorky naředěny pomocí apyrogenní ddH<sub>2</sub>O podle schématu uvedeného v tabulce.

Tabulka 13: Příprava a ředění vzorků pro fragmentační analýzu

Složka	Směs markerů A	Směs markerů B
<b>PCR produkt</b>	2 µl marker 1 2 µl marker 3	2 µl marker 2 2 µl marker 4
<b>ddH<sub>2</sub>O</b>	48 µl	48 µl

Ke směsi vzorků vyplývajících z tabulky 13 byl přidán Hi-Di formamid (Applied Biosystems). Velikost amplifikovaných fragmentů byla provedena použitím velikostního standardu GeneScan<sup>TM</sup> – 600 LIZ® Size Standard (Applied Biosystems). Denaturace PCR produktů probíhala v termocykleru C1000<sup>TM</sup> Thermal Cycler (BioRad) ve stripech určených pro kapilární elektroforézu zakrytých speciální fólií. Po denuraci byly vzorky ochlazeny na 4 °C. Následující tabulky uvádějí podmínky přípravy vzorků.

Tabulka 14: Ředění směsi ampliconů

<b>Vzorek pro fragmentační analýzu</b>		
<b>Směs PCR produktů (µl)</b>	<b>LIZ 600 (µl)</b>	<b>Hi-Di formamid (µl)</b>
1	0,2	15

Tabulka 15: Denaturace směsi amplikonů před fragmentační analýzou

<b>Denaturace</b>	95 °C	600 sekund
<b>Ochlazení</b>	4 °C	600 sekund

#### 4.4.5 Podmínky fragmentační analýzy multiplex-SSR markerů

Fragmentační analýza probíhala použitím kapilární elektroforézy ABI PRISM 310 Genetic Analyser (Applied Biosystems). Podmínky separace viz. tabulka 16.

Chromatogramy byly vyhodnoceny na základě programu GeneMapper 4.1 (Applied Biosystems).

Tabulka 16: Podmínky fragmentační analýzy SSR markerů lokalizovaných na gonozómu Y

<b>Parametry separace</b>	<b>Multiplex</b>
<b>Délka kapiláry (cm)</b>	36
<b>Modul</b>	P4StdSeq(1ml)E
<b>Polymer</b>	POP4
<b>Virtuální filtr</b>	E
<b>Doba nástřiku (s)</b>	30
<b>Napětí při nástřiku (kV)</b>	1
<b>Teplota při separaci (°C)</b>	50
<b>Napětí při separaci (kV)</b>	11,3
<b>Doba separace (minuty)</b>	28

## 4.5 Bioinformatické a statistické zpracování získaných molekulárních dat

### 4.5.1 Konstrukce rodokmenů

Pro vyhodnocení genetické stability haplotypů mtDNA byli použiti zástupci plemene Československý vlčák, kteří původ cytoplazmy odvozují od feny zakladatelky- německý

ovčák Guma z Pohraniční stráže. Potomci odvozeni od této feny mají relativně malé zastoupení v populaci současně žijících československých vlčáků. Z databáze vzorků DNA, které jsou k dispozici na Katedře genetiky a šlechtění FAPPZ ČZU v Praze, byli vybráni takoví jedinci, které je možné označit z hlediska dědičnosti cytoplazmy jako identické s holotypem, který měla Guma z Pohraniční stráže. Pro vytvoření rodokmenu, který umožní graficky vyjádřit propojení těchto jedinců, byl použit volně dostupný program MyHeritage Version 7.0.0 (<http://www.myheritage.com>).

#### **4.5.2 Porovnání získaných sekvencí D-smyčky mtDNA**

Pro porovnání sekvencí - haplotypů D-smyčky mtDNA byl použit program BioEdit version 7.0.5.2 (Hall, 1999). Tento program porovnává sekvence na principu algoritmu programu Clustall. Získané sekvence u jednotlivých haplotypů byly porovnány s využitím funkce ClustallW Multiple alignment. V nabídce byly zvoleny možnosti: Full multiple alignment; Bootstrap NJ tree. Mnohočetné porovnání sekvencí bylo provedeno na základě 1 000 000 bootstrapů. Z výsledků sekvenování prováděného v rámci řešení diplomové práce a z výsledků sekvencí publikovaných v nukleotidové databázi NCBI byly stanoveny jednotlivé haplotypy pro grafické vyjádření mutačních míst, kterými se jednotlivé haplotypy odlišují, byl použit rovněž program BioEdit. Porovnané sekvence byly následně uloženy ve formátu FASTA, který je přístupný pro další programy umožňujících konstruovat kladogramy.

#### **4.5.3 Konstrukce kladogramů na základě sekvenčních polymorfismů D-smyčky mtDNA**

Sekvenční polymorfismy D-smyčky mtDNA jsou často využívány jako vstupní data pro konstrukci kladogramů, které graficky vyjadřují vzájemnou podobnost a potenciální fylogenetickou příbuznost hodnocených sekvencí. Proto byla získaná data vyhodnocena i pomocí programu MEGA6 version 6.0 (Tamura et al., 2013), který umožňuje konstruovat kladogramy pomocí různých algoritmů. Kladogramy, které byly konstruovány při řešení diplomové práce, měly charakter zakořeněných kladogramů. Pro zakořenění dostupných dat byla zařazena sekvence D-smyčky mtDNA nepříbuzného druhu *Canis latrans* (FM209391.1). Jako vstupní data pro program MEGA6 byly použity dva typy údajů. Za prvé byly hodnoceny sekvence D-smyčky mtDNA u všech zástupců plemen zoologických druhů a jejich kříženců. Za druhé byly hodnoceny sekvence jednotlivých haplotypů, které byly identifikovány v programu BioEdit.

U obou dvou vstupních datových souborů byl nejprve vybrán optimální model, který zohledňuje frekvence mutací odlišujících jednotlivé haplotypy. V programu MEGA6 byla použita funkce Find Best DNA models. Model, který nejvíce vyhovuje molekulárním datům, byl vybrán na základě parametru BIC (Bayesian Information Criterion), který pro tyto účely používali například Nei a Kumar (2000). Nejnižší hodnota BIC svědčí o nejvhodnějším modelu. Pro konstrukci kladogramů na základě sekvencí všech hodnocených zástupců plemen tento požadavek splňoval model K2+G podle Kimura (1980). Pro konstrukci kladogramu na základě sekvencí jednotlivých haplotypů byly jako nejvhodnější vybrány modely HKY (Hasegawa-Kishino-Yano model) (Hasegawa et al., 1985) a T92 (Tamura, 1992).

Pro vlastní konstrukci kladogramů byly použity následující metody shlukové analýzy: metoda maximální věrohodnosti (ML, Maximum Likelihood), (NJ, Neighbor-Joining), metoda minimální evoluce (MINEVOL, minimum evolution), shlukovací analýza (UPGMA, Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean), metoda maximální úspornosti (MP, Maximum Parsimony). U každé výše uvedené metody byla pro konstrukci kladogramu použita funkce tvorby konsenzu stromů. V kladogramu byly ponechány pouze takové větve, které spojovaly jedince při více než 50 % bootstrapů. Větve, které byly vytvořeny na základě méně než 50 % bootstrapů, byly pomocí programu MEGA6 odstraněny. Pro finální grafické vyjádření podobností jednotlivých kladogramů byla použita kruhová forma.

## 5 Výsledky

### 5.1 Kvalita a kvantita izolované DNA

Množství extrahované DNA získané z jednoho cytologického stěru pomocí kartáčku bylo dostatečné pro následující zpracování. Průměrné množství DNA získané z jednoho cytologického kartáčku bylo rovno 4300 ng, variabilita výtěžnosti DNA ( $V_k$ ) byla 12,7 %. Poměr absorbancí A260/A280 dosahoval průměrné hodnoty 1,93 s variačním koeficientem 7,9 %. Poměr absorbancí A260/A230 měl průměrnou hodnotu 2,16 s variačním koeficientem 9,6 %. Všechny tyto parametry odpovídaly vysoce čisté genomické DNA. Cílem diplomové práce nebyla analýza těchto parametrů, avšak tyto parametry jsou důležité pro aplikaci mikrosatelitních markerů.

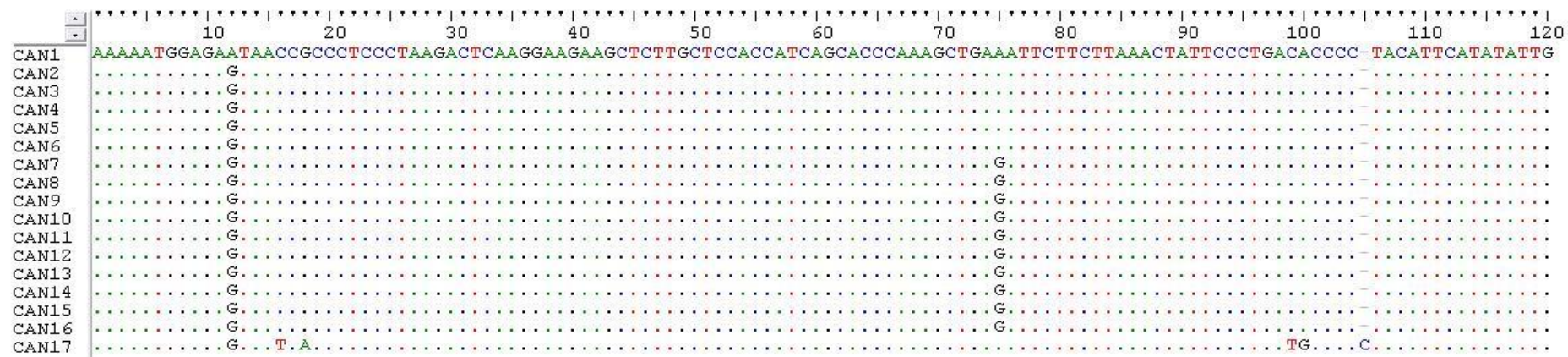
### 5.2 Variabilita D-smyčky mtDNA

#### 5.2.1 Identifikované haplotypy D-smyčky mtDNA

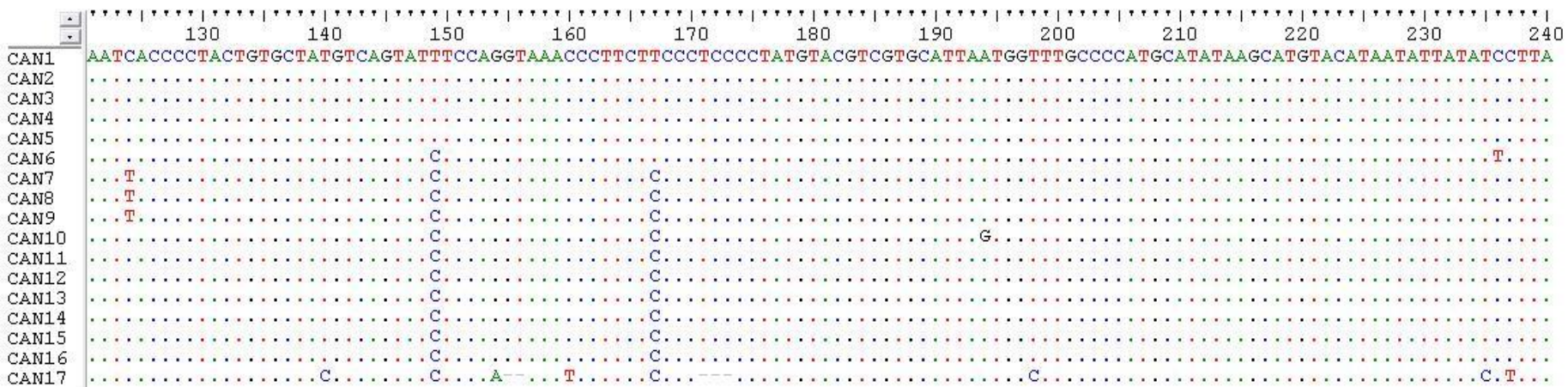
Na následujících obrázcích jsou uvedeny sekvence jednotlivých skupin haplotypů identifikované v D-smyčce mtDNA u plemen hodnocených při řešení diplomové práce a u plemen charakterizovaných v mezinárodní databázi NCBI.



Obrázek 2: Sekvence haplotypů 1. část



Obrázek 2: Sekvence haplotypů 2. část





Tabulka 17: Přehled zástupců plemen psů u jednotlivých haplotypů – 1. část

Haplotyp	Plemeno
CAN1	Havanský psík EU408279.1
	Německý špic trpasličí EU408291.1
	Norský losí pes šedý DQ480501.1
	Ruský černý teriér DQ 480493.1
CAN2	Československá vlčák haplotyp A ČZU
	Německý ovčák DQ480489.1
	Anglický buldok ČZU
	Kavkazský pastevecký pes ČZU
	Curly coated retriever ČZU
	Německý ovčák ČZU
	Ruský černý teriér ČZU
CAN3	Západosibiřská lajka ČZU
CAN4	Dobrman JN182114.1
CAN5	Americký pitbulteriér EU408293.1
CAN6	<i>Canis lupus lupus</i> AM711902.1
CAN7	Bernský salašnický pes HM561544.1
	Dobrman HM561532.1
	Německá doga EU408276.1
	Francouzský buldoček EU408275.1
	Leonberg AY656750.1
	Knírač střední AY656746.1
	Španělský mastin ČZU
CAN8	Francouzský buldoček HM561538.1
	Německý boxer HM561533.1
CAN9	Svatobernardský pes ČZU
	Bernský salašnický pes ČZU
	Německá doga ČZU

Tabulka 17: Přehled zástupců plemen psů u jednotlivých haplotypů – 2. část

<b>CAN10</b>	Novofundlandský pes EU408287.1
<b>CAN11</b>	Bulteriér HM561531.1
	Labradorský retriever HM561534.1
	Flanderský bouvier HM561545.1
	Zlatý retriever HM561537.1
	Cane Corso Italiano ČZU
	Německý pinč HM561528.1
	Německý boxer HM561525.1
	Italský chrtík EU408280.2
	Mops EU408294.1
	Anglický mastif EU408274.1
	Bordeauxská doga EU408250.1
	Kavalír King Charles španěl EU408263.1
	Bišonek EU408250.1
	Erdelteriér AY656748.1
	Flat coated retriever ČZU
	Labradorský retriever ČZU
	Zlatý retriever ČZU
	Hovawart ČZU
	Nova Scotia duck tolling retriever ČZU
<b>CAN12</b>	Irský vlkodav HM561536.1
	Irský vlkodav ČZU
<b>CAN13</b>	Neapolský mastin ČZU
<b>CAN14</b>	Československý vlčák haplotyp B ČZU
	Saarloosův vlčák ČZU
	<i>Canis lupus lupus</i> ČZU
	<i>Canis lupus lupus</i> x <i>Canis lupus familiaris</i>



Tabulka 17: Přehled zástupců plemen psů u jednotlivých haplotypů – 3. část

<b>CAN14</b>	Rotvajler EU408295.1
	Sibiřský husky JN182116.1
	Rhodéský ridgback ČZU
	Greyhound JN182095.1
	Bukovinský ovčák HE687017.1
	Irský setr ČZU
	Foxteriér hrubosrstý HM561541.1
	Búrský buldog HM561539.1
	Jezevčík trpasličí EU408286.1
	Australský ovčák EU408249.1
<b>CAN15</b>	Tibetská doga ČZU
<b>CAN16</b>	Čivava EU408261.1
	Španělský galgo HM561526.1
	Pudl toy EU408302.1
	Sheltie EU408298.1
	Border kolie ČZU
	Jack russell teriér EU408281.1
	Výmarský ohař krátkosrstý ČZU
	Maďarský ohař krátkosrstý ČZU
	Maďarský ohař krátkosrstý EU408305.1
	Bobtail EU408273.1
	Jezevčík standard EU408272.1
	Anglický kokršpaněl EU408246.1
	Briard HM561542.1
	Cairn teriér HM561527.1
Landseer ČZU	
<b>CAN17</b>	<i>Canis latrans</i> FM209391.1

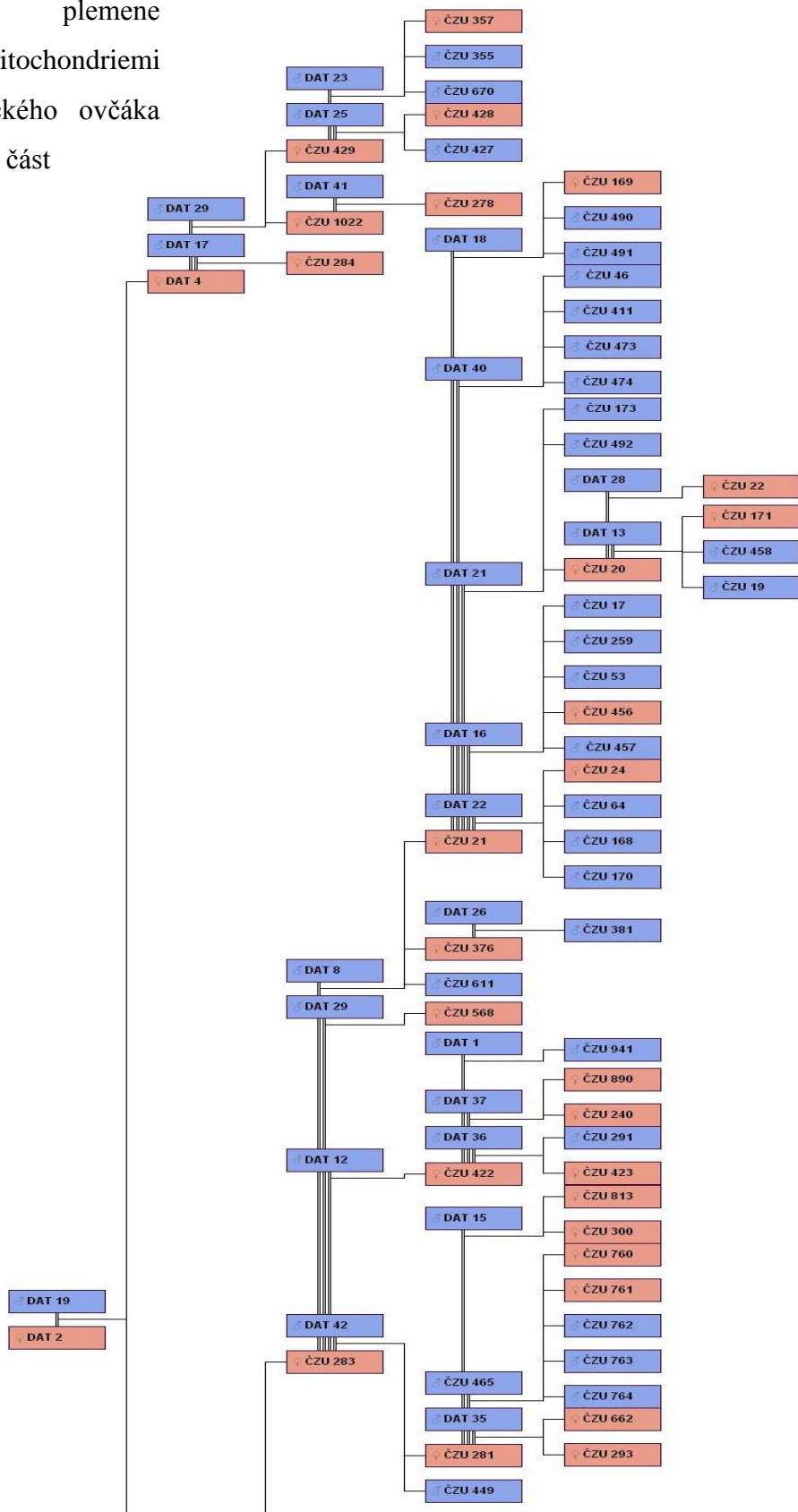
## **5.2.2 Původ mtDNA u plemen odvozených na základě křížení psa a vlka**

### **5.2.2.1 Československý vlčák**

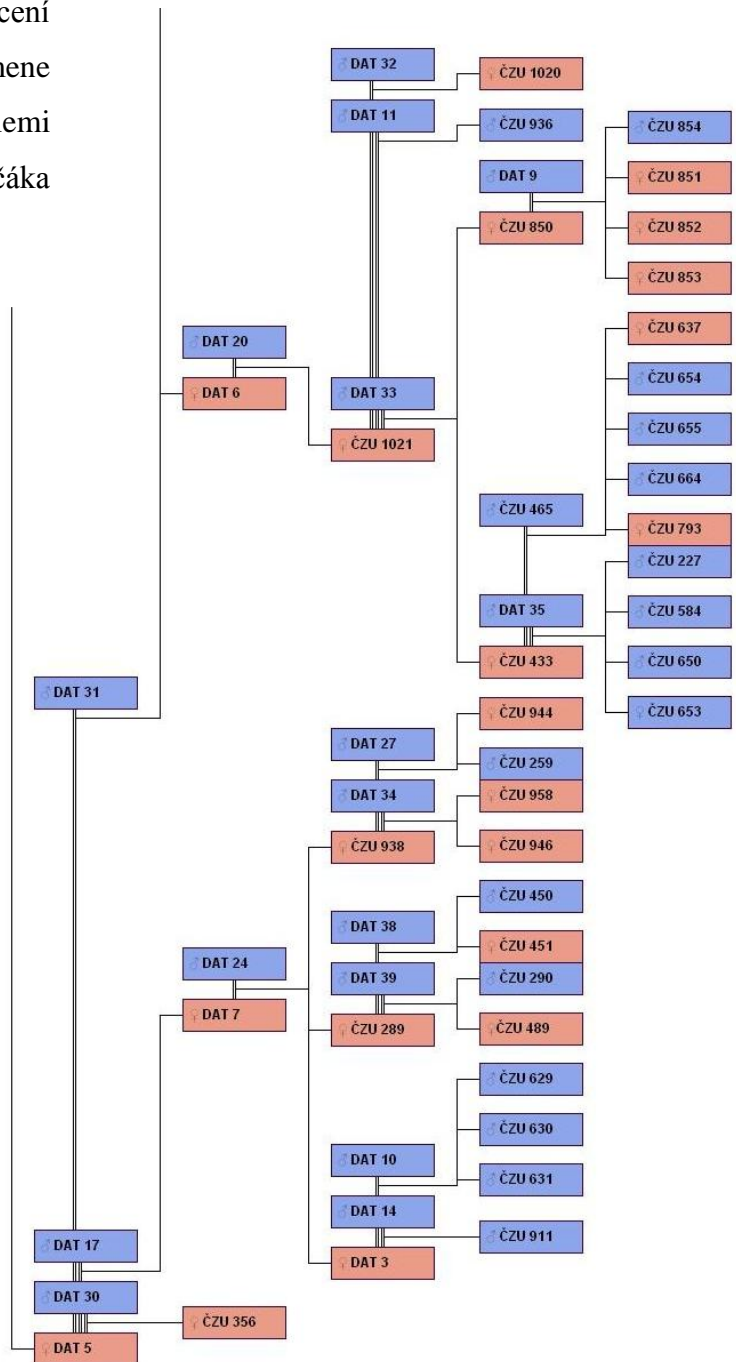
Na základě databáze byly vybrány a zkoumány haplotypy odvozené po 3 fenách - Adis z Nezbedova dvora, Asta z Koščakovho dvora, Guma z Pohraniční stráže. Tyto feny jsou matkami zakladatelkami a zároveň představitelkami plemene německý ovčák. Ani v jednom případě nebyla zakladatelkou vlčice. O tom svědčí fakt, že v rodokmenech nebyla přítomna žádná cytoplazma vlčice. PCR produkty získané od zvířat po Adis z Nezbedova dvora, Asta z Koščakovho dvora, Guma z Pohraniční stráže byly sekvenovány. Na základě sekvenační analýzy bylo prokázáno, že všech 63 jedinců, kteří mají svůj původ odvozený od feny německého ovčáka Asta z Koščakovho dvora, a všech 88 jedinců odvozených od feny Guma z Pohraniční stráže měli zcela identickou sekvenci D-smyčky mtDNA. Tato sekvence byla označena jako haplotyp A. Sekvenační analýza potvrdila, že všech 58 jedinců s mtDNA pocházející od feny Adis z Nezbedova dvora byli z hlediska sekvence zcela identičtí a současně se odlišovali od haplotypu A. Tato sekvence D-smyčky mtDNA byla označena jako haplotyp B. Haplotyp A je zařazen do velké skupiny CAN2 a haplotyp B do velké skupiny CAN14. Velké skupiny haplotypů vznikly na základě porovnání získaných sekvencí se sekvencemi mtDNA dalších plemen psů. Vytvoření a charakteristika velkých haplotypových skupin je uvedeno v kapitole 5.2.1.

Pro ověření zdali sekvence haplotypu je stabilní byla použita sekvenční analýza velkého počtu potomků, kteří mají mít teoreticky identickou cytoplazmu, respektive identický haplotyp D-smyčky mtDNA, jako měla Guma z Pohraniční stráže. Genealogické propojení hodnocených jedinců vyplývá z rodokmenu uvedeného na následujícím obrázku.

Obrázek 3: Genealogické hodnocení analyzovaných zástupců plemene československý vlčák s mitochondriemi pocházejícími z feny německého ovčáka Guma z Pohraniční stráže – 1. část



Obrázek 3: Genealogické hodnocení analyzovaných zástupců plemene československý vlčák s mitochondriemi pocházejícími z feny německého ovčáka Guma z Pohraniční stráže – 2. část



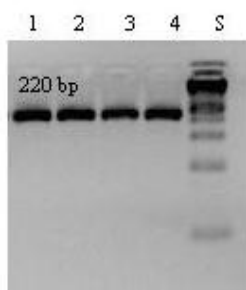
Jedinci v tomto rodokmenu označení ČZU a číslo jsou v databázi DNA Katedry genetiky a šlechtění FAPPZ ČZU v Praze. U těchto jedinců byla provedena sekvenační analýza. Tato analýza potvrdila, že všichni jedinci měli skutečně identický haplotyp, který odpovídá haplotypu A, resp. haplotypu CAN2.



## Odlišení haplotypů mtDNA u plemen ČSV metodou PCR-RFLP

Metoda PCR-RFLP byla aplikována na všechny hodnocené jedince, jejichž původ je odvozen od fen zakladatelek plemene - Adis z Nezbedova dvora, Asta z Koščakovho dvora, Guma z Pohraniční stráže. Konkrétní počty hodnocených jedinců jsou uvedeny v kapitole 4.1.1 Amplifikované produkty, které vznikly při použití primerů mtDNA CZU1F a CZU1R, byly elektroforeticky separovány a na základě porovnání s hmotnostním standardem bylo stanoveno, že jejich velikost odpovídá předpokládané velikosti 220 bp. Výsledek elektroforetické separace je dokumentován na následujícím obrázku.

Obrázek 4: Elektroforeogram separace amplifikovaných produktů před restrikcí



Na obrázku 4 představují dráhy 1 a 2 haplotyp československého vlčáka označený jako B, který je zařazen do komplexního haplotypu CAN14. Dráhy 3 a 4 odpovídají haplotypu A, který je zařazen do komplexního haplotypu CAN2. Písmenem S je na obrázku označen velikostní standard GeneRuler 100 bp DNA Ladder (Thermo Scientific). Z obrázku je patrné, že PCR reakce probíhala specificky a že výsledkem amplifikace byl jeden intenzivně amplifikovaný fragment.

Na obrázku 5 jsou znázorněny výsledky restrikčního štěpení. Označení drah je identické jako u předchozího obrázku. Je patrné, že u haplotypu A došlo ke kompletnímu rozštěpení amplifikovaného produktu - na elektroforeogramu jsou zřetelné dva fragmenty o velikosti 133 bp a 87 bp. Naopak u haplotypu B k restrikčnímu štěpení nedocházelo. Tyto výsledky jasně dokumentují, že metoda PCR-RFLP je použitelná pro identifikaci haplotypů A a B u plemene československý vlčák.

Obrázek 5: Elektroforeogram separace amplifikovaných produktů po restrikci



### 5.2.2.2 Saarloosův vlčák

Na základě studia databáze (<http://saarlooswolfdog.info/>) bylo stanoveno, že všichni současně žijící zástupci plemene Saarloosův vlčák nesou cytoplazmu jediné feny. Jedná se o fenu plemene německý ovčák Winda V. D. Kilstroom, jež se narodila v roce 1943. Tomuto závěru odpovídaly i výsledky molekulární sekvenční analýzy, které potvrdily u všech 27 hodnocených zástupců plemene Saarloosův vlčák identický haplotyp CAN 14.

### 5.2.2.3 Vlci a kříženci vlků se psem domácím

Variabilita D-smyčky mtDNA byla hodnocena u jedné samice evropského vlka a čtyř jejich potomků. Sekvenční analýzou bylo prokázáno, že všech pět jedinců má identický haplotyp mtDNA, který byl sekvenčně zařazen do skupiny CAN14. Rovněž všichni tři sourozenci vzniklí křížením arktické vlčice a německého ovčáka bez průkazu původu vykazovali haplotyp zařazený do skupiny CAN14.



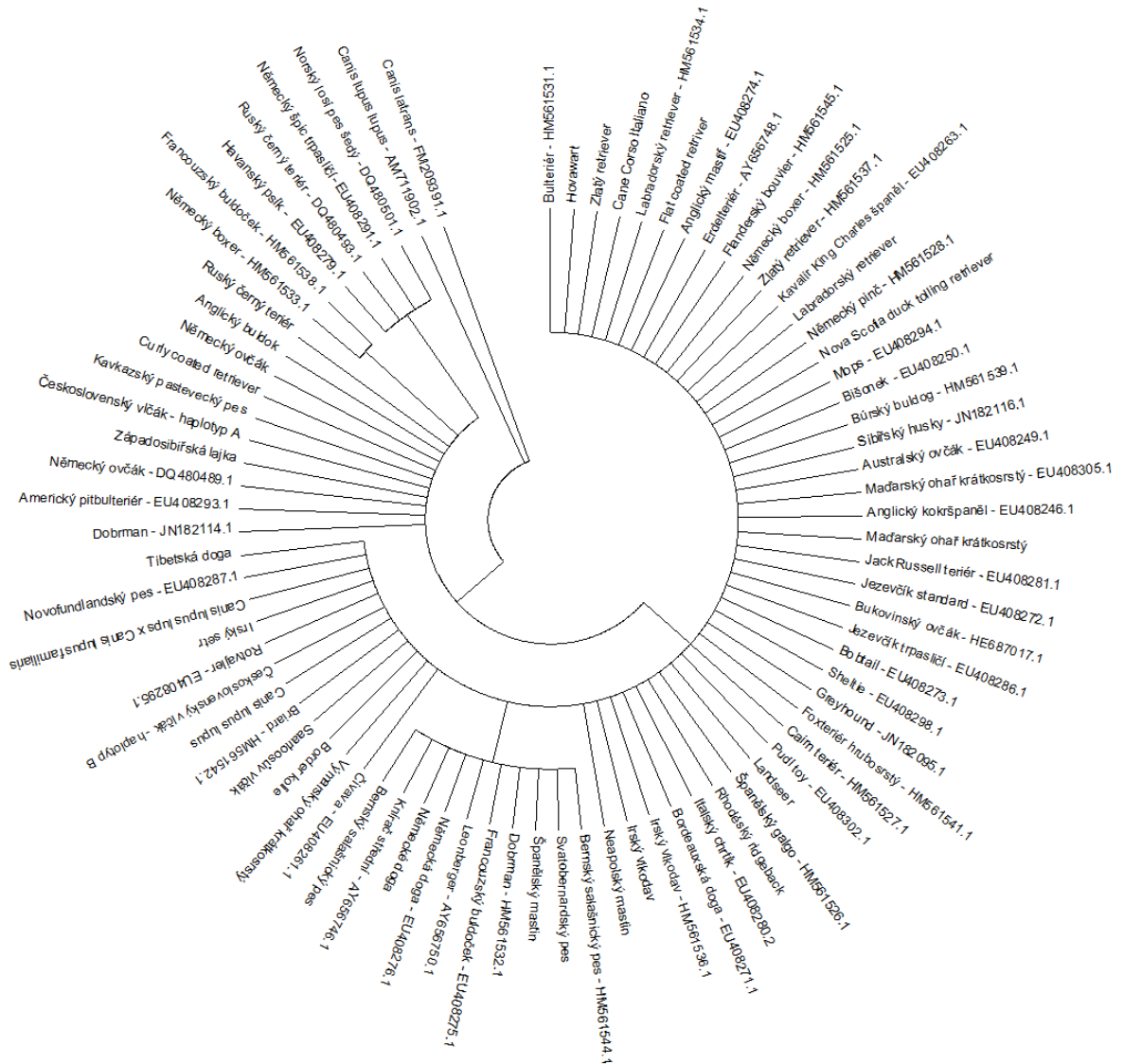
kódující sekvenci DNA, nevyházel použitý model s identifikace tripletů DNA odpovídajících jednotlivým kodónům.

Na obrázku 6 je zobrazen fylogenetický strom složený z představitelů jednotlivých skupin haplotypů. První velká skupina je tvořena CAN2, 15 a 17. Kde CAN17 je považována za kořen stromu. Strom dále tvoří větev složená ze skupiny CAN4 a 5. Následuje binární větvení skupin CAN1 a 8. Další velkou skupinu představuje CAN3, 6, 10, 16. Poslední větvení rozděluje skupiny CAN7 a 9 a CAN11 do samostatných větví. Mezi těmito větvemi se nachází skupina tří představitelů skupiny CAN12 a 13.





Obrázek 9: Kladogram sestrojený na základě použití metody UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean)



Kladogram uvedený na obrázku 9 byl sestaven na základě metody UPGMA. Celková délka větví tohoto kladogramu byla rovna 0,1139. Pro odhad evolučních vzdáleností byl použit rovněž 2-parametrový model podle Kimura (1980), který pracuje s gamma distribucí.

Z obrázku 9 vyplývá, že zakořeňující skupinou je CAN17 (*Canis latrans*). Další větev představuje skupinu CAN6 (*Canis lupus lupus* AM711902.1). Následuje větvení do 4 větví. První větev nese skupinu CAN1, CAN8 a větev skládající se z 3 skupin. První skupina CAN10, 14, 15, 16, druhá skupina CAN7, 9 a třetí skupina CAN11, 12, 13.



Obrázek 10: Kladogram sestavený na základě použití metody maximální parsimonie (MP, Maximal parsimony)



Kladogram byl sestaven pomocí metody maximální parsimonie. Index konzistence je u tohoto stromu roven 0,6364 a retenční index je roven 0,9463. Strom byl získán na základě SPR algoritmu (Subtree-Pruning-Regrafting) (Nei a Kumar, 2000).

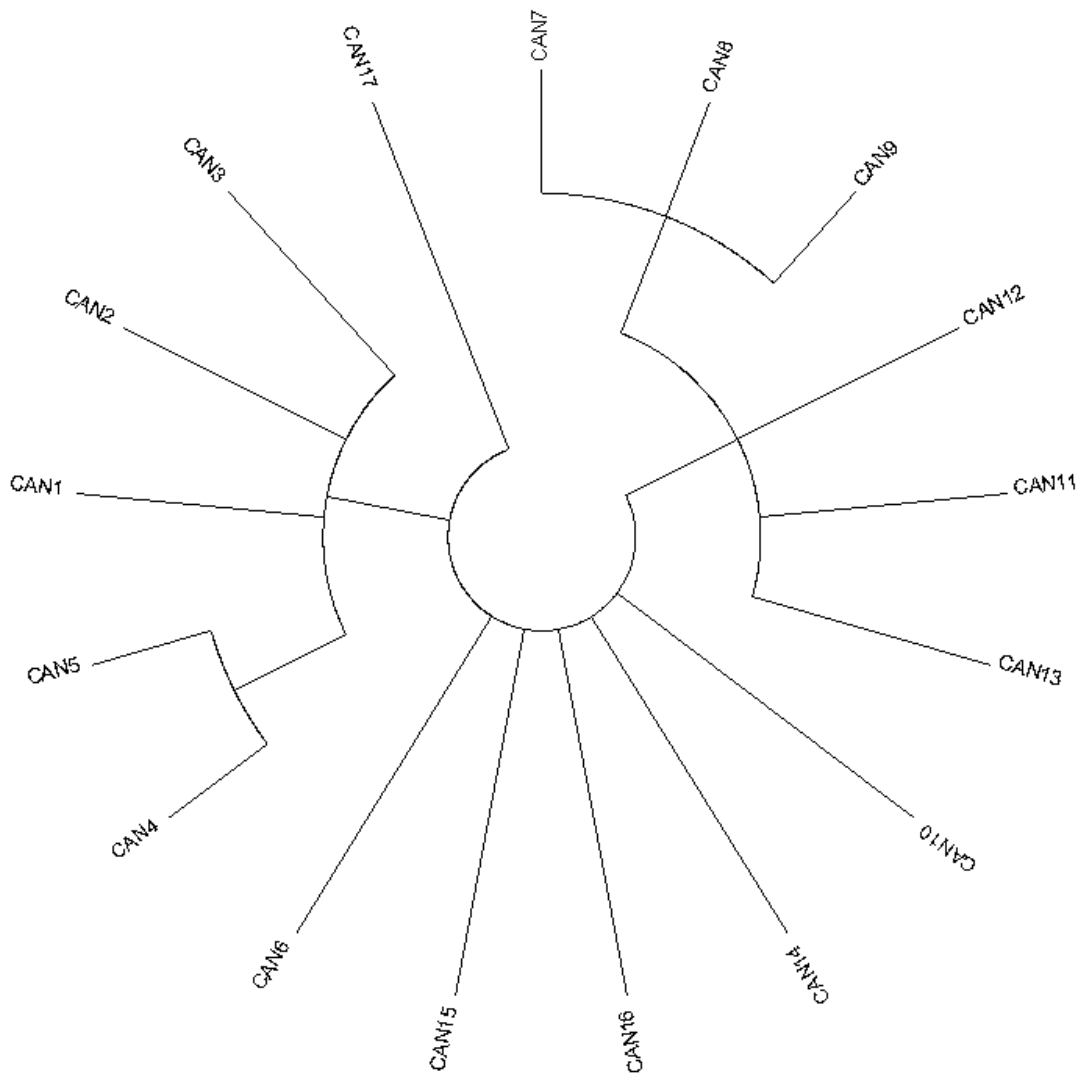
Na rozdíl od výše zmíněných obrázku, z obrázku 10 vyplývá, že *Canis latrans* není kořenem stromu. *Canis latrans* je součástí skupiny spolu s *Canis lupus lupus* a Tibetská doga. Nejvíce podobné haplotypy byly vygenerovány do jedné velké skupiny. Jedná se o skupiny CAN10, 14 a 16. Skupina CAN1, CAN2 a 3, CAN4 a 5, CAN8 jsou součástí jedné větve. Posledním větvením vznikly samostatné větve zahrnující skupiny CAN7 a 9, CAN12 a 13, a CAN11.



### **5.2.3.2 Konstrukce kladogramů na základě sekvencí D-smyčky mtDNA u jednotlivých haplotypů**

Z předcházející kapitoly je patrné, že všechny použité shlukovací metody vytvářely skupiny jedinců, kteří v mnoha případech neměli zcela identické sekvence D-smyčky mtDNA. Společně pro tyto skupiny byl obvykle minimální počet sekvenčních odlišností. Z důvodu větší přehlednosti vzniklých kladogramů byly shodné matematické modely použity i pro konstrukci kladogramů ze sekvencí 17 identifikovaných haplotypů D-smyčky mtDNA (CAN 1- CAN17).

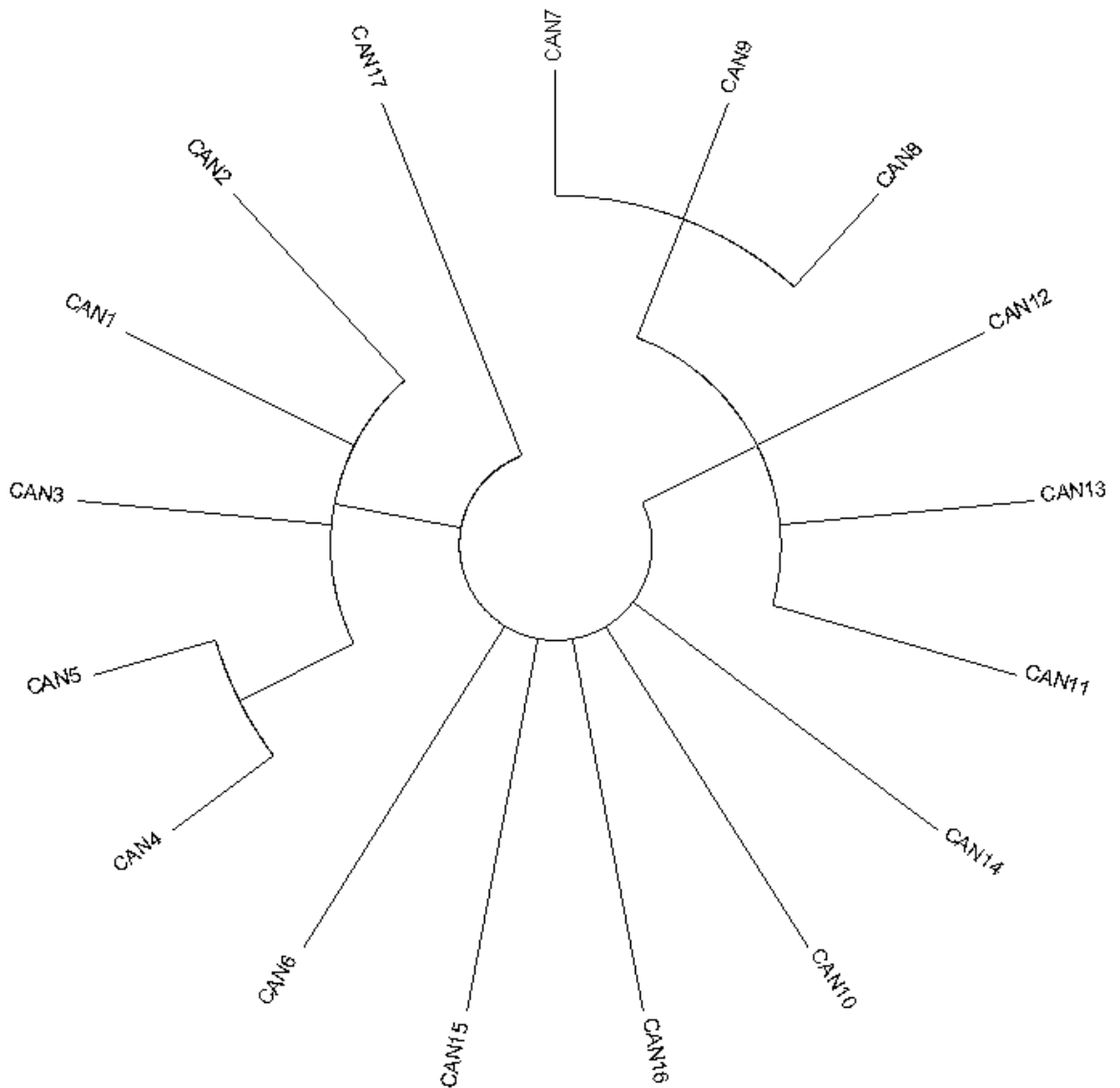
Obrázek 11: Kladogram sestrojený na základě použití metody maximální věrohodnosti (ML, Maximum likelihood)



Kladogram uvedený na obrázku 11 byl sestaven na základě metody ML, která je založena na modelu podle Hasegawa-Kishino-Yano (Hasegawa et al., 1985). Na obrázku je znázorněn strom, který vykazuje nejvyšší hodnotu logaritmu pravděpodobnosti (- 793,9365). Použitý model předpokládá rovněž odlišnou evoluční rychlost mezi jednotlivými skupinami genotypů.

Z obrázku 11 vyplývá, že kořenem stromu je skupina CAN17, kterou představuje *Canis latrans*. Jeho nejbližší skupinou je větev zahrnující skupinu CAN1,2,3 a společnou větev zahrnující CAN4 a 5. Nejvzdálenější skupinou je větev vzniklá spojením CAN7,8 a 9. Nejvíce podobné haplotypy byly vygenerovány do jedné skupiny.

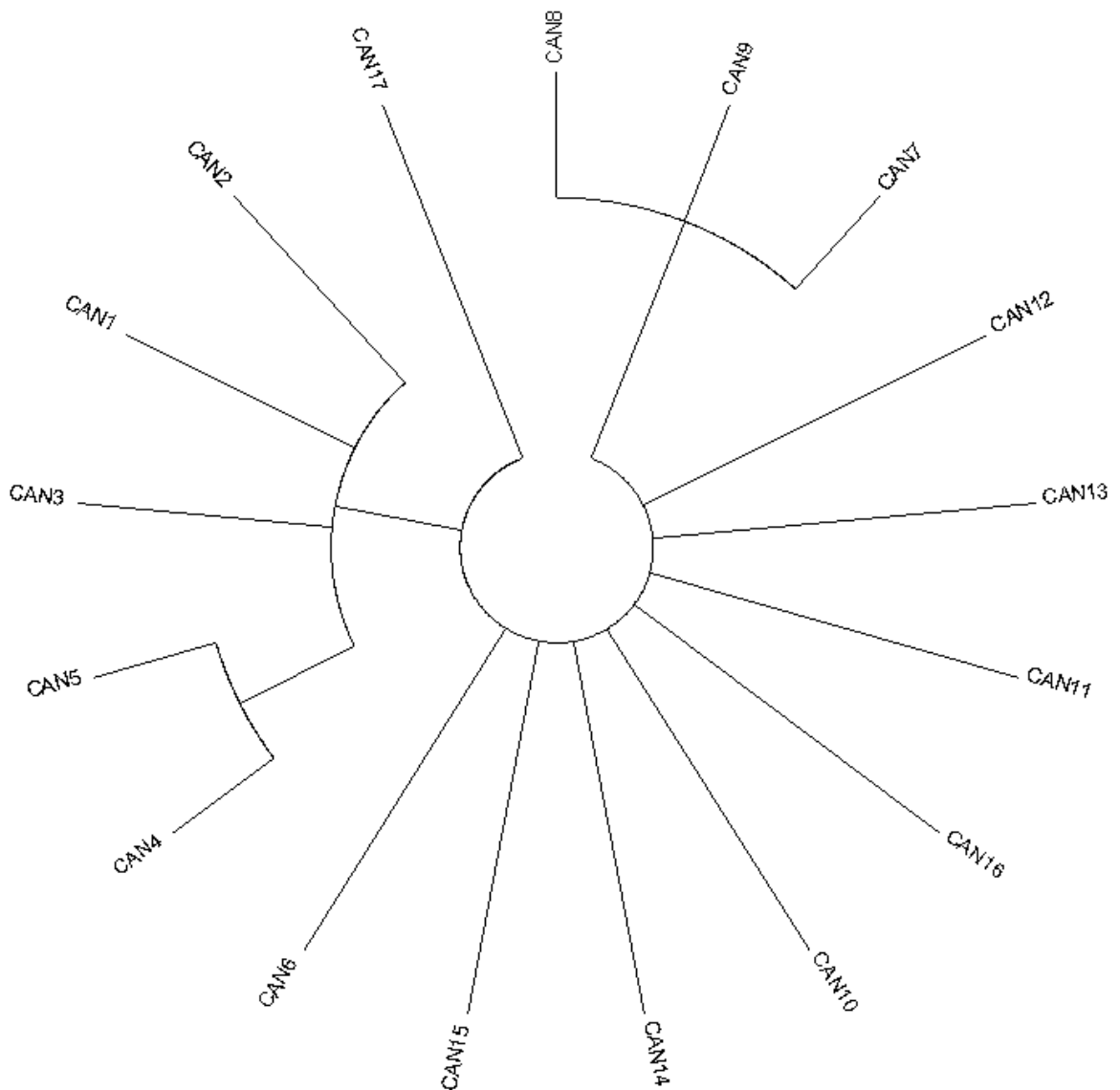
Obrázek 12: Kladogram sestavený na základě použití metody Neighbor-joining (NJ)



Kladogram byl sestaven pomocí metody Neighbor-joining (Saitou a Nei, 1987). Na obrázku 12 je zobrazen optimální kladogram, kde je součet délky větví roven 0,1172. Evoluční vzdálenost byla vypočítána pomocí 3-parametrového modelu (Tamura, 1992).

Z obrázku 12 vyplývá, že kořenem stromu je skupina CAN17, kterou představuje *Canis latrans*. Jeho nejbližší skupinou je větev zahrnující skupinu CAN1,2,3 a společnou větev zahrnující CAN4 a 5. Nejvzdálenější skupinou je větev vzniklá spojením CAN7,8 a 9. Nejvíce podobné haplotypy byly vygenerovány do jedné skupiny.

Obrázek 13: Kladogram sestrožený na základě použití metody Minimální evoluce (MINEVOL, Minimal evolution)



Evoluční historie byla vyvozena na základě metody Minimální evoluce (Rzhetsky a Nei, 1992). Obrázek 13 představuje optimální strom se součtem délky větví 0,1172. Evoluční vzdálenost byla vypočítána pomocí 3-parametrového modelu podle Tamury (1992).

Obrázek 13 zobrazuje kladogram jednotlivých skupin haplotypů. Zakořeňující skupinou je CAN17, jejíž představitelem je *Canis latrans*. Následuje větev skládající se ze skupin CAN1, 2, 3 a binární větve pro CAN4 a 5. Dále dochází k větvení skupin CAN6, 15, 14, 10, 16, 11, 13 a 12. Nejvzdálenější je větev pro skupinu CAN7, 8, 9.

Obrázek 14: Kladogram sestrojený na základě použití metody UPGMA



Na obrázku 14 je zobrazen optimální kladogram s celkovou délkou větví 0,1160 sestrojený použitím metody UPGMA (Sneath a Sokal, 1973). Evoluční vzdálenost byla vypočítána na základě 3-parametrového modelu (Tamura, 1992).

Z obrázku 14 vyplývá, že zakořeňující skupinou je CAN17. Další větev představuje skupina CAN6. Následuje dvojí větvení. První větev nese skupiny CAN1, 2, 3, 4, 5. Druhou větev tvoří skupiny CAN10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 a samostatná větev pro skupiny CAN7, 8 a 9.

Obrázek 15: Kladogram sestrožený na základě použití metody Maximální parsimonie (MP, Maximal parsimony)



Kladogram byl sestaven pomocí metody Maximální parsimonie. Index konzistence je u tohoto stromu roven 0,6190 a retenční index je roven 0,6638. Strom byl získán na základě SPR algoritmu (Subtree-Pruning-Regrafting) (Nei a Kumar, 2000).

Z obrázku 15 vyplývá, že na rozdíl od ostatních uvedených kladogramů, je kořenem stromu skupina CAN3. Druhou větev představuje skupina CAN2. Následují binární větvení skupin CAN1 a 8 a skupin CAN4 a 5. Další větev zahrnuje skupiny CAN6, 17, 15, 16, 10, 14 a samostatnou větev pro CAN11, 12, 13 a binární rozvětvení CAN7 a 9.

## 5.3 Variability mikrosatelitních markerů lokalizovaných na gonozómu Y

### 5.3.1 Identifikované haplotypy mikrosatelitních markerů gonozómu Y u plemen odvozených na základě křížení psa a vlka

Vzhledem k tomu, že použité markery 1 až 4 uvedené v tabulce 8 jsou lokalizovány na heterologní části Y gonozómu bylo předpokládáno, že u hodnocených jedinců samčího pohlaví bude vznikat jeden amplikon. Bannasch et al. (2004) uvádějí, že dvojice primerů MS34F a MS34R (Marker 1) poskytuje dva amplikony u samčích jedinců. Při řešení diplomové práce jsem toto zjištění potvrdila. U všech hodnocených jedinců bez ohledu na genetickou příslušnost a bez ohledu na původ gonozómu Y Marker 1 poskytoval vždy dva amplikony o rozdílné velikosti. Ostatní markery (Marker 2, 3 a 4) amplifikovaly předpokládaný jeden PCR produkt.

### 5.3.2 Vztah mezi haplotypy a původem gonozómu Y u plemene československý vlčák

U plemene československý vlčák mikrosatelitní Markery 1 a 3 dokázaly spolehlivě identifikovat gonozóm Y pocházející z vlka (Šarik) a německého ovčáka (Treu von Hildakloster). Velikosti SSR alel u jednotlivých markerů jsou uvedeny v následující tabulce.

Tabulka 18: Velikosti SSR alel markerů gonozómu Y u plemene československý vlčák

Původ gonozómu Y	Velikosti (bp) alel SSR markerů			
	Marker 1	Marker 2	Marker 3	Marker 4
Vlk Šarik	395 a 404	197	204	340
Německý ovčák Treu von Hildakloster	397 a 402	197	202	340

### 5.3.3 Vztah mezi haplotypy a původem gonozómu Y u plemene Saarloosův vlčák

Vzhledem k tomu, že u všech současných zástupců plemene Saarloosův vlčák gonozóm Y pochází z německého ovčáka Gerard van de Fransenum, nebyla předpokládána variabilita Markerů 1 až 4 u hodnocených samců. Tento předpoklad byl potvrzen u všech 15 hodnocených zástupců samčího pohlaví. Byl identifikován stejný haplotyp SSR markerů

gonozómu Y jako haplotyp československých vlčáků s gonozómem Y pocházejícím z německého ovčáka Treu von Hildakloster - tabulka 18.

#### **5.3.4 Vztah mezi haplotypy a původem gonozómu Y u vlka a kříženců vlka a psa**

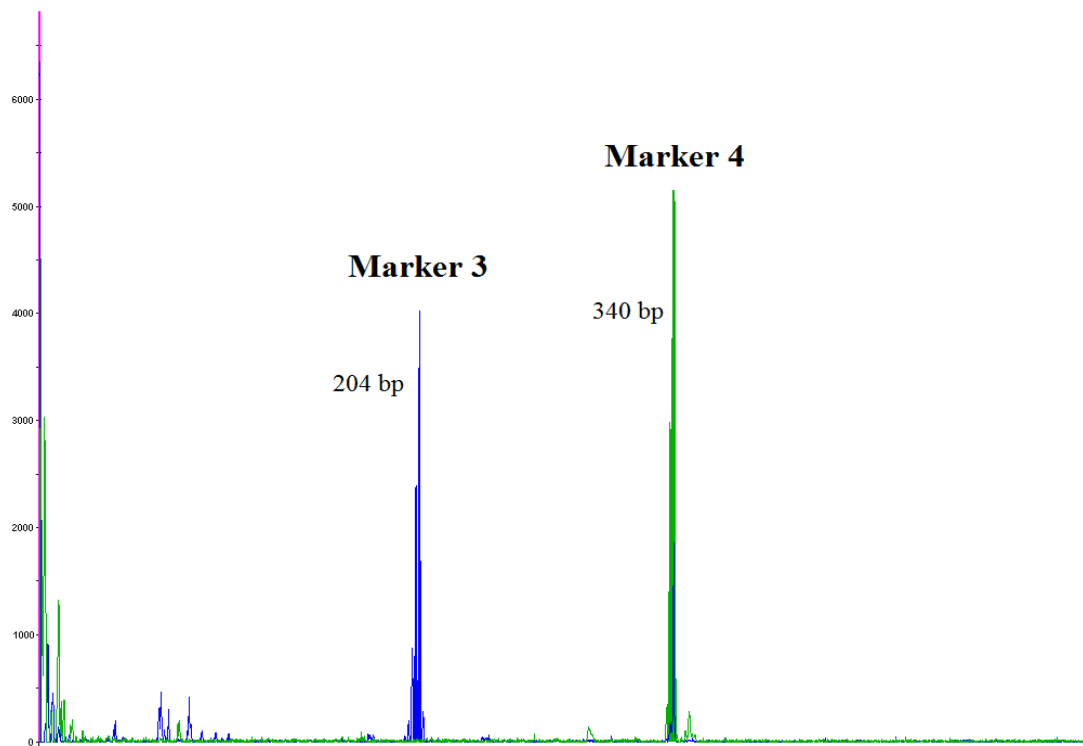
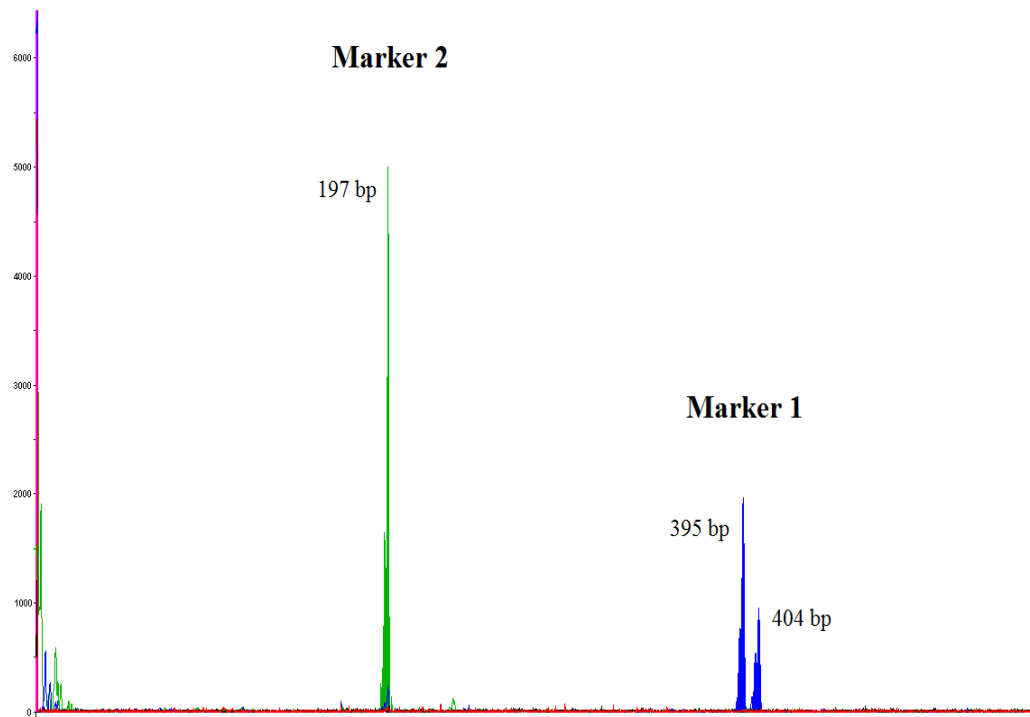
U třech sourozenců samčího pohlaví vlka evropského byl předpokládán identický haplotyp SSR markerů gonozómu Y. Všichni sourozenci museli získat gonozóm Y od svého otce. Tento předpoklad byl potvrzen, všichni tři sourozenci měli identický haplotyp, který se shodoval s haplotypem československých vlčáků odvozených od vlka Šarika – tabulka 18.

Hodnocen byl rovněž jeden hybrid F1 generace mezi arktickou vlčicí a německým ovčákem bez průkazu původu. Haplotyp tohoto psa byl identický s haplotypem československých vlčáků odvozených od německého ovčáka Treu von Hildakloster - tabulka 18.

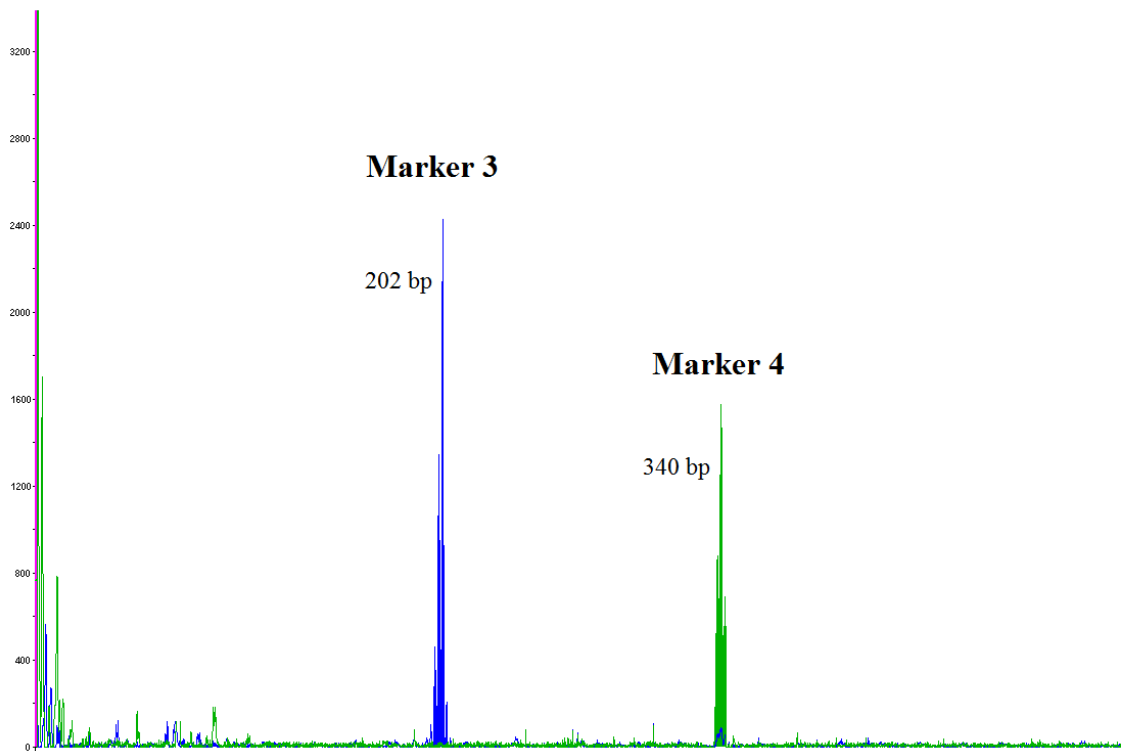
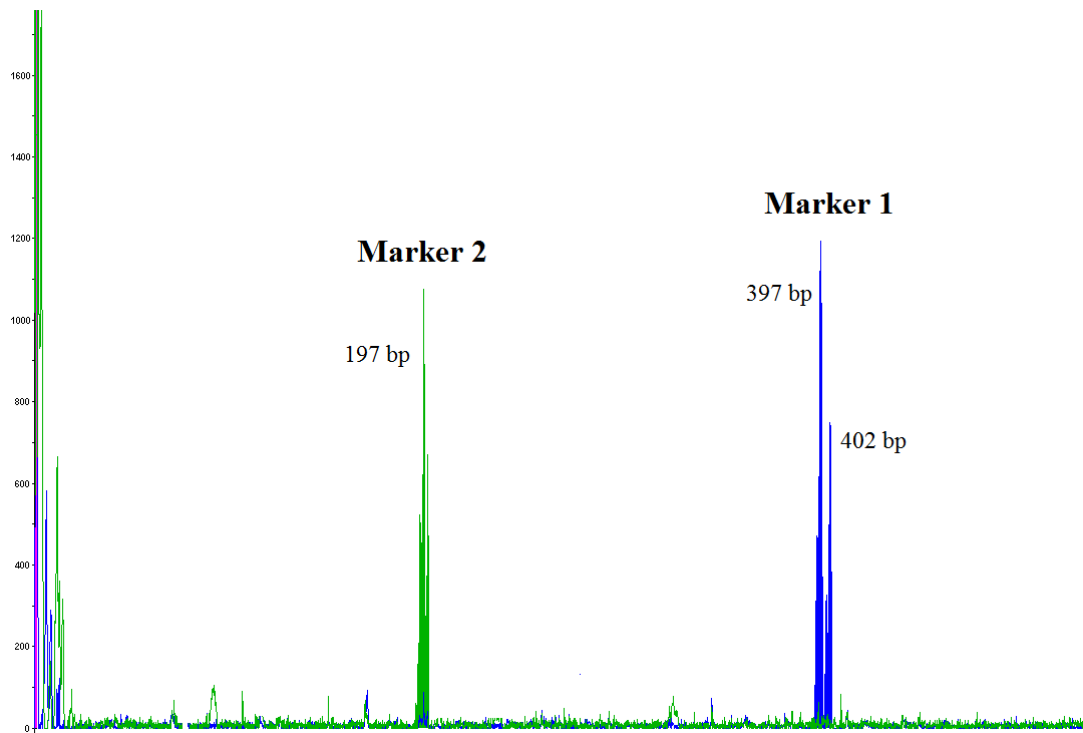
Na následujících obrázcích jsou uvedeny výstupy programu GeneMapper 4.1 (Applied Biosystems), ze kterých vyplývají velikosti alel použitých mikrosatelitních markerů.



Obrázek 16: Velikosti alel SSR markerů gonozómu Y u zástupců plemene československý vlčák s gonozómem Y, který pochází z vlka Šarik



Obrázek 17: Velikosti alel SSR markerů gonozómu Y u zástupců plemene československý vlčák s gonozómem Y, který pochází z německého ovčáka Treu von Hildakloster



## 6 Diskuze

### 6.1 Volba plemen určených pro genetické analýzy

Jako modelová zvířata pro studium variability D-smyčky mtDNA a SSR lokusů byla vybrána plemena psů československý vlčák a Saarloosův vlčák. Tato plemena se ve světě neřadí mezi plemena velmi početná. Studium těchto plemen se doposud nikdo tímto způsobem nezabýval. Československý vlčák a Saarloosův vlčák jsou produkty záměrného křížení psa a vlka. Tento proces je popsán v rešeršní části práce. U plemene československý vlčák bylo prokázáno, že vlk podílející se na vzniku tohoto plemene, byl určitě vlk evropský. Konkrétně se jednalo o karpatskou vlčici (Hartl a Jedlička, 1996). Od tohoto křížení uběhlo již 61 let. Důsledkem tohoto křížení se u plemene vyskytuje a stále udržuje 28 - 32 % podílu vlčí krve. Plemeno Saarloosův vlčák vzniklo křížením německého ovčáka (Gerhard von de Fransenum) a sibiřské vlčice (Fleur z Blijdrop Zoo v Rotterdamu), poprvé k tomuto spojení došlo v roce 1932. V tomto případě se vyskytuje 30 - 35 % podílu vlčí krve v zástupcích tohoto plemene.

Československý vlčák byl pro experimenty vybrán, protože je představitelem národních plemen České a Slovenské republiky. Je to plemeno, které se exteriérem nejvíce přibližují vlku. Saarloosův vlčák je fenotypově variabilní, vyskytují se různé barevné formy srsti. U československých vlčáků se s tímto jevem nesetkáme.

Křížení psa a vlka ve volné přírodě se věnovali Vilà a Wayne (1999). Tato hybridizace dává životaschopné a plodné potomstvo. Vilà et al. (2003) ve své práci potvrdili přítomnost  $F_1$  hybridů vzniklých křížením samic vlka a samců psa ve velmi malé a nedávno znovu obnovené skandinávské populaci. V Itálii a Španělsku se mohou vzájemně křížit vlk obecný s polodivokými populacemi domestikovaných psů. Takové hybridizace mohou ohrozit genetickou integritu divokých populací vlků (Vilà et al., 1999b). Vilà et al. (1997), Randi et al. (2000) zjistili, že nukleotidová sekvence hypervariabilní části kontrolní oblasti mtDNA definuje haplotypy, které jsou ve většině populací evropských vlků různé, a nejsou sdíleny žádnými z dosud studovaných plemen. Randi et al. (2000) použili panel mitochondriálních lokusů psa, hypervariabilní biparentální genetický marker, který může být použit pro identifikaci jednotlivých genotypů vlka a psa a pro detekci případů hybridizace a introgrese genu.

Jednou se zemí, kde je plemeno československý vlčák nejvíce rozšířeno, je Itálie. Tato země je charakteristická tím, že se zde vyskytuje poměrně velká populace vlků v Evropě (Vilà

et al., 1997). Z tohoto důvodu je velká pravděpodobnost, že může dojít k volnému křížení vlka s československým vlčákem a to může ovlivnit F<sub>1</sub> generaci vlka.

Plemena československý vlčák a Saarloosův vlčák byla srovnávána se zástupci populace vlků a dalších psích plemen a to z několika důvodů. Jedním z důvodů je skutečnost, že mezi jedinci domestikovaného psa se nacházejí zástupci, kteří vznikli záměrným křížením psa a vlka. Dalším důvodem byl fakt, že obliba těchto plemen stoupá a majitelé nechávají své psy podrobovat vyšetření pro potvrzení či vyvrácení možnosti přítomnosti různých onemocnění (např. degenerativní myelopatie).

## **6.2 Metody izolace DNA**

Při řešení diplomové práce byla použita neinvazivní metoda odběru biologického materiálu – stěry z bukálních sliznic. S odběrem bukálních sliznic od psů má školicí pracoviště dobré zkušenosti. Výhodou této metody je to, že při jejím provádění nemusí být přítomen veterinární lékař a může ji provést majitel sám. Jedinou podmínkou je, aby pes alespoň dvě hodiny před odběrem nepřijímal potravu.

Dalším vhodným materiálem pro získání DNA jsou chlupové cibulky (Angleby a Savolainen, 2005; Schmutz et al., 2007), exkrementy, biopsie tkání, krev zvířat usmrcených autem (Vilà et al., 2003; El-Sayed et al., 2010), krev a moč znečištěného sněhu (Vilà et al., 2003) či krev živých zvířat (Björnerfeldt et al., 2006; Sharma et al., 2007; Asch et al., 2009). V případě odběru krve ze živých zvířat je však nutnost přítomnosti veterinárního lékaře, který je pro tento odběr způsobilý.

Jelikož pro tuto práci byla zvolena zvířata chovaná člověkem a ve většině případů se jednalo o mladé jedince a matky nebyl s odběrem vzorků problém. Ze studia vědecké literatury dále vyplývá, že všichni autoři zabývající se studiem psiho genomu (Bannasch et al., 2004; Schmutz et al., 2007; Young et al., 2006 a Hejjas et al., 2007) využívali pro izolaci DNA komerčně vyráběné kity. Pro tuto práci byl využit kit NucleoSpin® Tissue XS (Macherey-Nagel). Vlastní izolace probíhá pomocí izolační sady, které zaručují zachování naprosto identických podmínek během izolace, jsou vysoce spolehlivé a výrazně urychlují izolaci DNA.

## **6.3 Sekvenční polymorfismus mitochondriálních markerů**

Existuje velké množství systémů, jak jednotlivé laboratoře označují haplotypy. Jelikož každý autor volí jiné značení, nelze tyto systémy převzít. Například Bannasch et al. (2004) označuje jednotlivé haplotypy H1-47, Sundqvist et al. (2001) A-R. Pro přehlednost a sjednocení vzorků jsem navrhla vlastní systém pro označování skupin haplotypů. Každá

skupina byla ozančena zkratkou CAN. Kromě mnou sekvenovaných vzorků byly do tohoto systému zařazeny také sekvence vzorků získané od různých autorů z databáze NCBI.

Výsledky plně odpovídaly předpokladům, že v rámci plemene československý vlčák byly identifikovány tři feny zakladatelky. V případě, že nedošlo k mutaci D-smyčky mtDNA, tak by v rámci plemene mohly být přítomny maximálně tři různé haplotypy. V této práci jsme zjistili, že dvě linie – Guma z Pohraniční stráže a Asta z Koščakovho dvora - jsou stejné, proto nelze tyto haplotypy dále hodnotit. Na základě těchto výsledků lze konstatovat, že matky fen Asta z Koščakovho dvora a Guma z Pohraniční stráže byly příbuzné. Toto konstatování však nelze podložit daty získanými z databází, jelikož tyto databáze končí třemi fenami zakladatelkami plemene – Adis z Nezbedova dvora, Asta z Koščakovho dvora a Guma z Pohraniční stráže. Možností by bylo dohledat tyto matky pomocí informací uvedených v Plemenné knize.

Štěpení haplotypů zatím nikdo necharakterizoval. Námi navržený postup dokáže rozlišit haplotyp A a haplotyp B, avšak neumožní odlišit haplotypy, které odpovídají shodným haplotypům feny Guma z Pohraniční stráže a Asta z Koščakovho dvora.

Studiem haplotypů u psích plemen se věnovali například Bannasch et al. (2004), kteří zjistili 43 haplotypů u 50 plemen, Sundqvist et al. (2001) zjistili 17 haplotypů u vlků v severní Evropě. Gundry et al. (2007) podrobili studiu 125 jedinců 43 plemen psů domácích, kojota a 2 vlky a následně popsali 45 haplotypů. Vilà et al. (1997), Savolainen et al. (2003) a Angleby a Savolainen (2005) zjistili společné haplotypy v HV1 oblasti mtDNA psa. Vilà et al. (2003) zjistil 4 haplotypy u vlků z Estónska a Finska a 5 haplotypů u vlků z Ruska.

U volně žijících populací vlků může být variabilita mnohem větší než například u československého ovčáka, u kterého došlo k efektu hrdla láhve. Důvodem byla nepoužitelná povaha prvních kříženců psů a vlků. Z prvních generací křížení byl kvůli tomuto faktu použit jen malý počet štěňat. Postupně docházelo k zániku některých krevních linií.

Molekulární markery jsou často používány k identifikaci a k správnému k zoologickému zařazení jedinců nalezených v přírodě obvykle v podobě uhynulých zvířat nebo ulovených zvířat nebo odchycených jedinců s intermediálními vlastnostmi vlků a psů. Z výsledků získaných při řešení diplomové práce mohu konstatovat, že pomocí markerů nelze provést jednoznačnou identifikaci, zda neznámý jedinec byl psem, vlkem nebo křížencem vlka a psa.

U mtDNA existuje variabilita haplotypů, ale identické haplotypy s vlkem nemá jen plemeno československý vlčák, ale i ostatní zkoumaná plemena psů.

## 6.4 Hodnocení variability markerů D-smyčky mtDNA pomocí kladogramu

První strategií diplomové práce bylo hodnocení všech mnou osekvenovaných psů spolu s informacemi získanými z databáze NCBI. Této databáze při studiu vlků využili také Pilot et al. (2010). Důvodem tohoto hodnocení bylo názorně ukázat pomocí grafického zobrazení, jak jsou si jednotlivá plemena vzájemně podobná.

Druhou alternativou statistického hodnocení bylo grafické znázornění jednotlivých haplotypů. Cílem tohoto hodnocení bylo zpřehlednit vztahy jednotlivých haplotypů pomocí kladogramů.

Pro obě tyto strategie byla snaha použít metody zakořeněného kladogramu (Flegl, 2009). Zakořenění bylo provedeno tak, že mezi zástupci *Canis lupus L.* a *Canis lupus familiaris L.* byla zařazena sekvence *Canis latrans*. Důvodem jeho zvolení bylo to, že na Katedře genetiky a šlechtění FAPPZ ČZU v Praze nebyl k dispozici vzorek DNA geneticky dostatečně odlišného druhu. Druhým důvodem bylo to, že v databázi NCBI je velké množství informací o D-smyčce mtDNA u psovitých šelem, avšak v řadě případů jsou tyto sekvence neúplné a tudíž se nedají porovnat s úplnými sekvencemi, které jsem získala já. Pouze sekvence *Canis latrans* úplná byla.

zakořenění kladogramu bylo provedeno tak, že mezi porovnávané sekvence byla zařazena sekvence D-smyčky mtDNA, která se výrazněji lišila od zkoumaných haplotypů psů a vlků. Touto sekvencí byl haplotyp CAN17, který odpovídá D-smyčce mtDNA kojota (*Canis latrans*). Haplotyp CAN17 se od studovaných haplotypů psů a vlků liší kromě substitučních mutací rovněž mutacemi typu inserce, delece.

Jednotlivé metody jsou popsány v rešeršní části této práce. V případě porovnávání jednotlivých metod bývá často používána a doporučována metoda Maximální parsimonie a Maximální pravděpodobnosti. Ve své práci použili jednotlivé metody ke konstrukci kladogramů Björnerdfeldt et al. (2006). Já jsem ve své práci využila nabídky programu MEGA6 a sestrojila jsem kladogramy na základě dalších metod. Důvodem tohoto rozhodnutí bylo ověření, která statistická metoda ovlivní vytváření podobných skupin mezi genotypy.

## 6.5 Hodnocení variability markerů D-smyčky mtDNA

U plemene Saarloosův vlčák doposud haplotypy nikdo nehodnotil. Byla potvrzena hypotéza. Na základě databáze rodokmenů jsem zjistila, že všichni chovaní jedinci Saarloosova vlčáka mají genotyp po jediné matce, kterou je fena německého ovčáka Winda V. D. Kilstroom. Důvodem studia malého počtu vzorku je to, že v České republice je plemeno Saarloosův vlčák málo početné. Což je způsobeno pravděpodobně jeho komplikovanou

povahou. V případě československých vlčáků jsou počty vyšší. Jedná se o oblíbené plemeno a analýzy tohoto plemene vycházejí ze spolupráce s klubem chovatelů československých vlčáků. Majitelé psů pravidelně poskytují vzorky pro testy na onemocnění, jakým je například degenerativní myelopatie. Tyto vzorky je možné využít k dalším anonymním analýzám.

Současně byla hodnocena také arktická vlčice spolu s jejími třemi potomky. Námi zjištěné výsledky u takto malého souboru nemohou odpovídat průměrnému vzorku vlčí populace. Cílem práce ale nebylo hodnotit populaci vlků, jednalo se pouze o kontrolní genotypy.

## **6.6 Mikrosatelitní markery lokalizované na gonozómu Y**

Analýze byli podrobena pouze samci, jelikož samice gonozóm Y nenesou. Ve své diplomové práci vycházím z předpokladu správnosti rodokmenů uvedených v databázi. U plemene československý vlčák může mít gonozóm Y dvojí původ. Původcem může být vlk jménem Šarik nebo německý ovčák Treu von Hildakloster. U plemene Saarloosův vlčák je původcem gonozómu Y německý ovčák Gerard van de Fransenum. Tato hypotéza byla na základě výsledků potvrzena.

Markery lokalizované na gonozómu Y použité pro studium polymorfismu mikrosatelitních lokusů byly vybrány na základě práce Bannasch et al. (2004). Tyto markery použili ve své práci také Olivier et al. (1999) a Sundqvist et al. (2001).

### **6.6.1 Optimalizace metody detekce alel mikrosatelitních markerů**

Ve své práci jsem vyšla ze strategie navržené Hayden et al. (2008), kteří použili dva primery. V publikovaných pracích se u plemen československý vlčák a Saarloosův vlčák tomuto tématu zatím nikdo nevěnoval. Původní postup Hayden et al. (2008) byl založen na multiplex-PCR, kdy do jedné reakční směsi byly přidávány všechny 4 primery najednou. Tento postup výrazně analýzu urychluje. Pro experimentální část této práce nebyla multiplex-PCR použita. Důvodem byl fakt, že tyto markery byly v rámci řešení diplomové práce použity vůbec poprvé a tudíž nebyla s velikostí PCR produktů žádná zkušenost. Proto bylo nutné nejdříve charakterizovat velikost alel SSR markerů pomocí jednoduché PCR a až poté přistoupit k samotné multiplex-PCR podle Hayden et al. (2008).

### **6.6.2 Alely detekované pomocí SSR**

V práci byly použity 4 markery uvedené v tabulce 8. Marker 1, který odpovídá primerům MS34F, MS34R amplifikoval dva PCR produkty, viz. obrázek 16 a 17, na kterých jsou zřetelné dva píky. K tomuto procesu by podle výsledků Olivier et al. (1999) a Bannasch

et al. (2004) nemělo dojít. Marker 1 je charakteristický dvěma produkty. Bannasch et al. (2004) na základě výsledků práce nedoporučují tento marker pro genotypizaci používat. Důvodem je nemožnost markeru identifikovat alelu PCR produktu. Příčinou vzniku dvou PCR produktů je to, že dvojice primerů nasedá v genomu ještě na jiné místo, než na které se původně předpokládá, a proto dochází k amplifikaci dvou fragmentů. Naopak Markery 2, 3 a 4 amplifikují pouze jeden fragment. K těmto výsledkům došli také Bannasch et al. (2004).

Na základě výsledků získaných z kapilární elektroforézy, která prokázala, že detekce alel pomocí dvou PCR po sobě byla specifická, lze konstatovat, že docházelo pouze k amplifikaci předpokládaných fragmentů.

### **6.6.3 Identifikace gonozómu Y u plemene československý vlčák**

Pro identifikaci gonozómu Y u plemene československý vlčák byly použity čtyři markery. Dva z markerů, Marker 1 a 3, umožňovaly odlišit gonozóm pocházející z vlka jménem Šarik a německého ovčáka Treu von Hildakloster. Naopak Marker 2 a 4 identifikaci gonozómu Y neumožnily. Důvodem je to, že se jednalo o dvojice primerů, které lemují repetitivní oblast, kde neexistuje variabilita mezi Y gonozómem německého ovčáka jménem Treu von Hildakloster a Y gonozómem vlka evropského jménem Šarik. Marker 1 produkoval dva fragmenty, můžeme tedy říct, že je jako marker pro gonozóm Y nevhodný. Velikosti jednotlivých fragmentů byly 395 a 404 bp u vlka a 397 a 402 bp u německého ovčáka. Původ Y gonozómu se podařilo odlišit také u Markeru 3, kde jsme zjistili rozdíly ve dvou bázích. U Markerů 2 a 4 jsme k těmto výsledkům nedošly. Důvodem je to, že se jedná o dvojici primerů, které lemují repetitivní oblast, kde neexistuje variabilita mezi Y gonozómem německého ovčáka Treu von Hildakloster a Y gonozómem vlka Šarika.

### **6.6.4 Identifikace gonozómu Y u plemene Saarloosův vlčák**

V případě identifikace gonozómu Y u plemene Saarloosův vlčák jsem předpokládala, že pokud opravdu platí rodokmeny uvedené v databázi, tak všichni jedinci plemene Saarloosův vlčák budou mít Y gonozóm odvozený od jediného zástupce plemene německý ovčák jménem Gerard van de Fransenum. Na základě analýzy s využitím mikrosatelitních lokusů bylo dokázáno, že všichni samci plemene Saarloosův vlčák byli z hlediska mikrosatelitních markerů stejní. Na rozdíl od zástupců plemene československý vlčák, kde někteří jedinci měli lokus shodný s německým ovčákem Treu von Hildakloster a jiní jedinci měli lokus shodný s eurasijským vlkem Šarikem.



Dále se ukázalo, že všichni hodnocení reprezentanti plemene Saarloosův vlčák mají stejný haplotyp shodný se zástupci plemene československý vlčák odvozených od německého ovčáka.

#### **6.6.5 Identifikace gonozómu Y u vlka**

Na základě hodnocení tří sourozenců (potomků evropské vlčice) nelze vyvozovat obecně platné závěry pro celou populaci. Předpokládala jsem, že všichni tři sourozenci by měli být stejní z hlediska haplotypu gonozómu Y. Tento předpoklad byl následně potvrzen. Otcem těchto sourozenců byl jediný otec, všichni jedinci měli identický haplotyp s haplotypem československých vlčáků odvozených od vlka Šarika.

## 7 Závěr

Cílem diplomové práce bylo potvrdit nebo vyvrátit několik vědeckých hypotéz týkajících se problematiky charakteristiky variability mtDNA a gonozómu Y u plemen psů vzniklých vzájemným křížením psa a vlka. Mohu konstatovat, že platnost všech vědeckých hypotéz byla potvrzena. Konkrétní závěry, které vyplývají z řešení diplomové práce, je možné shrnout do následujících bodů:

1. Byla optimalizována metoda pro studium variability D-smyčky mtDNA založená na amplifikaci variabilní sekvence. Pro detailní vyhodnocení sekvenční variability byla optimalizována metoda přímého sekvenování PCR produktů.
2. U plemene československý vlčák bylo na základě rodokmenu zjištěno, že všichni současně žijící představitelé tohoto plemene, mají cytoplazmu pocházející od tří fen zakladatelek – Adis z Nezbedova dvora, Asta z Koščakovho dvora a Guma z Pohraniční stráže.
3. Teoreticky by mohly u plemene československý vlčák existovat tři různé haplotypy, ale sekvenční analýzou bylo potvrzeno, že haplotyp D-smyčky mtDNA československých vlčáků odvozených od fen německého ovčáka Asta z Koščakovho dvora a Guma z Pohraniční stráže byl identický. Tento haplotyp byl označen jako haplotyp A. Odlišný haplotyp vykazovali českoslovenští vlčáci odvození od feny Adis z Nezbedova dvora – haplotyp B.
4. U plemene Saarloosův vlčák byl identifikovaný jediný haplotyp D-smyčky mtDNA. Tento výsledek potvrdil hypotézu, že v současných zástupcích plemene Saarloosův vlčák se nachází cytoplazma jediné zakladatelky – feny německého ovčáka Winda V. D. Kilstroom.
5. Z předchozích dvou bodů vyplývá, že ani u jednoho ze současných zástupců plemen československý a Saarloosův vlčák se nevyskytují mitochondrie pocházející ze samice vlka.
6. Na základě genealogické studie propojené s molekulárními sekvenačními analýzami D-smyčky mtDNA u potomků po mateřské linii odvozených z Gummy z Pohraniční stráže byla potvrzena stabilita sekvencí. U všech 88 potomků byl identifikovaný zcela identický haplotyp.
7. Vzhledem k tomu, že u plemene československý vlčák byly identifikovány dva haplotypy, byl navržen PCR-RFLP marker, který je dokázal vzájemně spolehlivě

odlišit. Výsledky identifikace haplotypu A a B u československých vlčáků pomocí PCR-RFLP markerů byly zcela shodné s výsledky sekvenčních analýz.

8. Pro studium variability haplotypů D-smyčky mtDNA byly sekvenční analýzy provedeny u zástupců dalších 24 plemen, která nemají svůj původ odvozen ze vzájemného křížení psa a vlka. Databáze haplotypů získaných při řešení diplomové práce byla doplněna ještě o sekvence D-smyčky mtDNA u dalších plemen a zástupců vlků a kojota pocházející z mezinárodní nukleotidové databáze NCBI.
9. Statistickým a bioinformatickým porovnáním získaných sekvencí bylo identifikováno celkem 17 haplotypů, které byly v diplomové práci označeny jako CAN1 – CAN17. Sekvenční podobnost těchto haplotypů byla vyhodnocena pomocí programu BioEdit a ClustallW. Pro grafické vyjádření sekvenční podobnosti popřípadě i evoluční podobnosti jednotlivých haplotypů byly sestaveny kladogramy pomocí programu MEGA6. Počty větví a zařazení haplotypů do jednotlivých větví kladogramů bylo téměř identické při použití metod Maximální věrohodnosti, Neighbor-joining a Minimální evoluce. Kladogramy konstruované pomocí metod UPGMA a Maximální pasimonie vykazovaly větší variabilitu a odlišné zařazení jednotlivých haplotypů do společných skupin.
10. Byla rovněž potvrzena hypotéza, že pomocí mikrosatelitních markerů lokalizovaných na heterologní části gonozómu Y lze identifikovat původ gonozómu Y (psí nebo vlčí) u plemene československý vlčák. Ze studia rodokmenů vyplynulo, že gonozóm Y pochází od samce vlka Šarik a u části psů od německého ovčáka Treu von Hildakloster. Tyto rozdíly byly potvrzeny dvěma SSR markery (Marker 1, Marker 3), které se lišily 2 bp.
11. U plemene Saarloosův vlčák bylo zjištěno, že existuje pouze jediný donor gonozómu Y – německý ovčák Gerarda van der Fransenium. Haplotyp stanovený na základě čtyř mikrosatelitních markerů odpovídal u všech zástupců Saarloosova vlčáka haplotypu československých vlčáků s gonozómem Y pocházejícím z německého ovčáka Treu von Hildakloster.

Doporučení pro využití výsledků v dalším výzkumu a v kynologické praxi:

Během řešení diplomové práce byly získány informace o variabilitě D-smyčky mtDNA a mikrosatelitních markerech lokalizovaných na gonozómech Y psa. Tyto informace lze využít v dalším výzkumu, který může být zaměřený na hodnocení evoluční vzdálenosti mezi plemeny psů nebo mezi psem domácím a dalšími zástupci rodu *Canis*. Vzhledem k tomu, že variabilita, která byla hodnocena pomocí těchto markerů, představuje pouze nepatrný vzorek celkové genetické variability psů, je možné doporučit pro tyto evoluční a populační analýzy kombinovat použité markery s dalšími typy markerů, které mohou být lokalizovány nejen na gonozómech, ale i na autozomech. Rozšířením spektra markerů budou získány výsledky, které budou reprezentativněji hodnotit genetické vzdálenosti v evolučních a populačních studiích, a které bude možné využít i v praktické kynologii v oblasti potvrzení paternity a maternity psů.

## 8 Seznam literatury

- Alberts, B., Bray, D., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. 1998. Základy buněčné biologie. Ústí nad Labem. Espero publishing. 630 s.
- Aldrich, J. 1997. Fisher and the making of maximum likelihood 1912-1922. *Statistical Science*. 12. 162-176.
- Anderson, Ž., Lucchini, V., Randi, E., Ozolinš, J. 2002. Hybridisation between wolves and dogs in Latvia as documented using mitochondrial and microsatellite DNA markers. *Mammalian Biology*. 67. 79-90.
- Angleby, H., Savolainen, P. 2005. Forensic informativity of domestic dog mtDNA control region sequences. *Forensic Science International*. 154. 99 – 110.
- Asch, B., Albarran, C., Alonso, A., Angulo, R., Alves, C., Betancor, E. et al. 2009. Forensic analysis of dog (*Canis lupus familiaris*) mitochondrial DNA sequences: An inter-laboratory study of the GEP-ISFG working group. *Forensic Science International: Genetics*. 4. 49 – 54.
- Arif, I.A., Khan, H.A., Bahkali, A.H., Al Homaidan, A.A., Al Farhan, A.H., Al Sadoon, M., Shobrak, M. 2011. DNA marker technology for wildlife conservation. *Saudi Journal of Biological Sciences*. 18. 219-225.
- Avise, J.C., Bowen, B.W., Lamb, T. DNA Fingerprints from Hypervariable Mitochondrial Genotypes. *Molecular Biology and Evolution*. 6. 258-269.
- Baltrūnaite, L., Balčiauskas, L., Akesson, M. 2013. The genetic structure of the Lithuanian wolf population. *Central European Journal of Biology*. 8. 440 – 447.
- Bannasch, D.L., Bannasch, M.J., Ryun, J.R., Famula, T.R., Pedersen, N.C. 2005. Y chromosome haplotype analysis in purebred dogs. *Mammalian Genome*. 16. 273-280.

- Bejdák, P. 2006. Využití molekulárních markerů pro fylogenetické a taxonomické analýzy dvoukřídlého hmytu (*Diptera*). Bakalářská práce. Masarykova univerzita v Brně. Přírodovědecká fakulta. Brno. 37 s.
- Benson, G. 1999. Tandem repeats finder: a program to analyze DNA sequences. *Nucleic Acids Research*. 27. 573 – 580.
- BioLib – Mezinárodní encyklopedie rostlin, hub a živočichů. 1999 – 2014. [online]. [cit. 2014-03-12]. Dostupné z <<http://www.biolib.cz>>.
- Björnerfeldt, S., Webster, M.T., Vilà, C. 2006. Relaxation of selective constraint on dog mitochondrial DNA following domestication. *Genome Research*. 16. 990 – 994.
- Boyko, A. 2011. The domestic dog: man's best friend in the genomic area. *Genome Biology*. 12. 216.
- Britten, R.J. 1986. Rates of DNA sequence evolution differ between taxonomic groups. *Science* 21. 231. 1393-1398.
- Brookes, C., Bright, J.-A., Harbison, S., Buckleton, J. 2012. *Forensic Science International: Genetics*. 6. 58-63.
- Císařovský, M. 2008. Pes, nekonečný příběh od pravěku do třetího tisíciletí. Praha. *Canis*. 904 s.
- Delidow, BC., Lynch, JP., Peluso, JJ., White, BA. 1993. Polymerase chain reaction. *Methods in Molecular Biology*. 15. 1-29.
- DeLuca, S., O' Farrell. 2012. Barriers to Male Transmission of Mitochondrial DNA in Sperm Development. *Developmental Cell*. 22. 660 – 668.
- Denoeud, F., Vergnaud, G., Benson, G. 2003. Predicting Human Microsatellite Polymorphism. *Genome Research*. 13. 856 – 867.
- Ding, Z-L., Oskarsson, M., Ardalan, A., Angleby, H., Dahlgren, L-G., Tepeli, C., Kirkness, E., Savolainen, P., Zhang, Y-P. 2012. Origins of domestic dog in Southern East Asia is supported by analysis of Y-chromosome DNA. *Heredity*. 108. 507 – 514.

- Druzhkova, A., Thalmann, O., Trifonov, V., Leonard, J., Vorobieva, N., Ovodov, N., Graphodatsky, A., Wayne, R. 2013. Ancient DNA Analysis Affirms the Canid from Altai as a Primitive Dog. *PLOS ONE*. 8. 1 – 6.
- Efron, B. 1979. Bootstrap Methods: Another Look at the Jackknife. *The Annals of Statistics* Volume 7. 1. 1-26.
- Ehrlich, HA. 1989. Polymerase chain reaction. *Journal of Clinical Immunology*. 9. 437-447.
- El-Sayed, Y.S., Mohamed, O.I., Ashry, K.M., Abd El-Rahman, S.M. 2010. Using species-specific repeat and PCR-RFLP in typing of DNA derived from blood of human and animal species. *Forensic Science Medical Pathology*. 6. 158-164.
- Felsenstein, J. 1981. Evolutionary Trees from DNA Sequences: A Maximum Likelihood Approach. *Journal of Molecular Evolution*. 17. 368-376.
- Felsenstein, J. 1985. Confidence limits on phylogenies with a molecular clock. *Systematic Zoology*. 34. 152-161.
- Flegr, J. 2009. *Evoluční biologie*. 2. Vydání. Praha. ACADEMIA. 569 s.
- Galibert, F., Quignon, P., Hitte, Ch., André, C. 2011. Toward understanding dog evolutionary and domestication history. *C. R. Biologies*. 334. 190 – 196.
- Gagliardi, R., Llambí, S., García, C., Arruga, M.V. 2011. Microsatellite characterization of Cimarron Uruguayo dogs. *Genetics and Molecular Biology*. 34. 165 – 168.
- Germonpré, M., Sablin, M., Stevens, R., Hedges, R., Hofreiter, M., Stiller, M., Després, V. 2009. Fossil dogs and wolves from Palaeolithic sites in Belgium, the Ukraine and Russia: osteometry, ancient DNA and stable isotopes. *Journal of Archaeological Science*. 36. 473 – 490.
- Godinho, R., Llaneza, L., Blanco, J. C., Lopes, S., Álvares, F., García, E. J., Palacios, Y., Tategón, J., Ferrand, N.. 2011. Genetic evidence for multiple events of hybridization between wolves and domestic dogs in the Iberian Peninsula. *Molecular Ecology*. 20. 5154 - 5166.

- Gomez, M.L., Macedo, A.M., Pena, S.D.J., Chiari, E. 1998. Genetic relationships between *Trypanosoma cruzi* strains isolated from chronic chagasic patients in southern Brazil as revealed by RAPD and SSR-PCR analysis. *Acta Tropica*. 69. 99-109.
- Graur, D., Li, W.-H. 2000. *Fundamentals of Molecular Evolution*. Second Edition. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts. 39-62.
- Hadidi, A., Candresse, T. Polymerase chain reaction. In: Hadidi, A., Flores, R., Randlers, J.W., Semancik, J.S. (eds.) *Viriods: Properties, Detection, Diseases and their control*. S. Australia. CSIRO Publishing. p. 115-121.
- Hall, T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows98/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*. 41. 95-98.
- Hartl, K., Jedlička, J. 1996. *Československý vlčák*. LOBA. Brno. 75 s.
- Hasegawa, M., Kishino, H., Yano, T. 1985. Dating of human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA. *Journal of Molecular Evolution*. 22. 160-174.
- Hayden, M.J., Nguyen, T.M., Waterman, A., Chalmers, K.J. 2008. Multiplex-Ready PCR: A new method for multiplexed SSR and SNP genotyping. *BMC genomics*. 9. 80
- Hedmark, E., Ellegren, H. 2006. A test of the multiplex preamplification approach in microsatellite genotyping of wolverine faecal DNA. *Conservation Genetics*. 7. 289-293.
- Heiman, M. 1997. [program] Webcutter 2.0. [cit. 2014-03-24]. Dostupné z <<http://rna.lundberg.gu.se/cutter2/>>.
- Heinrich, R., Strait, S., Houde, P. 2008. Earliest Eocene Miacididae (Mammalia: Carnivora) from Northwestern Wyoming. *Journal of Paleontology*. 82. 154 – 162.
- Hejjas, K., Vas, J., Topal, J., Szantai, E., Ronai, Z., Szekely, A., Kubinyi, E., Horvath, Z., Sasvari-Szekely, M., Miklosi, A. (2007) Association of polymorphisms in the dopamine D4 receptor gene and the activity-impulsivity endophenotype in dogs. *Animal Genetics*,38(6), 629–633.



- Henegariu, O. Heerema, N.A., Dlouhy, S.R., Vance, G.H., Vogt, P.H. 1997. Multiplex PCR: Critical Parameters and Step-by-Step Protocol. *Bio Techniques*. 23. 504-511.
- Hindrikson, M., Männil, P., Ozolins, J., Krzywinski, A., Saarma, U. 2012. Bucking the Trend in Wolf-Dog Hybridization: First Evidence from Europe of Hybridization between Female Dogs and Male Wolves. *PLOS ONE*. 7. 1 – 12.
- Chambers, G.K., Curtis, C., Millar, C.D., Huynen, L., Lambert, D.M. 2014. DNA fingerprinting in zoology: past, present, future. *Investigative Genetics*. 5. 1-11.
- Chan, D., Schon, E. 2012. Eliminating Mitochondrial DNA from Sperm. *Developmental Cell*. 22. 469 – 470.
- Chistiakov, D.A., Hellemans, B., Volckaert, B. 2006. Microsatellites and their genomic distribution, evolution, function and application. *Aquaculture*. 255. 1 – 29.
- Irion, D.N., Schaffer, A.L., Famula, T.R., Eggleston, M.L., Hughes, S.S., Pedersen, N.C. 2003. Analysis of Genetic Variation in 28 Dog Breed Populations With 100 Microsatellite Markers. *Journal of Heredity*. 94. 81 - 87.
- Jensen, P. 2006. Domestication – From behaviour to genes and back again. *Applied Animal Behaviour Science*. 97. 3 – 15
- Jobling, M.A. 2013. Curiosity in the genes: the DNA fingerprinting story. *Investigative Genetics*. 4. 1-3.
- Kimura, M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution*. 16. 111-120.
- Klüttsch, C., Seppälä, M., Lohi, H., Savolainen, P. 2011. Segregation of point mutation heteroplasmy in the control region of dog mtDNA studied systematically in deep generation pedigrees. *Int J Legal Med*. 125. 527 – 535.
- Li, Y., Zhang, Y. 2012. High genetic diversity of Tibetan Mastiffs revealed by mtDNA sequences. *Chinese Science Bulletin*. 57. 1483 – 1487.

- Lindblad-Toh, K., Wade, C., Mikkelsen, T., et al. 2005. Genome sequence, comparative analysis and haplotype structure of the domestic dog. *Nature*. 438. 803 – 819.
- Liping, D., Hongxia, Z., Hong, Y. 2007. OMWSA: detection of DNA repeats using moving window spectral analysis. *Bioinformatics applications note*. 23. 631 – 633.
- Mellersh, C.S., Langston, A.A., Acland, G.M., Fleming, M., Ray, K., Wiegand, N., Francisco, L., Gibbs, M., Aguirre, G., Ostrander, E. 1997. A Linkage Map of the Canine Genome. *Genomics*. 46. 326 – 336.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., Erlich, A. 1992. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Biotechnology series*. 263-274.
- Muñoz-Fuentes, V., Darimont, CH.T., Paquet, P.C., Leonard, J.A. 2010. The genetic legacy of extirpation and re-colonization in Vancouver Islands wolves. *Conserv Genet*. 11. 547-556.
- Nei, M., Kumar, S. 2000. *Molecular Evolution and Phylogenetics*. Oxford University Press, New York.
- Olivier, M., Lust, G. 1998. Two DNA semence specific for the canine Y chromosome. *Animal Gentic*. 29. 146-149.
- Oskarsson, M., Klütsch, C., Boonyaparakob, U., Wilton, A., Tanabe, Y., Savolainen, P. 2011. Mitochondrial DNA data indicate an introduction through Mainland Southeast Asia for Australian dingoes and Polynesian domestic dogs. *Proceedings of the Royal Society*. 279. 967 – 974.
- Ostrander, A., Galibert, F., Patterson, D. 2000. Canine genetics comes of age. *TIG*. 16. 117–124.
- Pang, JF., Kluetsch, C., Zou, XJ., Zhang, AB., Luo, LY., Angleby, H., Ardalan, A., Ekström, C., Sköllermo, A., Lundeberg, J., Matsumura, S., Leitner, T., Zhang, YP., Savolainen, P. 2009. mtDNA data indicate a single origin for dogs south of Yangtze River, less than 16,300 years ago, rom numerous wolves. *Molecula Biology and Evolution*. 26. 2849 -2864.

- Parker, H., Kim, LV., Sutter, NB., Carlson, S., Lorentzen, TD., Malek, TB., Johson, GS., Defrance, HB., Ostrander, EA., Kruglyak, L. 2004. Genetic structure of the purebred domestic dogs. *Science*. 304. 1160 – 1164.
- Parker, H. 2012. Genomic analyses of modern dog breeds. *MammGenome*. 23. 19 – 27.
- Parra, S. Méndez, J., Cañón, J., Dunner, S. 2008. Genetic differentiation in pointing dog breeds inferred from microsatellites and mitochondrial DNA sequence. *Animal Genetics*. 39. 1–7.
- Pfeiffer, I., Völkel, I., Täubert, H., Brenig, B. 2004. Forensic DNA-typing of dog hair: DNA-extraction and PCR amplification. *Forensic Science International*. 141. 149 – 151.
- Piggott, M.P., Bellemain, E. Taberlet, P., Taylor, A.C. 2004. A multiplex pre-amplification method that significantly improves microsatellite amplification and error rates for faecal DNA in limiting conditions. *Conservation Genetics*. 5. 417-420.
- Pilot, M., Branicki, W., Jedrzejewski, W., Goszczynski, J., Jedrzejewska, B., Dyky, I., Shkvyrya, M., Tsingarska, E. 2010. Phylogeographic history of grey wolves in Europe. *Evolutionary Biology*. 10. 104-115.
- Räber, H. 1994. *Encyklopedie plemena psů I. díl*. Ostrava. Blesk. 768 s.
- Randi, E., Lucchini, V., Christensen, M.F., Mucci, N., Funk, S.M., Dolf, G., Loeschcke, V. 2000. Mitochondrial DNA variability in Italian and East European wolves: detecting the consequences of small population size and hybridization. *Conservation Biology*. 14. 464-473.
- Randi, E. 2011. Genetics and conservation of wolves *Canis lupus* in Europe. *Mammal Revolution*. 41. 99 – 111.
- Richard, G.-F., Kerrest, A., Dujon, B. 2008. Comparative Genomics and Molecular Dynamics of DNA Repeats in Eukaryotes. *Microbiology and molecular biology reviews*. 72. 686-727.
- Rokas, A., Ladoukakis, E., Zouros, E. 2003. Animal mitochondrial DNA recombination revisited. *TRENDS in Ecology and Evolution*. 18. 411 – 417.

- Rozen, S.G., Untergasser, A., Cutcutache, I., Koressaar, T., Ye, J., Faircloth, BC., Remm, M. 2012. Primer3-new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Research*. 40. 115.
- Ruvinsky, A., Sampson, J. 2001. *The genetics of the dog*. CABI. Wallingford. 564s.
- Rzhetsky, A., Nei, M. 1992. A simple method for estimating and testing minimum evolution trees. *Molecular Biology and Evolution*. 9. 945-967.
- Saitou, N., Nei, M. 1987. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*. 4. 406-425.
- Sambrook, J., Maniatis, T., Fritsch, E. F. 1989. *Molecular cloning. A laboratory manual*. Second edition. Cold Spring Harbour Laboratory Press.
- Savolainen, P., Arvestad, L., Lundeberg, J. 2000. mtDNA Tandem Repeats in Domestic Dogs and Wolves: Mutation Mechanism Studied by Analysis of the Sequence of Imperfect Repeats. *Molecular Biology and Evolution*. 17. 474 – 488
- Sedlář, K. 2006. Bootstrappingové metody ve fylogenetice. Bakalářská práce. Vysoké učení technické v Brně. Fakulta elektrotechniky a komunikačních technologií. Brno. 55 s.
- Sharma, D., Issac, B., Raghava, GPS., Ramaswamy, R. 2004. Spectral Repeat Finder (SRF): identification of repetitive sequences using Fourier transformation. *Bioinformatics*. 20. 1405 – 1412.
- Sharma, P., Grover, A., Kahl, G. 2007. Mining microsatellites in eukaryotic genomes. *TRENDS in Biotechnology*. 25. 490 – 498.
- Schmutz, S. M., Berryere, T. G., Barta, J. L., Reddick, K. D., Schmutz, J. K. 2007. Agouti sequence polymorphisms in coyotes, wolves and dogs suggest hybridization. *Journal of Heredity*. 98. 351-355.
- Sindičić, M., Gomerčić, T., Galov, A., Arbanasić, H., Kusak, J., Slavica, A., Huber, D. 2011. Mitochondrial DNA control region as a tool for species identification and distinction between wolves and dogs from Croatia. *Veterinarski archiv*. 81. 249 – 258.

- Sneath, P.H.A., Sokal, R.R. 1973. Numerical Taxonomy. Freeman, San Francisco. 1973 s.
- Snustad, D.P., Simmons, M.J. 2009. Genetika. Masarykova univerzita. Brno. 871 s.
- Stepniak, E., Zagalska, M.M., Switoński, M. 2002. Use of RAPD technique in evolution studies of four species in the family Canidae. Journal of Applied Genetics. 43. 489-499.
- Sugiyama, S., Chong, Y., Shito, M., Kasuga, M., Kawakami, T., Udagawa, Ch., Aoki, H., Bonkobara, M., Tsuchida, S., Sakamoto, A., Okuda, H., Nagai, A., Omi, T. 2013. Analysis of mitochondrial DNA HVR1 haplotype of pure-bred domestic dogs in Japan. Legal Medicine. 15. 303 – 309.
- Sundqvist, A.-K., Ellegren, H., Olivier, M., Vilà. 2001. Y chromosome haplotyping in Scandinavian wolves (*Canis lupus*) based on microsatellite markers. Molecular Ecology. 10. 1959 – 1966.
- Šebková, N. 2001. Československý vlčák. Svět psů. 73 (5). 12 – 15
- Tamura, K. 1992. Estimation of the number of nucleotide substitutions when there are strong transition-transversion and G+C content biases. Molecular Biology and Evolution. 9. 678-687.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipiński, A., Kumar, S. 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis vision 6.0. Molecular Biology and Evolution. 30. 2725-2729.
- Thomson, J.A., Pilotti, V., Stevens, P., Ayres, K.L., Debenham, P.G. 1999. Forensic Science International. 100. 1-6.
- Travis, S.E., Slobodchikoff, C.N., Keim, P. Social assemblages and mating relationships in prairie dogs: a DNA fingerprinting analysis. Behavioral Ecology. 7. 95-100.
- Tsuda, K., Kikkawa, Y., Yonekawa, H., Tanabe, Y. 1997. Extensive interbreeding occurred among multiple matriarchal ancestors during the domestication of dogs: Evidence

- from inter- and intraspecies polymorphisms in the D-loop region of mitochondrial DNA between dogs and wolves. *Genes Genetic Systems*. 72. 229 – 238.
- Van Dellen, K., Field, J., Wang, Z., Loftus, B., Samuelson, J. 2002. LINEs and SINE-like elements of the protist *Entamoeba histolytica*. *Gene*. 297. 229 – 239.
- Verginelli, F., Capelli, C., Coia, V., Musiani, M., Falchetti, M., Ottini, L., Palmirota, R., Tagliacozzo, A., Mazzorin, I., Mariani-Constantini, R. 2005. Mitochondrial DNA from Prehistoric Canids Highlights Relationships Between Dogs and South-East European Wolves. *Mol. Biol. Evol.* 22. 2541 – 2551.
- Verscheure, S., Backeljau, T., Desmyter, S. 2013. Reviewing population studies for forensic purposes: Dog mitochondrial DNA. *ZooKeys*. 365. 381 – 411.
- Vilà, C., Savolainen, P., Mandonado, JE., Armorin, IR., Rice, JE., Honeycutt, KA., Crandall, KA., Lundeberg, J., Wayne, RK. 1997. Multiple and ancient origins of the domestic dog. *Science*. 276. 1687 – 1689.
- Vilà, C., Maldonado, JE., Wayne, RK. 1999a. Phylogenetic Relationships, Evolution, and Genetic Diversity of the Domestic Dog. *The American Genetic Association*. 90. 71-77.
- Vilà, C., Wayne, RK. 1999b. Hybridization between wolves and dogs. *Conserv. Biol.* 13. 195–198.
- Vilà, C., Amorim, IR., Leonard, JA., Posada, D., Castroviejo, J., Petrucci-Fonseca, F., Crandall, KA., Ellegren, H., Wayne, RK. 1999c. Mitochondrial DNA phylogeography and population history of the gray wolf *Canis lupus*. *Molecular Ecology*. 8. 2009-2013.
- Vilá, C., Walker, C., Sundqvist, A. K., Falgstad, O., Andersone. Z., Casulli, A., Kojola, I., Valdmann, H., Halverson, J., Ellegren, H. 2003: Combined use of maternal, paternal and bi-parental genetic markers for the identification of wolf–dog hybrids. *Heredity*. 90. 17-24.

- Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., van de Lee, T., Hornes, M., Friters, A., Pot, J., Paleman, J., Kuiper, M., Zebeau, M. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acid Research*. 23. 4407-4414.
- Wade, C. 2011. Inbreeding and genetic diversity in dogs: Results from DNA analysis. *The Veterinary Journal*. 189. 183–188.
- Wang, X. 1993. Transformation from Plantigrady to Digitigrady: Functional Morphology of Locomotion in *Hesperocyon* (Canidae: Carnivora). *American museum of Natural history*. 3069. 1-24.
- Wayne, R., Ostrander, E.A. Origin, genetic diversity, and genome structure of the domestic dog. *BioEssays*. 21. 247-257.
- Wayne, R., Ostrander, E. 2007. Lessons learned from the dog genome. *TRENDS in Genetics*. 23. 557–567.
- Welsh, J., McClelland, M. 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Research*. 18. 7213–7218.
- White, D., Wolff, J., Pierson, M., Gemmell, N. 2008. Revealing the hidden complexities of mtDNA inheritance. *Molecular Ecology*. 17. 4925 – 4942.
- Wicker, T., Sabot, F., Hua-Van, A., Bennetzen, J.L., Capy, P., Chalhoub, B., Flavell, A., Leroy, P., Morgante, M., Panaud, O., Paux, E., SanMiguel, P., Schulman, A.H. 2007. A unified classification system for eukaryotic transposable elements. *Nature reviews*. 8. 973-982.
- Williams, JGK., Kubelik, AR., Livak, KJ., Rafalski, JA., Tingey, SV. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*. 18. 6531 – 6535.
- Wolf, Ch., Jürg, R., Hübner, P. 1999. PCR-RFLP analysis of mitochondrial DNA: a reliable method for species identification. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 47. 1350-1355.

- Young, A.E., Ruyn, J. R., Bannasch, D.L. 2006. Deletions in the COL10A1 gene are not associated with skeletal changes in dogs. *Mammalian Genome*. 17. 761-768.
- Zack, S. 2012. Deciduous dentition of *Didymictis* (Carnivoramorpha: Viverravidae): implications for the first appearance of „Creodonta“. *Journal of Mammalogy*. 93. 808–817.
- Zajc, I., Mellersh, C.S., Sampson, J. 1997. Variability of canine microsatellites within and between different dog Leids. *Mammalian Genome*. 8. 182 – 185.
- Zajc, I., Sampson, J. 1999. Utility of Canine Microsatellites in Revealing the Relationship of Pure Bred Dogs. *Journal of Heredity*. 90. 104 – 107.
- Zietkiewicz, E., Rafalski, A., Labuda, D. 1994. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics*. 20. 176-183.



## 9 Seznam použitých zkratek

<b>AFLP</b>	-	délkový polymorfismus amplifikovaných fragmentů (Amplified Fragment Length Polymorphism)
<b>bp</b>	-	počet párů bází
<b>DNA</b>	-	deoxyribonukleotidová kyselina
<b>dNTP</b>	-	deoxynukleotid trifosfát
<b>EDTA</b>	-	disodná sůl kyseliny ethylendiamintetraoctové
<b>F.C.E.</b>	-	Mezinárodní kynologická federace (Fédération Cynologique Internationale)
<b>ME</b>	-	Metoda minimální evoluce (Minimum evolution)
<b>ML</b>	-	Metoda maximální věrohodnosti (Maximal likelihood)
<b>MP</b>	-	Metoda maximální úspornost (Maximal parsimony)
<b>mtDNA</b>	-	mitochondriální DNA
<b>NJ</b>	-	neighbor-joining
<b>PCR</b>	-	polymerázová řetězová reakce (Polymerase chain reaction)
<b>RAPD</b>	-	náhodná amplifikace polymorfnní DNA (Random Amplified Polymorphic DNA)
<b>RFLP</b>	-	délkový polymorfismus restrikčních fragmentů (Restriction fragment length polymorphism)
<b>SNP</b>	-	jednonukleotidový polymorfismus
<b>SSR</b>	-	repetice jednotlivých sekvencí (Single Sequence Repeat)
<b>UPGMA</b>	-	Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean

# 10 Seznam tabulek

Tabulka 1: Složení PCR pro amplifikaci mtDNA .....	41
Tabulka 2: Teplotní a časový profil amplifikace .....	41
Tabulka 3: Složení sekvenační reakce .....	43
Tabulka 4: Podmínky sekvenace PCR produktů .....	44
Tabulka 5: Složení PCR reakce pro amplifikaci PCR-RFLP markeru mtDNA .....	45
Tabulka 6: Teplotní a časový profil amplifikace PCR-RFLP markeru mtDNA .....	46
Tabulka 7: Složení štěpicí reakce .....	46
Tabulka 8: Sekvence primerů a označení markerů použitých pro studium variability mikrosatelitních lokusů umístěných na gonozómu Y .....	48
Tabulka 9: Složení první PCR pro amplifikaci SSR markerů gonozómu Y .....	49
Tabulka 10: Teplotní profil PCR pro amplifikaci SSR markerů gonozómu Y .....	49
Tabulka 11: Složení druhé PCR pro amplifikaci SSR markerů gonozómu Y .....	51
Tabulka 12: Teplotní profil PCR pro amplifikaci SSR markerů gonozómu Y .....	51
Tabulka 13: Příprava a ředění vzorků pro fragmentační analýzu .....	52
Tabulka 14: Ředění směsi amplikonů .....	52
Tabulka 15: Denaturace směsi amplikonů před fragmentační analýzou .....	53
Tabulka 16: Podmínky fragmentační analýzy SSR markerů lokalizovaných na gonozómu Y	53
Tabulka 17: Přehled zástupců plemen psů u jednotlivých haplotypů – 1. část .....	53
Tabulka 17: Přehled zástupců plemen psů u jednotlivých haplotypů – 2. část .....	54
Tabulka 17: Přehled zástupců plemen psů u jednotlivých haplotypů – 3. část .....	55
Tabulka 18: Velikosti SSR alel markerů gonozómu Y u plemene československý vlčák .....	73

# 11 Seznam obrázků

Obrázek 1: Odlišení A a B haplotypů československých vlčáků pomocí mutace typu substituce .....	44
Obrázek 2: Sekvence haplotypů 1. část .....	51
Obrázek 2: Sekvence haplotypů 2. část .....	51
Obrázek 2: Sekvence haplotypů 3. část .....	52
Obrázek 2: Sekvence haplotypů 4. část .....	52
Obrázek 4: Elektroforeogram separace amplifikovaných produktů před restrikcí.....	59
Obrázek 5: Elektroforeogram separace amplifikovaných produktů po restrikci .....	60
Obrázek 6: Kladogram sestrojený na základě použití metody maximální věrohodnosti (ML, Maximal likelihood) .....	61
Obrázek 7: Kladogram sestrojený na základě použití metody neighbor-joining (NJ) .....	63
Obrázek 8: Kladogram sestrojený na základě použití metody minimální evoluce (MINEVOL, Minimum evolution) .....	64
Obrázek 9: Kladogram sestrojený na základě použití metody UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean) .....	65
Obrázek 10: Kladogram sestrojený na základě použití metody maximální parsimonie (MP, Maximal parsimony).....	66
Obrázek 11: Kladogram sestrojený na základě použití metody maximální věrohodnosti (ML, Maximum likelihood) .....	68
Obrázek 12: Kladogram sestrojený na základě použití metody Neighbor-joining (NJ).....	69
Obrázek 13: Kladogram sestrojený na základě použití metody Minimální evoluce (MINEVOL, Minimal evolution) .....	70
Obrázek 14: Kladogram sestrojený na základě použití metody UPGMA .....	71

Obrázek 15: Kladogram sestrojený na základě použití metody Maximální parsimonie (MP, Maximal parsimony).....	72
Obrázek 16: Velikosti alel SSR markerů gonozómu Y u zástupců plemene československý vlčák s gonozómem Y, který pochází z vlka Šarik.....	75

## 12 Přílohy

**Příloha 1:** Vlk obecný (*Canis lupus* L.) (Foto: Ing. Daniela Čílová)





**Příloha 2:** Československý vlčák (Foto: Ing. Daniela Čílova)





**Příloha 3:** Saarloosův vlčák (Foto: Ing. Daniela Čílová)



#### **Příloha 4:** Složení pufrů použitých pro gelovou elektroforézu

**Vzorkový pufr** (Sambrook et al., 1989) získáme smícháním 0,25 % bromfenolové modři – sodná sůl (Serva, SRN), 0,25 % xylenocyanolové modři FF (Sigma, USA), 15,0 % ficolu (Sigma, USA). Vše se nechá rozpustit ve sterilní 2x deionizované H<sub>2</sub>O a uchovává se při 4 °C.

**10x TBE pufr** (Sambrook et al., 1989) získáme smícháním 450 nM Tris-kyseliny borité (Sigma, USA) s pH 8,0, 10 mM EDTA (Sigma, USA). Uchováváme při 4 °C.

**1x TBE pufr** (Sambrook et al., 1989) získáme naředěním 10x TBE pufru 1x deionizovanou H<sub>2</sub>O. Uchováváme při 4 °C.

**Zásobní roztok ethidium bromid** (Sambrook et al., 1989) obsahuje 10 mg ethidium bromidu (Sigma, USA) a 1 ml sterilní 2 x deionizované H<sub>2</sub>O. Při přípravě a manipulaci je důležitá ochrana, proto pracujeme v ochranných rukavicích. Roztok se uchovává ve tmě při teplotě 4 °C.

**Elektrodový pufr** získáme smícháním 1500 ml 1x TBE s 75 µl zásobního roztoku ethidium bromidu. Při přípravě a manipulaci je důležitá ochrana, proto pracujeme v ochranných rukavicích. Pufr je určen pro okamžité použití.

**1x TE** (Sambrook et al., 1998) obsahuje 10 mM Tris (pH8) (Sigma, USA), 1 mM EDTA (Sigma, USA). Pufr se připravil jako 10x koncentrovaný zásobní roztok.