

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra genetiky a šlechtění



Analýza mikrosatelitní DNA fretky (*Mustella putorius furo*)

Diplomová práce

Autor:

Bc. Tereza Henclová

Reprodukční biotechnologie

Vedoucí práce:

Ing. Petr Sedlák, Ph.D.

© 2020 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Analýza mikrosatelitní DNA fretky (*Mustella putorius furo*)" 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 23.7.2020

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala vedoucímu své práce Ing. Petru Sedlákoví, Ph.D., za odborné vedení, velkou trpělivost, ochotu a pomoc při zpracování práce. Dále bych také ráda poděkovala Ing. Vladimíře Sedlákové, Ph.D., za pomoc při přípravě vzorků v laboratoři a optimalizaci panelu markerů.

Analýza mikrosatelitní DNA fretky (*Mustella putorius furo*)

Souhrn

Ve spolupráci s chovateli byly odebrány vzorky bukálních buněk pro izolaci celkové DNA. Odebrány byly v letech 2018-2019 na výstvěch, v útulku a u soukromých chovatelů. Dále byla DNA izolována pomocí kitu (kit Qiagen) pro extrakci živočišné DNA. Vzorky DNA byly kvantifikovány, naředěny na standardní koncentraci (5 µg/ml) a otestovány pomocí panelu vybraných mikrosatelitních markerů (celkem 7) podle studie Ernest et al. (2012) metodou multiplex PCR. Tento panel byl nejprve optimalizován pro laboratorní vybavení Katedry genetiky a šlechtění. Polymorfismy byly zpracovány v programu GeneMapper 4.1 (Applied Biosystem). Data byla rozříděna podle kategorií celková populace (celý soubor vzorků), pohlaví, region (původ) a fenotypy. Kategorizovaná data byla analyzována programem GenALEX pomocí popisných charakteristik. Program hodnotil následující parametry: frekvenci a distribuci alel, základní popisné charakteristiky (počet alel, efektivní velikost populace, Shannonův index, pozorovaná heterozygotnost, očekávaná heterozygotnost a fixační index), Hardy-Weinbergovu rovnováhu, heterozygotnost, genotypovou vzdálenost, souhrny příbuznosti párů (Ritland (1996), Queller and Goodnight (1989), analýzu molekulární variace (AMOVA) a genetickou vzdálenost mezi fenotypy (na základě Neiovy genetické distance). Data byla také analyzována programem DARwin, který vytvořil fylogenetický strom testované populace. Na základě výsledků těchto analýz byly vyvozeny závěry o variabilitě mikrosatelitní DNA populace chovaných fretek. Na základě těchto analýz bylo zjištěno, že populace fretek v České republice vykazuje dobrou úroveň variability. Její zdroje jsou hlavně tuzemské chovy. Zaharniční chovatelská spolupráce by jistě přispěla k zvýšení variability u fenotypů DEW, panda a skořicový. Populace českých tchořovitých a černotchořovitých fretek má vysokou variabilitu a nevykazuje žádné významné odchylky, tudíž mají nižší riziko inbreedingu a přenosu dědičných chorob.

Klíčová slova: Fretka; mikrosatelitní markery; polymerázová řetězová reakce, variabilita populací

Analysis of microsatellite DNA of the ferret (*Mustella putorius furo*)

Summary

In cooperation with breeders samples of buccal cells were taken to isolate total DNA. They were taken in the years 2018-2019 at the stands, in the shelter and at private breeders. Next, DNA was isolated using a Qiagen kit for animal DNA extraction. DNA samples were quantified, diluted to a standard concentration (5 /g / ml) and tested using a panel of selected microsatellite markers (7 in total) according to the study by Ernest et al. (2012) by mutiplex PCR. This panel was first optimized for laboratory equipment of the Department of Genetics and Breeding. Polymorphisms were processed by population analysis in GeneMapper 4.1 (Applied Biosystem). Data were categorized by total population (whole set of samples), sex, region (origin) and phenotypes. Categorized data were analyzed by GenALEX using descriptive characteristics. The program evaluated the following analyzes: allele frequency and distribution, basic descriptive characteristics (number of alleles, effective population size, Shannon index, observed heterozygosity, expected heterozygosity and fixation index), Hardy-Weinberg equilibrium, heterozygosity, genotypic distance, Ritland summaries (1996), Queller and Goodnight summaries (1989), molecular variation analysis (AMOVA) and genetic distance between phenotypes (based on Nei genetic distance), and the data were analyzed by DARwin, which created a phylogenetic tree of the test population. Based on the results of these analyzes, conclusions were drawn about the variability of microsatellite DNA in the population of reared ferrets. Based on these analyzes, it was found that the population of ferrets in the Czech Republic shows a good level of variability. Its sources are mainly domestic breeds. Coarse breeding cooperation would certainly contribute to increasing variability in the DEW, panda and cinnamon phenotypes. The population of Czech sable and black sable ferret has a high variability and does not show any significant deviations, therefore they have a lower risk of inbreeding and transmission of hereditary diseases.

Keywords: Ferret; microstelite markers; polymerase chain reaction, population variability

Obsah

1 Úvod	9
2 Vědecká hypotéza a cíle práce	10
3 Literární rešerše	11
3.1 Fretka (<i>Mustella putorius furo</i>) – obecné informace	11
3.1.1 Molekulární taxonomie a fylogeneze	11
3.1.1.1 Fylogenetické vztahy mezi tchoři a fretkami.....	11
3.1.2 Karyotyp.....	12
3.1.3 Reprodukce.....	13
3.1.3.1 Reprodukce samic.....	13
3.1.3.2 Reprodukce samců.....	14
3.1.3.3 Kastrace.....	14
3.2 Fenotypové varianty	15
3.2.1 Barevné standardy	15
3.2.2 Standardy sytosti zbarvení (koncentrace).....	17
3.2.3 Standardy bílých znaků.....	18
3.2.4 Kombinace zbarvení a kresby (znaků).....	19
3.2.5 Genetika barev.....	19
3.3 Problematika chovu	21
3.3.1 Řízený chov.....	21
3.3.1.1 Genetická variabilita v chovu.....	22
3.3.2 Vrozené vady související s fenotypem.....	23
3.3.2.1 Albíni.....	23
3.3.2.2 Bílé znaky.....	23
3.3.2.3 Černé fretky.....	25
3.4 Genetické analýzy	25
3.4.1 Genetické analýzy u fretek.....	25
3.4.2 Metody pro genetické analýzy.....	25
3.4.2.1 Metoda multiplex PCR.....	25
3.4.2.2 Kapilární elektroforéza.....	26
4. Materiál a metody	28
4.1 Soubor vzorků DNA	28
4.1.1 Protokol izolace.....	28
4.1.2 Kvantifikace a ředění.....	29

4.2	Primery.....	29
4.2.1	Charakterizace vybraných markerů.....	29
4.3.	Příprava PCR reakce.....	30
4.4	Příprava vzorků na kapilární elektroforézu.....	31
4.5	Statistické zpracování dat.....	31
5.	Výsledky.....	-...32
5.1	Panel mikrosatelitních markerů.....	-...32
5.1.1	1. optimalizace.....	32
5.2.1	2. optimalizace.....	32
5.2	Detekované alely.....	32
5.3	Výsledky celkové populace.....	35
5.3.1	Základní popisné charakteristiky celku.....	35
5.3.1.1	Porovnání výsledků se studií Ernest et al., 2012.....	35
5.3.2	Hardy-Weinbergova rovnováha.....	36
5.3.2.1	Frekvence genotypů.....	36
5.3.3	Genotypová vzdálenost mezi jedinci.....	39
5.3.4	Heterozygotnost.....	40
5.3.5	Souhrn příbuznosti párů.....	40
5.3.6	Fylogenetický strom.....	41
5.4	Výsledky analýz populace tříděné podle pohlaví.....	43
5.4.1	Rozdíly v distribuci alel podle pohlaví.....	43
5.4.2	Základní popisné charakteristiky.....	44
5.4.3	Hardy-Weinbergova rovnováha podle pohlaví.....	45
5.4.3.1	Frekvence genotypů.....	45
5.4.4	Analýza variace alelických frekvencí.....	46
5.5	Výsledky analýz populace setříděné podle regionů.....	46
5.5.1	Distribuce alel v regionech.....	47
5.5.2	Základní popisné charakteristiky pro regiony.....	49
5.5.3	Hardy-Weinbergova rovnováha v regionech.....	50
5.5.4	Heterozygotnost regionů.....	52
5.5.5	Analýza variace alelických frekvencí mezi regiony.....	53
5.6	Výsledky analýz fenotypů.....	53
5.6.1	Distribuce alel v rámci fenotypů.....	54
5.6.2	Fixace alel u fenotypů.....	56
5.6.3	Hardy-Weinbergova rovnováha fenotypů.....	57
5.6.4	Heterozygotnost fenotypů.....	58

5.6.5	Analýza molekulární variace mezi fenotypy tchořovitý a černotchořovitý.....	59
5.6.6	Genetická vzdálenost.....	60
6.	Diskuze.....	62
6.1	Celkové vyhodnocení.....	62
6.2	Vyhodnocení populace podle pohlaví.....	63
6.3	Vyhodnocení regionů.....	63
6.3.1	Populace fretek v České republice.....	64
6.4	Vyhodnocení fenotypů.....	65
7	Závěr	67
8	Literatura	68

1 Úvod

Chov fretek v České republice představuje z molekulárně-genetického hlediska málo prozkoumanou oblast. V tomto důsledku je zde neznámá variabilita, možnost inbreedingu a přenosu dědičných chorob. Některé fenotypy chovaných fretek jsou spojeny se zdravotními problémy. V českých chovech by měla dle informací uváděných Svazem chovatelů feretk probíhat revitalizace domestikovaných fretek tchořem evropským, z důvodu zvyšování variability. Diplomová práce tedy zkoumá formou experimentu variabilitu mikrosatelitní DNA fretek (*Mustella putorius furo*), podle které je dále hodnocena variabilita chovů v souvislosti s pohlavím, původem a určitým fenotypem.

2 Vědecká hypotéza a cíle práce

Vědeckou hypotézou diplomové práce je, že analýza mikrosatelitní DNA poskytne informaci o rozsahu variability populace fretek chovaných v České republice.

Cílem práce je získat vzorky DNA zástupců fretky fretek (*Mustella putorius furo*) chovaných v České republice, optimalizovat panel vybraných mikrosatelitních markerů specifických pro tento druh a ozřejmit rozsah genetické variability v místních poměrech chovu této šelmy.

3 Literární rešerže

3.1 Fretka (*Mustella putorius furo*) – obecné informace

3.1.1 Molekulární taxonomie a fylogeneze

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

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

3.1.1.1 Fylogenetické vztahy mezi tchoři a fretkami

Podle genetických testů v 70. letech bylo prokázáno, že předek fretky je tchoř tmavý. Sdílejí stejný počet chromozomů ($2n = 40$), zatímco tchoř stepní má pouze 38 chromozomů. I když fretka vznikla z tchoře tmavého, při jejím křížení s tchořem stepním dokáže produkovat plodné potomstvo (Grafodatskij et al., 1976).

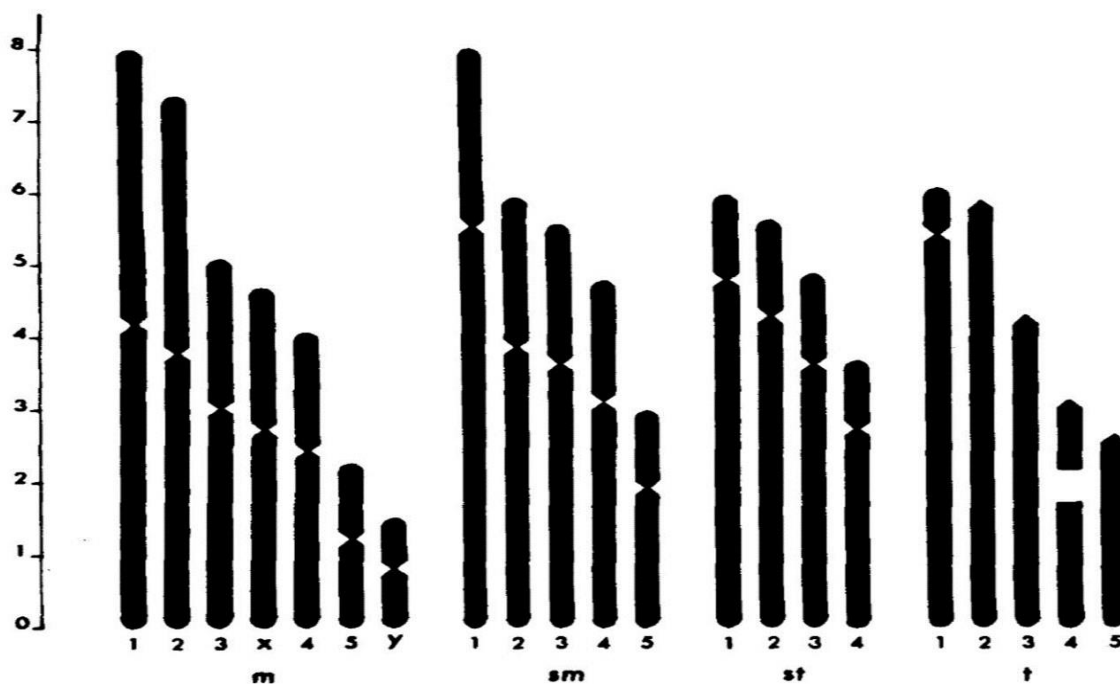
Davison et al. (1999) uvádí, že po introdukci domestikovaných fretek do Velké Británie mnoho jedinců tohoto druhu buď uteklo na svobodu, nebo bylo vypuštěno svými chovateli do místní volné přírody. Populace tchořů klesla během 1. světové války. K objasnění, zda současná expandující populace tchoře je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

Man). Sekvence cytochromu B druhého haplotypu F byla totožná se dvěma fretkami v databázi Genbank. Tyto dva haplotypy cytochromu B odpovídaly dvěma odlišným D-smyčkám. Haplotyp F byl také nalezen ve fenotypu slovinského tchoře.

3.1.2 Karyotyp

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

Frykman (1972) a Omodeo a Renzani (1966) uvádějí, že chromozómy fretky jsou rozděleny do čtyř skupin stejně, jako tomu je i u jiných savců (obrázek 1). Skupiny jsou nazývány dle lokace centromery na chromozómech. Ve skupině m (metacentrické) je pět párů autozómů a gonozómy X a Y. Všechny jsou rozeznatelné podle poměru délky jejich ramen. Ve skupině sm (submetacentrické) je umístěno také pět párů autozómů. Skupinu st (subtelocentrickou) tvoří čtyři páry autozómů. Skupina t (telocentrická) obsahuje pět párů autozómů.



Obrázek 1. Idiogram – rozdělení chromozómů do skupin m, sm, st a t. V každé z nich jsou jednotlivé chromozómy číslovány v pořadí podle klesající délky (Zdroj: Frykman, 1972).

3.1.3 Reprodukce

Domestikované fretky jsou sezonně polyestrické (Hrapkiewicz a Medina, 2006). Pohlavní cyklus ovlivňují střídající se periody dlouhých a krátkých dnů. Obě pohlaví jsou nejlodnější, když se dny začínají prodlužovat (Lindeberg, 2008). Pro zvýšení úspěšnosti zabřeznutí samice se doporučuje, aby se umístily se samcem do společného kotce již deset dní před začátkem říje. Po ukončení říje opouštějí kotec po 48 hodinách společně. Pohlavní dimorfismus je výrazný, samci jsou větší a mohutnější než samice (Purcell a Brown, 1999).

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

3.1.3.1 Reprodukce samic

Reprodukce je též závislá na datu narození, protože pohlavní dospělost u samic může nastat i v 6 měsících. Běžnější je nástup říje v 8.–10. měsíci (obvykle první jaro od jejich narození (Purcell a Brown, 1999). Říje probíhá většinou od března do srpna. K ovulaci dochází 30–36 hodin po kopulaci (Hrapkiewicz a Medina, 2006). Začátek říje může být urychlen a sezóna prodloužena pomocí umělého světelného režimu a zvýšením teploty, a to až o 3 - 5 dní (Skoupá, 1998). Pohlavní aktivita může být prodloužena, pokud je fotoperiodický cyklus 16 hodin denně - světlo a 8 hodin tma. S prodlužující se délkou dne nastupuje říje. Mezi příznaky patří oteklá vulva (dosahuje maximální velikosti 30. den od objevení příznaků), výtok z vulvy a ochota k páření. Vulva by měla dosahovat velikosti lískového ořechu (Svoboda, 1998). Průměrně se první říje v roce objevuje okolo 20. 3. a proestální fáze se objevuje cca od 15. 2. do 15. 3. Trvá přibližně 2-3 týdny a je charakterizována rostoucím podílem epiteliálních buněk a zvětšením vulvy (Skoupá, 1998).

Při kopulaci se zvyšuje hladina luteinizačního hormonu (LH), který je zodpovědný za dozrávání vajíček a dochází k provokované ovulaci. Oocyty se do vejcovodu uvolní přibližně za 30 - 40 hodin. Otok vulvy by se měl začít zmenšovat po 2-3 dnech. Pokud otok nemizí, měla by být samice znovu připuštěna. Když nedojde k oplození, následuje většinou falešná březost (Svoboda, 1998).

Délka březosti u domestikovaných fretek dosahuje průměrně 41 dní (39-42 dní). Porod probíhá obvykle v noci. Požadovaná porodní poloha je podélná přední. Jestliže se u samice neprojeví známky pokročilejší březosti poté, co u ní byla indikována,

jedná se o falešnou březost, která trvá 40-42 dní (Hrapkiewicz a Medina, 2006). Samice rodí průměrně 8 mláďat (1-18 mláďat) o váze 6-12 gramů. Jsou slepá, hluchá a mají řídkou bílou srst (Lindeberg, 2008). Samice vychovává mláďata sama. Potravu začínají přijímat od 21. dne věku, když poprvé otevřou oči. Odstav probíhá mezi 6. – 8. týdnem života (Hrapkiewicz a Medina, 2006).

3.1.3.2 Reprodukce samců

Samci dosahují puberty v 9 měsících života (Purcell a Brown, 1999). Během říje jsou samci neklidní, mají zvýšenou pohybovou aktivitu a značkují. Samci, na rozdíl od samic, jsou schopni se pářit po celou dobu říje (Purcell a Brown, 1999). Spermatogenní aktivita samců probíhá od prosince do června (Lindeberg, 2008).

3.1.3.3 Kastrace

V klinické praxi se využívá chemická kastrace přípravkem Suprelorin (implantát). Používá se u psů a fretek (zdravých, nekastrovaných a pohlavně dospělých) k vyvolání dočasné neplodnosti. Implantát se zavádí podkožně (injekčně) do volné kůže na hřbetě mezi lopatky a pomalu nepřetržitě uvolňuje nízkou dávku deslorelinu. Samci fretek se vyznačují silným pižmovým zápachem. Chirurgická gonadektomie byla rutinně prováděna v klinické praxi, aby se snížil tento typický zápach a inhibovalo se agresivní chování. Nevýhodou je, že časně chirurgické kastrace zvyšují výskyt onemocnění nadledvin (druhově specifický neoplastický stav) a prostatické hyperplazie samců (Bo et al., 2019). Účinek přípravku Suprelorin se dostaví přibližně po 5 až 14 týdnech. 9,4mg implantátu účinkuje po dobu 16 měsíců, poté může být v případě potřeby implantát opětovně zaveden. Účinná látka v přípravku Suprelorin (deslorelin) působí jako přirozený gonadotropin uvolňující hormon (GnRH), který řídí vylučování dalších hormonů ovlivňujících plodnost. Tím dojde k potlačení (blokaci) tvorby folikuly stimulujícího hormonu (FSH) a luteinizačního hormonu (LH). V důsledku toho cirkuluje v krvi fretek méně testosteronu, přestává se vytvářet sperma a snižuje se jejich libido. Pokud se samec léčený přípravkem Suprelorin spáří s říjnou samicí, bude pravděpodobnost březosti samice extrémně nízká. V místě implantátu se může přechodně objevit mírný otok, svědění nebo zarudnutí (van Zeeland et al., 2014).

U negonadektomizovaných samic hraje chronická stimulace nadledvinek luteinizačním hormonem klíčovou roli v patogenezi adrenokortikálních nádorů. Gonadotropní hormon (GnRH) vyvolává sekreci folikuly stimulujícího hormonu (FSH) a luteinizačního hormonu (LH) z přední hypofýzy. FSH a LH stimulují gonády k syntéze a sekreci hormonů (estrogenů), které negativní zpětnou vazbou regulují pulzativní uvolňování GnRH a následně i LH a FSH. U gonadektomizovaných fretek však chronická stimulace adrenálních receptorů, které nejsou regulovány gonadotropiny (zejména LH), vede k hyperplastické reakci a k neoplastickému vývoji nadledvin. Jejich adrenální žlázy vylučují abnormální množství pohlavních hormonů (estradiol, 17- hydroxyprogesteron a androstendion), což způsobuje alopecii, svědění, kožní atrofii, agresivní chování, hubnutí,

letargii a vulvární otoky (Schoemaker et al. 2000, Bo et al., 2019). Chemická kastrace samic se též provádí přípravkem Suprelorin, který zastavuje říjí a funguje zhruba 10-40 měsíců. Fretku lze opětovně zařadit do chovu, pokud bude implantát chirurgicky vyjmut, nebo po ukončení působení Suprelorinu. Wagner et al. (2009) uvádí, že u většiny nekastrovaných fretek dochází opakovaně k problémům s říjí. Samice zůstávají v říjí tak dlouho, dokud nedojde k páření se samcem. Pro fretku je nebezpečné, pokud je v říjí déle než 4 týdny. Během říje se zvyšuje hladina estrogenů v krvi, která po delší době způsobuje útlum kostní dřeně, což má za následek chudokrevnost a sníženou imunitu. Kastrované samice se dožívají vyššího věku. U samců fretek se silným pižmovým zápachem byla chirurgická gonadektomie rutinně prováděna v klinické praxi, aby se snížil tento typický zápach a inhibovalo se agresivní chování. Nevýhodou je, že časné chirurgické kastrace zvyšují výskyt onemocnění nadledvin (druhově specifický neoplastický stav) a prostatické hyperplazie samců (Bo et al., 2019).

3.2 Fenotypové varianty

Lewington (2007) uvádí, že neexistují žádná specifická plemena fretek, ale barevné standardy a rázy existují. Chovatelský standard, vytvořen americkým svazem chovatelů feretek (The American Ferret Association, Inc., AFA), je směřován na podporu chovu zdravých fretek odpovídajících stavbou těla původnímu určení fretek (ferreting). Odchylky těchto standardů jsou závadné, stejně jako upevňování znaků, které se běžně u fretek nevyskytují, například neuznávají angorskou variantu. Jedinci tohoto typu se na výstavách neumísťují dobře kvůli slabé tělesné stavbě, tudíž AFA odmítá angory uznat z důvodu zdravotních důsledků přešlechtění, jako je nízká hustota kostí, tendence ke kostním nádorům, slabá stavba těla a krátkověkost (okolo tří let). AFA uznala následující standardy pro účely výstavy a chovu (standardy jsou též uvedeny na internetových stránkách Spolku chovatelů fretek pro Českou republiku) (SCHF, 2015 a AFA, 2020).

3.2.1 Barevné standardy

1. Albín (albino) – Krycí srst a podsada je bílá až krémová. Bez masky. Barva očí je pouze červená a čenich je vždy růžový (obrázek 3A).

2. Tmavooký bílý (Dark Eyed White, DEW) - Krycí srst a podsada je bílá až krémová. Maska chybí. Oči jsou karmínově červené a čenich růžový (obrázek 2B).

3. Šampaňské (champagne) – Krycí srst je žlutohnědá až béžová. Podsada je bílá až krémová. Maska má tvar "bandity", "V", nebo může být neúplná. Oči jsou tmavě červené (můžou být i světlejší). Čenich je béžový, růžový, nebo se světle hnědým obrysem "T" (obrázek 2C). Je-li champagne gen (*cp*) ovlivněn genem B, výsledkem bude "kouřově šampaňské" zbarvení. Je-li ovlivněn recesivní alelou b, výsledkem bude více zlaté šampaňské nebo "topasově šampaňské" zbarvení (Grabolus et al., 2019).

4. Skořicový (cinamon) – Krycí srst je světle červenohnědá. Podsada je zlatá (i světlejší je přijatelná). Maska může mít rozdílnou barvu, nebo odstín. Oči jsou tmavě červené

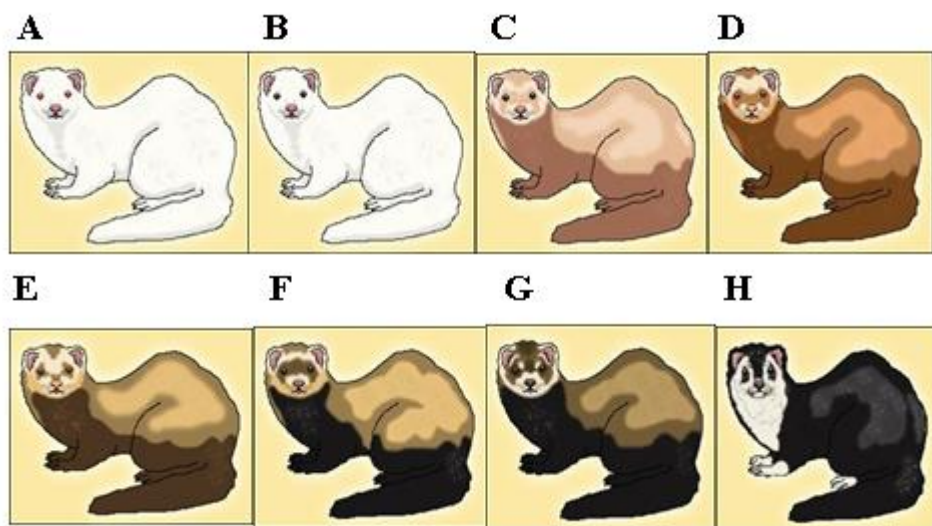
(můžou být i světlejší). Čenich je žádoucí cihlově oranžový, béžový nebo se světle hnědým či cihlově oranžovým obrysem "T" (obrázek 2D).

5. Čokoládový (chocolate) - zbarvení je totožné jako tchořovité, ale pesíky nejsou černé. Krcí srst je mléčno-čokoládově hnědá. Podsada je světlá, žádaná je bílá, ale jemně nazlátlá je akceptovatelná. Masky může mít rozdílnou barvu (obrázek 2E).

6. Tchořovitý (sable) – Základní zbarvení domestikované fretky. Znaky a maska se podobají původní formě nedomestikovaného tchoře tmavého, neboli evropského. Krcí srst je tmavě hnědá až černá. Podsada je světlá až béžová, nebo krémová a neměla by být žlutá. Masky je nejčastěji ve tvaru "bandity" a může mít rozdílnou barvu nebo odstín. Oči jsou tmavě hnědé až k černé. Čenich má být světle hnědý, skvrnitý nebo s hnědým obrysem "T" (obrázek 2F). Srst, která se jeví jako "modrá - blue" je způsobená d alelou s tchořovitým pigmentem (Grabolus at al., 2019).

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

8. Černý (black) – Krcí srst je černá. Podsada je žádaná bílá. Masky je tmavá. Oči jsou tmavé až černé. Čenich je černý nebo tmavě hnědý, může být i černo skvrnitý. Vždy pouze s bílými ponožkami a nikdy v koncentraci typu jednobarevný nebo standardní (obrázek 2H).



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

3.2.2 Standardy sytosti zbarvení (koncentrace)

AFA shrnula skupiny greying a silvermitt do jedné zvané "roan". Přesto jsou tyto koncentrace rozdílné, jak je uvedeno níže v textu.

1. Jednobarevný (solid, self) - Pesíky krycí srsti by měly být barevné bez bílých. Rozdíl mezi hustotou zbarvení končetin a těla je minimální a na pohled se jeví, jako jednolitě (obrázek 3A). Chlupy jsou pigmentovány po celé délce až ke kořínkům.

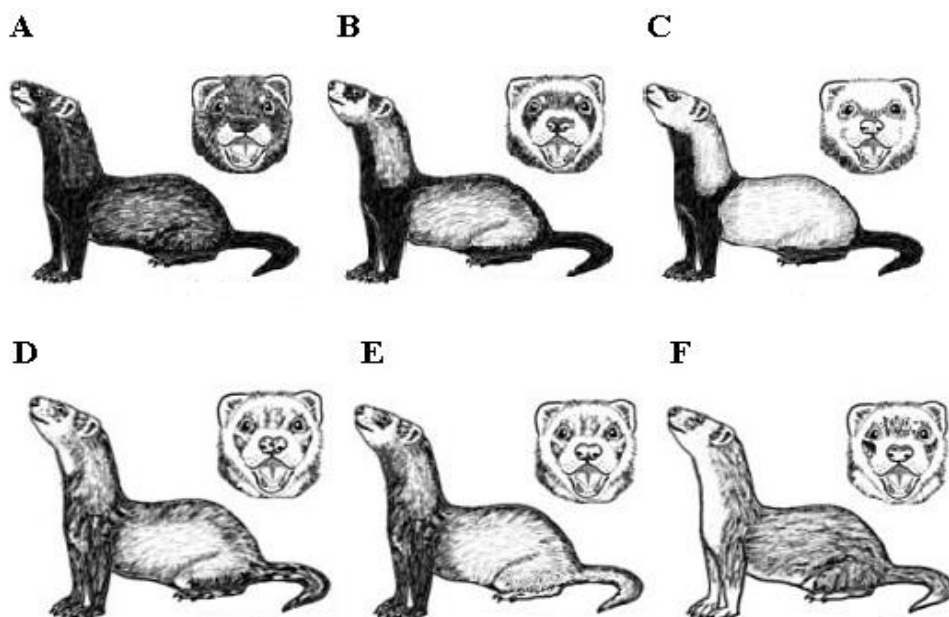
2. Standardní (bay point) - Většina pesíků krycí srsti je barevná a jenom zhruba do 10% jsou barvy bílé. Celkové zbarvení není tak jednolitě, ale je zde viditelný rozdíl mezi koncentrací zbarvení těla a končetin (obrázek 3B). Standardní koncentrace "bay point" je způsobena alelou *A* a je nejběžnější formou zbarvení nejen u fretek, ale také u dalších druhů z rodu lasicovitých. Chlupy jsou pigmentované až do 2/3 délky.

3. Siamská (siamese) - Zřetelný rozdíl je mezi zbarvením končetin a těla. Světlá podsada rozdíl ještě zdůrazňuje (obrázek 3C). Ovlivněna alelou *ip* na lokusu *I*. Chlupy bývají pigmentované jen do 1/2 délky a v zimním období pouze do 1/3 (Grabolus at al., 2019).

4. Grošovaná (roan) - Promísená srst barevných chlupů s bílými (obrázek 3D).

5. Progresivně šedivějící (greying) - Bělení začíná na ocase a bocích až ve věku 2 let a později. Není přímo vázané na určitý vzor ani barvu (obrázek 3E). Progresivní šedivění se vyskytuje i u koní a psů. U mnoha zvířat je grošovaná (šedá) dominantní a některé alely *R* lokusu jsou letální v homozygotně dominantní kombinaci. U fretek je progresivní šedivění projevem recesivní alely *gr*. Jedinci s alelami *Gr/Gr* nebo *Gr/gr* mohou vykazovat mírné grošování ve vyšším věku (Grabolus at al., 2019).

6. Stříbrná s ponožkami (silvermitt) - Promísená srst tmavých chlupů s bílými. Zatímco u progresivně šedivějící fretky se docílí promísení barevných chlupů s bílými až během života, stříbrné fretky se s touto koncentrací rodí. K této koncentraci je také vázaný znak "bílé ponožky" (neexistuje stříbrná fretka bez ponožek a bílé náprsenky), ale grošovaná a progresivně šedivějící fretka mít ponožky nemusí (obrázek 3F). Silvermitt je u fretek recesivní a má znaky podobné Irským znakům. U dominantních homozygotů a heterozygotních jedinců jsou bílé chlupy po těle zastoupeny jako grošování či siamská kresba. Recesivně homozygotní fretky mají 4 bílé ponožky na všech tlapkách s nezřetelným ukončením (Grabolus at al., 2019).



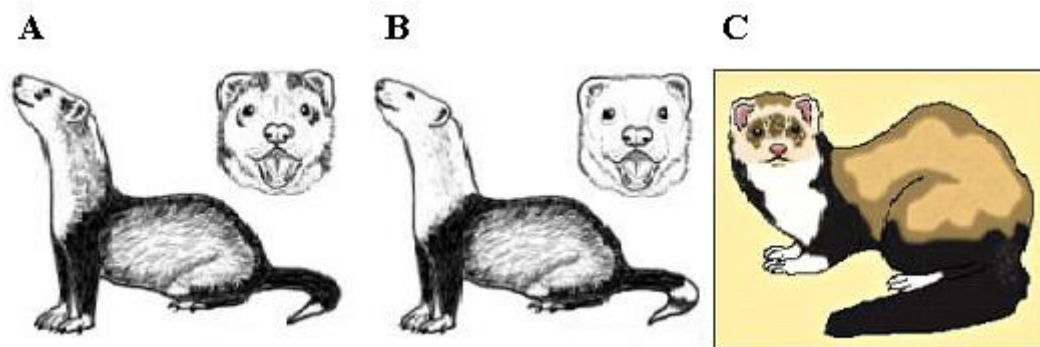
Obrázek 3. Koncentrace zbarvení (Zdroj: <http://www.fretka.cz/>)

3.2.3 Standardy bílých znaků

1. Lysina (blaze, harlekýn) - Dlouhý bílý nebo krémový pruh začínající od čela, přecházející mezi ušima na krk až k ramenům. Pruh by měl být silný a zřetelný. Zužující se pruh na vrcholu hlavy není považován za blaze. Fretky s tímto znakem musí mít na předních i zadních tlapkách bílé ponožky, a to buď do 2/3 ("mitts"), nebo jen bílé prsty ("tips") (obrázek 4A).

2. Bílá hlava (panda) - Srst na těle má jakoukoliv barvu a hlava je kompletně bílá. Povoleny jsou jenom skvrnky a kruhy okolo očí. Barva srsti těla musí začínat od ramen, aby mohla být fretka klasifikována, jako panda. Všechny končetiny jsou bílé až nad kotníky, bílá barva však nedosahuje výše než do dvou třetin délky končetin (obrázek 4B).

3. Bílé ponožky (mitt) - Srst na těle má jakoukoliv barvu. Končetiny jsou bílé až nad kotníky, bílá barva však nedosahuje výše než do dvou třetin délky končetin. Pouze bílé prsty nejsou považovány za mitt (obrázek 4C). Vzory bílých znaků na těle (náprsenka, kresby na hlavě, břicho a ocasy) se vyskytují u mnoha domestikovaných zvířat a nazývají se Irskými znaky. Tyto znaky jsou projevem recesivní alely *si*. Rozšíření a výskyt bílých znaků po těle je ovlivněný více faktory. Většina mitt jedinců začne mezi 2 - 4 rokem šedivět. Bílé znaky jsou děděny nezávisle na barvě fretky a dalších typech znaků. Určit, zda je fretka typu mitt (*si/si*) nebo silvermitt (*sab/sab*) lze prozkoumáním ponožek. U mitt jedinců bílá barva ponožek většinou končí u zápěstí a přechod bílé barvy je čistý. U typu silvermitt bílá pokračuje nahoru až do 2/3 délky tlapy až k loktům, konce nebývají jasné a bílá barva se může mísit se základní barvou. Silvermitt se nevyskytuje s žádnou jinou barvou ani vzorem kromě varianty *si* (Grabolus at al., 2019).



Obrázek 4. Standardy bílých znaků (Zdroj: <http://www.fretka.cz/>)

3.2.4 Kombinace zbarvení a kresby (zanků)

AFA má ve svých výstavních standardech fretek nejpropracovanější systém rozlišování rázů fretek. Rozlišuje se zde zbarvení, koncentraci zbarvení a umístění bílých znaků. Vzájemnou kombinací vzniká až okolo stovky různých barevných typů.

3.2.5 Genetika barev

Barva srsti zvířat závisí na přítomnosti a obsahu melaninu v kůži a vlasech. Vyskytují se zde dva typy melaninu (samostatně nebo společně), a to eumelanin a phomeomelanin (Rzepka et al. 2016). Studie Grabolus at al., 2019 uvádí že, mnoho genů hraje důležitou roli v různých stádiích melanogeneze. Některé lokusy ovlivňují diferenciaci a migraci buněk nervových hřebenů a jiné ovlivňují morfologii nebo schopnost melanocytů lokalizovat melanosomy ve vlasech a kůži. Další skupina lokusů přímo ovlivňuje enzymatickou aktivitu a proteinové sloučeniny odpovědné za proces melanogeneze. Některé geny mají alely, které ovlivňují vazbu aMSH (Metaloproteáza zinku, která specificky štěpí polyubikvitinové řetězce) na melanocyty. Všechny níže uvedené lokusy ovlivňují konečný fenotyp jednotlivce. Ve studii není uvedeno, na kterých chromozomech se dané lokusy nacházejí. Lokusy ovlivňující expresi zbarvení u fretek jsou uvedeny v tabulce 1.

Tabulka 1. Lokusy ovlivňující zbarvení podle studie Grabolus at al., 2019.

LOKUS	EXPRESE	ALELY	
		Dominantní	Recesivní
C	ovlivňuje úplné vyjádření barvy a albinismus	<i>CC</i> – úplná exprese barvy <i>Cc</i> - úplná exprese barvy, nese však vlohu pro albinismus <i>C/cp</i> - úplná exprese barvy, nese vlohu pro champagne	<i>cc</i> – albín <i>cp</i> – champagne (<i>cp/cp</i>) <i>cp/c</i> – champagne, nese vlohu pro albinismus
B	ovlivňují stavbu eumelaninu	<i>B</i> – exprese černé barvy-tchořovitý	<i>b</i> – exprese hnědého pigmentu – čokoládový
D	ovlivňuje projev pigmentace (zeslabený/úplný)	<i>D</i> - všechny pigmentové oblasti budou plně pigmentované	<i>d</i> - střídání pigmentovaných oblastí s oblastmi bez pigmentu
A	ovlivňuje expresi vzorů za pomoci upravování červeného a černého pigmentu	<i>A</i> - standardní koncentrace "Bay Point"	<i>a</i> – jednobarevný
I	ovlivňuje zeslabení a plné zesílení barvy		<i>ip</i> – siamská kresba
Si	Expresa zbacku bílé ponožky (Mitt)		<i>si</i> – s ponožkami
SAB	Ovlivňuje projev znaků stříbrná s ponožkami (Silvermitt)		<i>sab</i> – stříbrná s ponožkami
G	Ovlivňuje projev šedé barvy		<i>gr</i> – progresivní šedivění

Na lokusu C se projevuje albinismu, ale též zbarvení champagne. Je to jedna z prvních mutací, která se poprvé objevila ve Welsu okolo roku 1900. Mutace na lokusu B byla upevněna ve Skotsku opakovaným křížením champagne fretek s čokoládovými. Výsledkem je většinou vrh tchořovitých mláďat. Čokoládové a champagne alely jsou děděny nezávisle. Vrhu champagne freťat lze docílit buď křížením dvou champagne fretek, nebo křížením champagne x albín. Lokusy B a C ovlivňují přímo molekuly pigmentu, ale D lokus ovlivňuje migraci molekul pigmentu do srsti a kůže. Expresa lokusu A je špatně rozpoznatelná, protože fretky mívají podsadu v různých odstínech a může se zdát, že srst na těle je světlejší. Funkce genu na lokusu I je zeslabení nebo

zesílení množství pigmentů uložených do chlupů, a to zejména v těch oblastech, kde jsou chlupy přirozeně tenčí (Grabolus at al., 2019).

3.3 Problematika chovu

3.3.1 Řízený a cílený chov

V řízeném chovu potomci nejsou výsledkem náhodných spojení neurčitých jedinců – podléhá určitým zásadám a pravidlům (udržuje genetickou variabilitu). Cílený chov je veden za dosažením konkrétního cíle a podléhá určitým zásadám a pravidlům při výběru a vytváření chovných párů (například šlechtění na určitý fenotypový znak, nebo jeho odstranění) (Ralls et al., 1988)

V České republice chov fretek zaštiťuje Spolek chovatelů fretek (The Czech Ferret Breeders Association, SCHF). Vede také plemennou knihu, která je souhrnem informací o fretkách, jedincích užitých v chovu a jejich potomcích. Mapuje především fretky v České republice a je rozdělena do tří částí:

1. Hlavní plemenná kniha (PK) - Zapisují se zde fretky s průkazem původu, které mají známé všechny předky do třetí generace (především potomci chovných jedinců uznaných SCHF nebo jedinců akceptovaných organizací).

2. Pomocná plemenná kniha (P-PK) - Zapisují se zde fretky s průkazem původu, které nemají známé všechny předky do třetí generace, dále fretky importované se známými předky doposud nezapsané v žádné plemenné knize uznané SCHF a fretky, které jsou zapsané v jiné plemenné knize, ale majitelé mají zájem být vedení i u SCHF.

3. Zvláštní plemenná kniha (Z-PK) - Zapisují se zde fretky užitě v chovu se známými předky i bez, předci fretek s působností ve SCHF užitých v chovu, je-li to nezbytné pro potřeby PK, dále fretky s nekompletními informacemi, bez známého majitele; bez označení mikročipama tchoři i polotchoři užití v chovu fretek pro oživení krve.

Do plemenné knihy nelze zapsat mezidruhově křížence fretky s jinou lasicovitou šelmou. Výjimkou je tchoř tmavý z důvodu procesu revitalizace chovu fretek (SCHF 2020).

Tvar zápisu

Existují dvě verze zápisu do plemenné knihy. Liší se informací o roku narození. U verze č.2 se uvádí rok zápisu do PK místo roku narození.

verze 1:

PK-SCHF/20050112CZ

PK = hlavní plemenná kniha

SCHF = Sdružení chovatelů fretek

2005 = rok narození

0112 = číslo fretky/číslo zápisu v daném roce

CZ = země narození/země původu

verze 2:

SCHF12011001CZ

SCHF = Sdružení chovatelů fretek

1 = oddíl plemenné knihy (1 - hlavní, 2 - pomocná, 3 - zvláštní)

2011 = rok narození (v tomto případě rok zápisu) - fretka se narodila v roce 2005

001 = číslo fretky/číslo zápisu v daném roce

CZ = země narození/země původu fretky

"PK" může být nahrazeno příslušnou pomocnou částí P-PK, nebo částí zvláštní Z-PK. Před rokem narození může být napsáno "Z", což znamená, že v tom případě se nejedná o rok narození fretky, ale jde o rok zápisu do PK z důvodu neznalosti data narození především u fretek zapsaných do pomocné části plemenné knihy.

SCHF vede také Přehled vrhů - seznam odchovů pod záštitou SCHF. Přehled rodičů a potomků s jejich číslem zápisu a odkazem na registr fretek.

3.3.1.1 Genetická variabilita v chovu

Variabilita, nebo-li proměnlivost je způsobena genotypovými rozdíly mezi jedinci. Genetickou variabilitu zvyšují mutace (změny ve struktuře genetického materiálu – vznik nových alel), genový tok (předávání genů mezi populacemi) a rekombinace. Rekombinace představují přeskupení alel (formy genů) za vzniku nových genotypů. Vznikají tak noví jedinci s kombinacemi alel rozdílnými od rodičovských. Děje se tak v důsledku volné kombinovatelnosti a crossing-overů (Flégr 2009, Ralls et al. 1988). Rozmanitost je zajištěna širokou chovnou základnou jedinců, kteří nejsou úzce příbuzní, jejich genotyp není jednotný a je tudíž variabilní. Zaručuje zdravější populaci (Relichová, 2014).

Naopak ztrátu variability způsobuje příbuzenská plemenitba (inbreeding). Míru ztráty genetické variability u konkrétního vrhu (jedince) nám určuje koeficient příbuzenské plemenitby (Fx). Ukazuje také míru dědičných znaků stejných vloh přenesených z rodičů na potomstvo. Je vyjádřen v procentech a měl by být co nejnižší (tabulka 2) (Relichová 2014, Ralls et al., 1988). Na stránkách SCHF uvádějí, že v chovech, kde existuje široká základna jedinců s vysokou genetickou variabilitou by tato ztráta neměla být vyšší než 1%. V chovech, kde je naopak tato chovná základna úzká, může být tato ztráta variability až 10%. Počítá se na 4 generace předků.

Tabulka 2. Míra ztráty genetické variability u potomků (upraveno podle studie Relichová, 2014)

PÁR	FX
Potomci dvou sourozenců	37,5 %
Rodiče x děti	25 %
Sourozenci	25 %
Polosourozenci	12,5 %
Strýc x neteř; teta x synovec	12,5 %

3.3.2 Vrozené vady související s fenotypem

Některé barevné varianty jsou spojeny se zdravotními problémy, z nichž nejznámější je hluchota. Tyto problémy souvisí s nepřítomností pigmentu (původní barva je tchořovitá), tudíž je významné, jestli a kde má jedinec bílé znaky. Problematika chovu černých fretek je ovlivněna jinými faktory.

3.3.2.1 Albíni

Albinismu je vrozená absence enzymu tyrozinázy, který je nezbytný pro tvorbu melaninu. U albinotických jedinců tak nedochází k jeho tvorbě, což se projevuje na zbarvení částí těla, za něž je melanin zodpovědný. Charakteristická je bezbarvá kůže a červeně zbarvené oči, což je způsobeno prosvítající krví v kapilárách (van Grouw 2006).

V nedávné minulosti se chovaly především albinotické fretky (využití zejména ve ferretingu – lépe odlišitelní od králíků) a zdá se, že křížení albínů jen mezi sebou způsobuje zvýšené riziko srdečních vad, křehkost kostry a menší vzrůst. Tyto problémy mohly být způsobeny i nesprávným chovem (příbuzenským křížením či zařazením nevhodných jedinců do chovu). V mnoha zemích, které mají kluby chovatelů fretek a organizace jim podobné, se dbá na to, aby spolu nikdy nekřížily dvě albinotické fretky (Nedražicová, 1999). Informace o horším sluchu albínů pravděpodobně vycházejí z nesprávné interpretace důvodů hluchoty u fretek s bílými znaky, což potvrzuje studie Piazza et al. (2014).

3.3.2.2 Bílé znaky

Bílé znaky typu panda, blaze a DEW bývají u fretek svázány s Waardenburgovým syndromem, který způsobuje nejen hluchotu, ale i poškození očí a mozku, změny v chování a také sníženou inteligenci. Nejvíce se onemocnění projevuje ve středním uchu (hluchota), dále v mozku a může zasáhnout i vnitřní orgány. Pokud je syndrom rozvinut ve velké míře, vede to k úmrtí plodu už v děloze, což ohrožuje samici i ostatní plody v děloze. Pokud je syndrom mírnější formy, může mládě zemřít po narození, nebo přežije. Dalšími projevy jsou kratší ocas a deformity končetin, problémy se zažívacím traktem, rozštěpy či

nedovyvinutí srdce, změna pohyblivosti očních víček a nemožnost jejich plného otevření tím, že jsou oči moc blízko u sebe (Heber,1999).

Piazza et al. (2014) ve své studii uvádí, že do výzkumu byl zařazen soubor 152 fretek, z toho bylo 67 samců a 85 samic, 27 angor a 125 krátkosrstých a obsahující všechny barvy a vzory. Věk se pohyboval v rozmezí od 8 týdnů do 6 let. Jedinci pocházeli z různých evropských linií (francouzských, belgických, německých, nizozemských a dánských). Ze 152 testovaných fretek mělo 71% normální sluch a 29% bylo hluchých. Z 29% hluchých fretek mělo 7% jednostrannou hluchotu a 22% mělo bilaterální hluchotu, přičemž nebyla zjištěna žádná souvislost mezi hluchotou a pohlavím ani mezi angorami a krátkostými fretkami U barvy srsti a znaků byl zjištěn významný rozdíl. Pozorován byl v prevalenci hluchoty mezi jedinci s bílými znaky a bez nich. Všechny fretky typu panda (11), americká panda (7) a blaze (9) byly hluché. Na druhé straně všechny fretky bez bílých znaků (63), měly dobrý sluch. Pouze 1 z 10 testovaných albinotických fretek byla hluchá. 8 z 26 mitt fretek bez dalších bílých znaků, 3 ze 14 mitt fretek s jinými bílými znaky, 2 z 5 DEW fretek a 3 ze 7 stříbrných fretek byly hluché. Procento hluchých jedinců u progresivně šedivějících bylo výrazně vyšší (87%) než u fretek bez tohoto znaku (9,6%) (tabulka 3).

Tabulka 3. Prevalence (%) hluchoty u 152 fretek podle různých fenotypových markerů (Zdroj: Piazza et al., 2014).

Fenotypový marker	Slyšící	Jendnostranná Hluchota	Oboustranná Hluchota	Celková hluchota	P hodnota
Celková četnost (n=152)	108 (71)	10 (7)	34 (22)	44 (29)	-
Males (n=67)	45 (67)	6 (9)	16 (24)	22 (33)	0.14
Females (n=85)	63 (74)	4 (5)	18 (21)	22 (26)	
Nealbinotičtí (n=142)	99 (70)	10 (7)	33 (23)	43 (30)	0,31
Albíni (n=10)	9 (90)	0 (0)	1 (10)	1 (10)	
Bez bílých znaků (n=63)	63 (100)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	< 0.001
Bílé znaky (n=79)	36 (46)	10 (13)	33 (41)	43 (54)	
Žádné předčasné šedivění (n=83)	75 (90)	4 (5)	4 (5)	8 (10)	< 0.001
Předčasně šedivějící (n=23)	3 (13)	2 (9)	18 (78)	20 (87)	
Krátkosrsté (n=125)	86 (69)	9 (7)	30 (24)	39 (31)	0.19
Angory (n=27)	22 (81)	1 (4)	4 (15)	5 (19)	

3.3.2.3 Černé fretky

Problematika chovu černých fretek je specifická tím, že kvůli dosažení černého odstínu srsti jsou do chovu fretek bez přiznání zařazováni norci. Norek patří mezi příbuzné druhy fretky, ale má výrazně jiné povahové vlastnosti – je těžko vychovatelný a neochotitelný. Povaha potomků takového křížení bývá největší problém. Tchoř, ze kterého fretky pocházejí, je oproti norkovi relativně snadno ochočitelný, proto nejspíš také v minulosti proběhla domestikace z tchoře. Je obtížné v České republice sehnat hodně tmavou nebo dokonce úplně černou fretku. Většina z nich má předky v Německu s pochybnými záznamy jejich původu. Bohužel se stává, že tyto fretky kupují čeští chovatelé, kteří nejsou s touto problematikou seznámeni a poté je nabízí ke krytí jako import nesoucí dobré geny (rodokmen samozřejmě chybí) (Matoušková, 2012).

3.4 Genetické analýzy

3.4.1 Genetické analýzy u fretek

V současné době se pro molekulárně genetické testy využívá zejména metoda PCR. Dříve se k těmto testům používala metoda Southern blotting, která je poměrně drahá a složitá (Koetsier et al., 1993). Dnes se používá převážně jen výzkumně. Byla plně nahrazena PCR technikami (Innis et al., 2012).

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

Mikrosatelitní markery byly zkoumány ve studii Anistoroaei a Christensen (2006), kde porovnávali mikrosatelitní markery norka s fretkou a hodnotili jejich použitelnost pro genetické analýzy napříč obou druhů. Dospěli k závěru, že mikrosatelitní markery norka amerického mohou být využity pro genetické analýzy fretky, ale pouze v omezené míře, na rozdíl od studie Ernest et al., 2012, kteří zjistili, že mikrosatelitní markery tchoře a fretky mají využitelnost při genetických analýzách obou druhů.

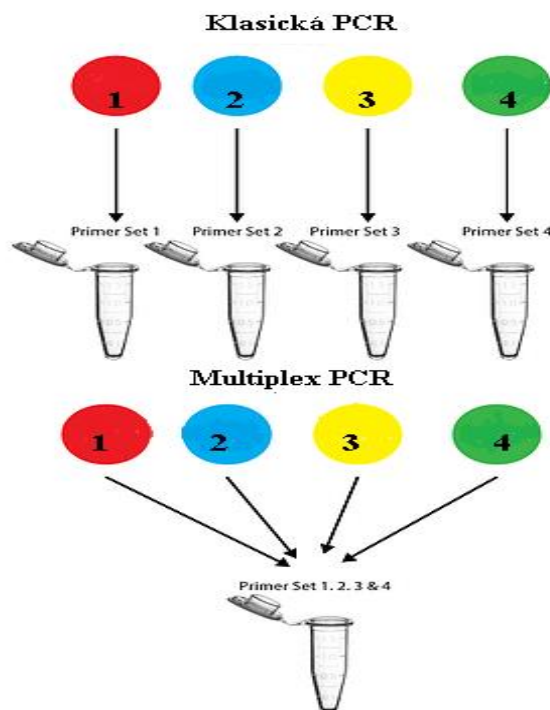
3.4.2 Metody pro genetické analýzy

3.4.2.1. Metoda multiplex PCR

PCR je enzymová metoda sloužící k syntéze definovaného úseku DNA probíhající v termocykleru. Během této metody dochází k rychlému a snadnému množení úseků DNA (až mnoha milionů kopií), založeného na principu replikace nukleových kyselin. Tato reakce probíhá v termocykleru a má 3 kroky: denaturaci (rozrušení vodíkových můstků a rozvolnění dvoušroubovice), annealing (na dvouvláknové úseky DNA-primer se váže DNA polymeráza)

a prodlužování primerů, kdy dochází k samotné syntéze DNA (Innis et al., 2012). K metodě PCR se využívají převážně mikrosatelitní markery. Mikrosatelitní DNA jsou tandemově se opakující úseky DNA o délce 1-10 párů bází (nejčastěji 2-6bp) a liší se délkou repetice (například AC17 a AC29), nebo opakujícím se motivem (například GA a TA). Mají vysokou rozlišovací schopnost heterozygotů od homozygotů. Tyto markery jsou dobře amplifikovatelné pomocí metody PCR (Budowle et al., 2005). Primery jsou krátké oligonukleotidy, které ohraničují konce 5'-3' a slouží jako počáteční místo replikace DNA.

Metoda Multiplex PCR použitá pro tuto diplomovou práci je široce rozšířená technika molekulární biologie využívaná pro amplifikaci více genových sekvencí v jedné PCR (Polymerase Chain Reaction) reakci. Založena je na použití více párů primerů (více cílových fragmentů) v reakční směsi (obrázek 5). Výhodou je úspora času v laboratoři, aniž by byla ohrožena užitečnost experimentu. Vychází tedy z klasické PCR (Poirel et al., 2011).



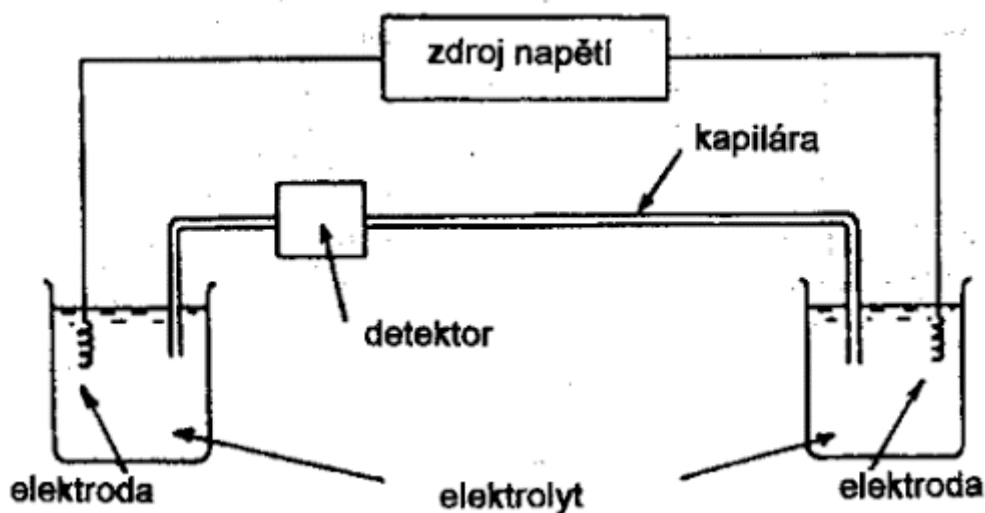
Orázek 5. Rozdíl mezi PCR a Multiplex PCR, čísla 1-4 představují markery (Zdroj: <https://info.gbiosciences.com>)

3.4.2.2. Kapilární elektroforéza

Jedná se o separační metodu, která využívá pohyb nabitých částic (například fragmentů DNA) v elektrickém poli, a to přímo ve volném roztoku elektrolytu, nebo v nosném médiu. V kapilární elektroforéze se separace provádí v kapiláře naplněné polymerem, který působí jako molekulové síto, v němž při daném poměru náboje k hmotnosti migrují menší molekuly kapilárou rychleji než větší. Využívá se pro separaci biologických makromolekul (bílkovin, fragmentů DNA) podle jejich molekulové hmotnosti (Gaš, 2001).

Na vnitřním povrchu kapiláry se stýká kapalný roztok s pevnou stěnou kapiláry a vzniká zde elektrická dvojrstva. Vnitřní stěna kapiláry (pevná vrstva elektrické dvojrstvy) je nabitá plošným elektrickým nábojem, který je nepohyblivý. Kompenzován je nábojem v kapalné části dvojrstvy, která se v elektrickém poli pohybuje. Vzniklé napětí způsobí elektroforetický pohyb analyzovaných iontů směrem k příslušnému pólu. Rychlost elektroosmotického toku je všude stejná (u stěny i uprostřed kapiláry) (Grossman a Colburn 1992, Gaš 2001).

Kapilára o malém průměru je z laboratorního skla. Kousek před koncem kapiláry je křišťálové okénko, které prosvěcuje snímač (detektor) laserem (obrázek 6). Křišťál má nejmenší schopnost pohlcovat laserový paprsek. Když molekula projde pod snímačem, detektor zaznamená signál, který zpracuje příslušný software. Výsledkem je chromatogram (soubor peaků). Kapilára má zahřáté konce na 60 °C, což blokuje vzniku vlásenek (vláseňkové struktury migrují pomaleji). Každá kapilára má omezený počet cyklů (kolikrát už byla použita) (Grossman a Colburn, 1992).



Obrázek 6. Kapilární elektroforéza (Zdroj: <http://ciselniky.dasta.mzcr.cz>).

4 Materiál a metody

4.1 Soubor vzorků DNA

Vzorky DNA byly odebrány na výstavách, v útulku fretek v Boleslavi a u soukromých chovatelů v Praze formou bukálních stěrů (bukální buňky z ústní sliznice) ve spolupráci s chovatelem. Na stěry byl použit kartáček CytoBrush určený na cytologické stěry. Následně byly opatrně vloženy zpět do obalu kartáčku, označeny a uloženy odděleně do plastového boxu, aby nedošlo k jejich kontaminaci. Uchovány byly v mrazicím boxu.

Odebráno bylo celkem 96 vzorků DNA fretek. Z toho bylo 46 samců a 50 samic. Soubor obsahuje fenotypy: albino (13), tmavooký bílý (DEW, 3), champagne (11), skořicový (3), tchořovitý (sable, 32), černotchořovitý (black sable, 26), panda (3), blaze (3), stříbrný (3), angora (3) a poloangora (3). Mezi vzorky jsou i tchoři (4), polotchoři (5) a čtvrttchoři (2). Jediní trpící hluchotou byli odebráni 3 a zahraničních fretek 24.

4.1.1 Protokol izolace

DNA byla izolována pomocí kitu pro extrakci živočišné DNA dle příbalového protokolu od Qiagen. Roztoky T1, BB, BW, B5 a TE jsou součástí kitu Nucleospin tissue od výrobce Macherey-Nagel.

Protokol:

1. Příprava vzorků – Kartáčky s obsaženou DNA byly odstříhány do polypropylenových zkumavek o objemu 2 ml.

2. Prelýza – Do každé zkumavky bylo přidáno 180 μ l roztoku T1 a 25 μ l enzymu proteinázy K. Vzorky poté byly uloženy na 30 minut do termobloku nastaveného a předeřátého na 56 $^{\circ}$ C. Každých 10 minut byly promíchány ve vortexu.

3. Lýza – Do všech zkumavek bylo přidáno 200 μ l roztoku B3 a uložily se na 10 minut do termobloku nastaveného na 70 $^{\circ}$ C. Po vyndání vzorků z termoblok byly ze zkumavek vyjmuty kartáčky.

4. Úprava podmínek pro vazbu DNA – V tomto kroku bylo do zkumavek přidáno 210 μ l 96-100% etanolu (pročištění) a postupně byly vzorky vysráženy ve vortexu.

5. Vazba DNA na membránu – Vzorky byly přelity do polypropylenových dvoudílných kolonek s uzávěrem (součást kitu). Spodek vrchního dílu kolonky je vybaven silika membránou (molekuly DNA se zde vážou na oxid křemičitý při $\text{pH} \leq 7$). Následně byly kolonky přendány do centrifugy (Centrifuge 5430R) a stočeny na 11000 otáček po dobu 1 minuty. Spodní díl obsahující roztok byl poté vylit.

6. Vymytí silika membrány - V prvním kroku bylo přidáno 500 μ l roztoku BW do každého vzorku a umístily se do centrifugy na 11000 otáček po dobu 1 minuty, pak se vylil spodní díl. V druhém kroku bylo do kolonek pipetováno 600 μ l roztoku B5 a stočily se na 11000 otáček v centrifuze po dobu 1 minuty. Spodní díl obsahující roztok byl vylit.

7. Vysušení silika membrány – Vzorky byly stočeny minutu v centrifuze na 11000. Vrchní díly byly poté umístěny do nových plastových zkumavek s uzávěrem (součást kitu). Spodní díly byly odstraněny.

8. Eluce čisté DNA – Bylo přidáno 60 μ l elučního roztoku BE (předem ohřátého v termobloku na 70 °C) do každé kolonky, nechaly se minutu odstát a poté byly stočeny v centrifuze na 11000 otáček po dobu 1 minuty. Odstranily se vrchní kolonky a spodní zkumavky obsahující vzorek byly uzavřeny.

4.1.2 Kvantifikace a ředění

Vyizolovaným vzorkům se stanovila koncentrace a čistota ve spektrofotometru (Implen). Na vršek květy se napipetovalo vždy 3 μ l vzorku, uzavřela se víčkem (ředící faktor 10). Postupně byly změřeny všechny vzorky. Před začátkem měření byl přístroj kalibrován slepým vzorkem – v tomto případě 3 μ l roztoku BE.

Stanovená koncentrace pro tento pokus byla minimálně 5 μ g/ml. Kvůli velmi rozdílným koncentracím byly vzorky DNA naředěny roztokem TE na požadovanou koncentraci 5 μ g/ml.

Vzorky měly poměr hladin absorbancí v rozmezí 1,6 – 2 (většina 1,8).

4.2 Primery

Pro pokus byly použity primery navržené do příslušné mikrosatelitní DNA fretky. Objednány byly od Thermofisher v koncentraci 100mM. Dále byly naředěny vodou na požadovanou koncentraci 4 μ M. Do reakce byly dány vždy dva primery (protichůdné) od každého z markerů, a to forwardový (F, vlákno 5'-3') a reverzní (R, vlákno 5'-3'). Značící barvičky z Dye Setu DS 33 (Life technologies) jsou již součástí primeru. 1 molekula fluorochromu (využívá Applera) je navázána na 5' konec primeru.

4.2.1 Charakterizace vybraných markerů

Vzorky DNA byly testovány pomocí panelu vybraných mikrosatelitních markerů podle studie Ernest et al. (2012) Tento panel byl nejprve optimalizován pro laboratorní vybavení Katedry genetiky a šlechtění na ČZU. Konečný soubor dvaadvaceti markerů z této studie poskytuje polymorfismy a amplifikační produkty v očekávaném rozmezí velikostí.

Z těchto 22 primerů bylo vybráno 7 vhodných (tabulka 4), tak, aby se nepřekrývaly velikosti produktů PCR a výsledky tak mohly být správně interpretovány. Všechny použité markery byly dinukleotidové (opakující se motiv například ACACACAC).

Tabulka 4. Charakterizace markerů.

Název markeru	Značení (barva)	Sekvence primerů	Počet zjištěných alel	Rozpětí alel (bp)
A10	6-FAM	F: TGGCCTATATGTGCAGATGAC R: TGTTTGTCTTGTACCCTCTGACC	5	146-154
A223	6-FAM	F: GAAGACAGCACCCCAGAGTC R: TGGTTGCCAAGAAGACTAGCAG	8	220-234
B209	6-FAM	F: TGCTTCTCCCTCTGACTGCT R: CCGCCCAAGTATCCCTAAAT	5	116-124
B9	6-FAM	F: CGTTACCAACTGTGGCTGTG R: TGCCTGGGCCTGTGATTA	7	178-190
B12	VIC	F: AGTCGACAGATGAGTCCACGAAG R: TGTCACACATGGCAGGATCT	3	177-181
B6	NED	F: TGGGTGTAGAGCATGTTTGG R: TGCCTATTCCAGGTACCTCAT	9	147-163
B217	PET	F: TTCCCTGCTTGTGCTCTCTT R: TGGGGTAAGGGTAGGTATGC	7	125-139

4.3 Příprava PCR reakce

Pro genetické analýzy se na Katedře genetiky a šlechtění byl použit MasterMix od Qiagen, který obsahuje Hot Start polymerázu. Do první zkušební reakce bylo zařazeno 6 vzorků (genotypů). Každý ze 7 markerů měl primery v koncentraci 0,02 μ M. Dále byl přidán do premixu 1x Multiplex kit (Qiagen). Premix byl testován jednotlivě na 6 genotypech (klasická PCR). Dále ještě byly testovány na stejných 6 genotypech v multiplex PCR při zachování stejných koncentrací. Po druhé optimalizaci byly stanoveny optimální koncentrace primerů pro pokus, a to A10, B6 a B9 0,02 μ M; B209 a A223 0,05 μ M; B12 0,015 μ M a B217 0,03 μ M.

Rekace proběhla v přístroji Thermal cykler c1000. Nastavení termocykleru:

1. Hot Start – 95 °C, 5 minut
2. Denaturace – 94 °C, 30 sekund
3. Annealing – 56 °C, 90 sekund
4. Elongace – 72 °C, 60 sekund

První krok odblokoval Hot Start polymerázu a již se neopakoval. Kroky 2-4 se opakovaly 35x, potom se teplota snížila na 60 °C na 48 minut (dokončení kvůli typu MasterMixu). Po ukončení teplota klesla na 12 °C na 3,5 hodiny.

4.4 Příprava vzorků na kapilární elektroforézu

Po ukončení Multiplex PCR reakce byla DNA každého vzorku naředěna v poměru 1:29 s vodou a promíchána 20 μ l pipetou. Do reakce byl přidán ještě 1x hmotnostní standard Hi-Di-Liz (ke každému vzorku, premix složený z denaturačního činidla Hi-Di a hmotnostního standardu GeneScan-600Liz).

4.5 Statistické zpracování dat

Data z kapilární elektroforézy byla zpracována a analyzována programem GeneMapper (autor Applied Biosystem), ve kterém byly na základě referenčních dat vytvořeny biny (peaky alel). Podle binů pak byly identifikovány alely. Následně byla všechna data zpracována analýzami programu GenALEx 6.51b2, který pracuje pod programem Excel. Z dat byly sestaveny tabulky dle hodnocených kategorií (celek, pohlaví, regiony, fenotypy) pro kodominantní data. V panelu nástrojů GenALEx pak byly vybrány a spuštěny analýzy. Programem GenALEx byly hodnoceny tyto analýzy: frekvence a distribuce alel, základní popisné charakteristiky (Na, Ne, I, Ho, He a F), Hardy-Weinbergova rovnováha (statistický test dobré shody - chí kvadrát test), heterozygotnost (grafy na základě individuální heterozygotnosti, H-IND), genotypovou vzdálenost, souhrn příbuznosti párů podle Ritland (1996) a podle Queller and Goodnight (1989), analýza molekulární variance (AMOVA) a genetická vzdálenost mezi fenotypy (na základě Neiovy genetické distance byla vytvořena matice).

Dále byla celková data analyzována programem DARwin, který vytvořil fylogenetický strom testované populace. DARwin je software vyvinutý pro hodnocení diverzity a fylogenetickou analýzu na základě evolučních odlišností.

5 Výsledky

5.1 Panel mikrosatelitních markerů

5.1.1 1. optimalizace

Vzorky, které měly koncentraci DNA nižší než 5 µg/ml přesto amplifikovaly. Marker A223 nefungoval v multiplexu, tak byla koncentrace jeho primerů zvýšena z 0,02µM na 0,05µM. Kvůli vysoké polymorfnosti (4 alely) vyžadoval marker B209 zopakovat při stejné koncentraci (0,02 µM). Marker B217 měl nízkou variabilitu - koncentrace primerů byla navýšena na 0,03µM. Koncentrace primerů markeru B12 byla snížena na 0,015µM (intenzivní). Zbytek markerů nepotřeboval úpravy koncentrací pro optimalizaci multiplex PCR. Zvýšením koncentrací jednotlivých primerů bylo sníženo odpovídající množství vody. Optimalizace byla spuštěna na 10 genotypech v multiplex PCR (ne jednotlivě).

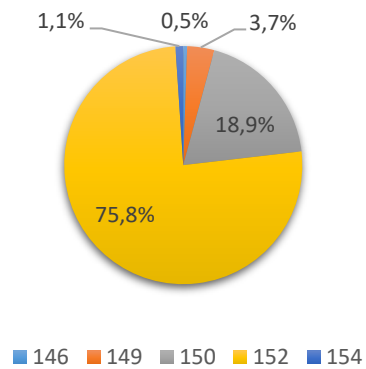
5.1.2 2. optimalizace

Koncentrace primerů markeru B209(B) byla navýšena na 0,05µM. U markeru B217(R) došlo ke křížové reakci s modře značeným primerem, což vedlo k nespecifické amplifikaci. Jeho koncentrace zůstala stejná. Finální koncentrace komponent v reakci (na 1 vzorek) je: 1x Multiplex kit (Qiagen), optimalizované koncentrace všech primerů (A10, B6 a B9 0,02µM; B209 a A223 0,05µM; B12 0,015µM a B217 0,03µM) spolu s DNA. Analýza všech vzorků proběhla na základě výsledků této optimalizace.

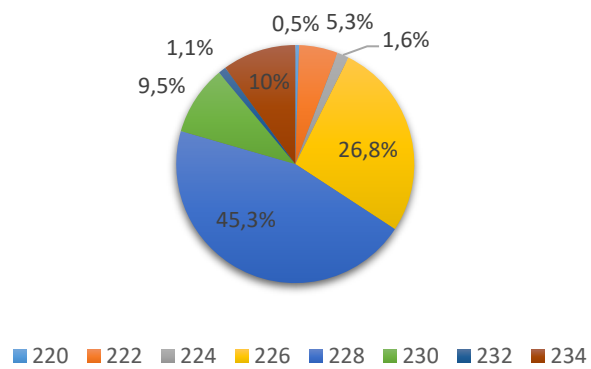
5.2 Detekované alely

Detekované alely pro každý marker a jejich procentuální zastoupení v populaci jsou znázorněny v grafech 1-7. Největší polymorfismus vykázal lokusu B6 (9 alel) a nejmenší B12 (3 alely). Nejčastějšími alelami v rámci všech lokusů je alela 152 (75,8%) na lokusu A10 a 177 (72,1%) na lokusu B12. Vzácných alel (výskyt pod 1%) bylo detekováno celkem 6, a to 146, 220, 125, 139, 147 a 151. Lokusy B209 a B9 nemají žádné vzácné alely.

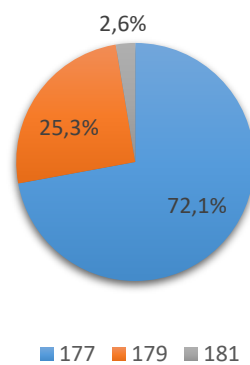
Graf 1. Alely a jejich frekvence na lokusu A10



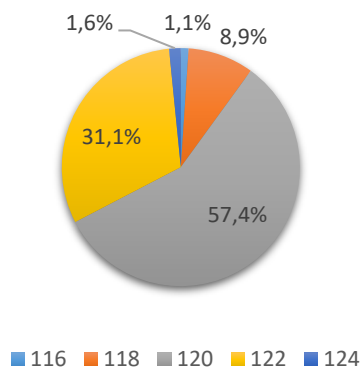
Graf 2. Alely a jejich frekvence na lokusu A223



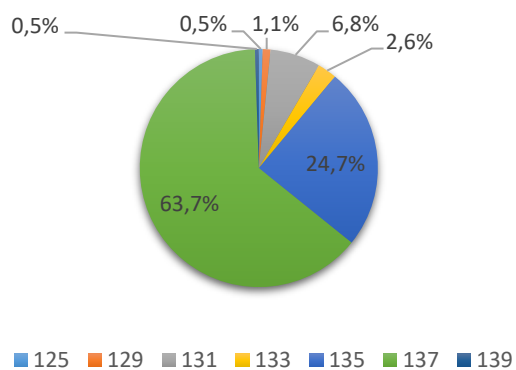
Graf 3. Alely a jejich frekvence na lokusu B12



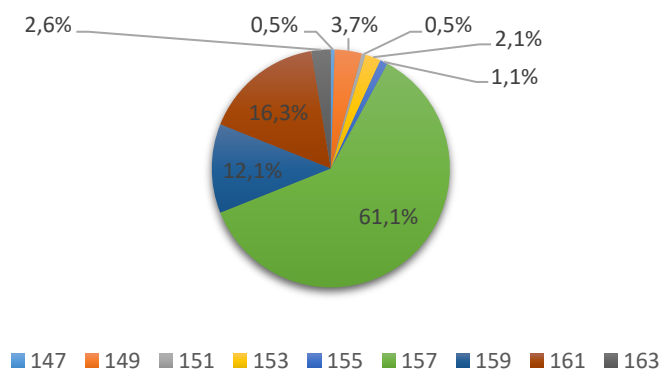
Graf 4. Alely a jejich frekvence na lokusu B209



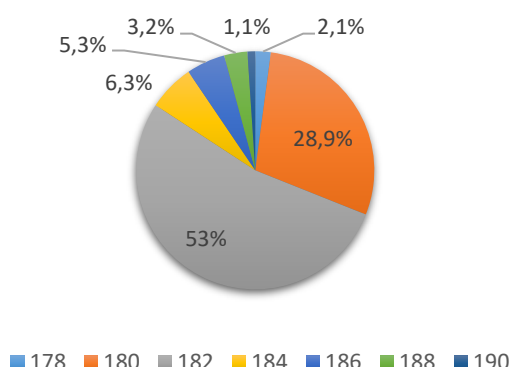
Graf 5. Alely a jejich frekvence na lokusu B217



Graf 6. Alely a jejich frekvence na lokusu B6



Graf 7. Alely a jejich frekvence na lokusu B9



5.3 Výsledky celkové populace

5.3.1 Základní popisné charakteristiky celku

Vyhodnocení základních popisných statistik pro jednotlivé lokusy je uvedeno v tabulce 5. Ne vyjdruje ideální velikost panmiktické populace pro daný lokus. Čím více alel, tím je N_e větší. Nižší Shannon indexy (pod 1,5) značí nevyrovnanost této populace, zde je to ovlivněno malou populací ($N=95$). Jestliže je pozorován rozdíl mezi hodnotami H_o a H_e značí to polymorfismus na daném lokusu. Nejvyšší rozdíl hodnot vykazují lokus B12 a nejnižší naopak lokus A10. Čím je nižší Fixation index tím je nižší fixace alel v populaci. Zvýšený F index mají lokusy B12, který má pouze 3 alely a B217, který má zvýšený F index. Nejnižší F má marker A10, který vykazují zároveň i nejnižší rozdíl hodnot mezi H_o a H_e .

Tabulka 5. Základní popisné statistiky.

Marker	Efektivní velikost populace (N_e)	Shannon index (I)	Pozorovaná heterozygotnost (H_o)	Očekávaná heterozygotnost (H_e)	Fixation index (F)
A10	1,635	0,722	0,379	0,388	0,024
A223	3,344	1,461	0,674	0,701	0,039
B12	1,711	0,679	0,358	0,416	0,139
B209	2,305	1,011	0,537	0,566	0,052
B217	2,117	1,015	0,474	0,528	0,102
B6	2,4	1,254	0,547	0,583	0,062
B9	2,669	1,263	0,6	0,625	0,04

5.3.1.1 Porovnání výsledků se studií Ernest et al., 2012.

Ve studii byly zkoumány možnosti využití mikrosatelitních markerů pro molekulárně genetické testy u obou druhů. Dospěli k závěru, že tyto markery budou užitečné pro molekulární hodnocení genetické rozmanitosti a aplikací pro vývoj, ekologii a zdraví u fretek a divokých tchořů. V tabulce 6. jsou uvedeny hodnoty, které byly v rámci studie zjištěny.

Na rozdíl od této diplomové práce nebyl detekován polymorfismus na lokusech A10, B217 a B9. Dále zde byl zaznamenán menší počet alel, než u vzorků odebraných na území České republiky, a to na lokusu A10 o 2 (5), A223 o 1 (8), B209 o 1 (5), B217 o 1 (7), B6 o 4 (9) a na B9 o 1 (7). Nejvariabilnější skupinu zde tvoří tchoři, kteří vykazují polymorfismus na každém lokusu a zároveň mají největší počet zjištěných alel.

Tabulka 6. Výsledky studie Ernest et al., 2012.

Lokus	Austrálie (N=25)			USA (N=25)			Tchoři (N=15)		
	Na	Ho	He	Na	Ho	He	Na	Ho	He
A10	2	0,12	0,12	2	0,48	0,50	3	0,20	0,19
A223	3	0,76	0,58	2	0,32	0,27	7	0,67	0,81
B12	2	0,40	0,49	2	0,32	0,44	3	0,67	0,54
B209	3	0,52	0,58	3	0,36	0,36	4	0,47	0,61
B217	3	0,32	0,29	2	0,12	0,12	6	0,40	0,55
B6	3	0,56	0,65	3	0,32	0,34	5	0,52	0,70
B9	5	0,40	0,49	2	0,12	0,12	6	0,60	0,65

5.3.2 Hardy-Weinbergova rovnováha

V populaci nebyly pozorovány významné odchylky od HW (Hardy-Weinberg) rovnováhy na žádném lokusu, byly tedy splněny podmínky pro rovnovážnou populaci podle HW. Shrnutí chí kvadrát testů je uvedeno v tabulce 7.

Tabulka 7. Chí kvadrát testy pro HW rovnováhu

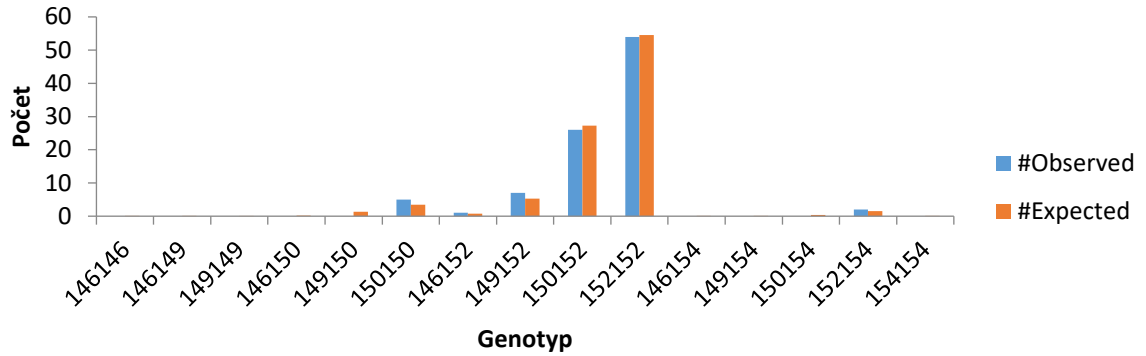
Marker	Stupně volnosti (DF)	Chí kvadrát	Pravděpodobnost	Odchylna
A10	10	3,738	0,958	-
A223	28	30,276	0,350	-
B12	3	2,634	0,452	-
B209	10	9,351	0,499	-
B217	21	25,388	0,231	-
B6	36	9,793	1,000	-
B9	21	20,026	0,520	-

5.3.2.1 Frekvence genotypů

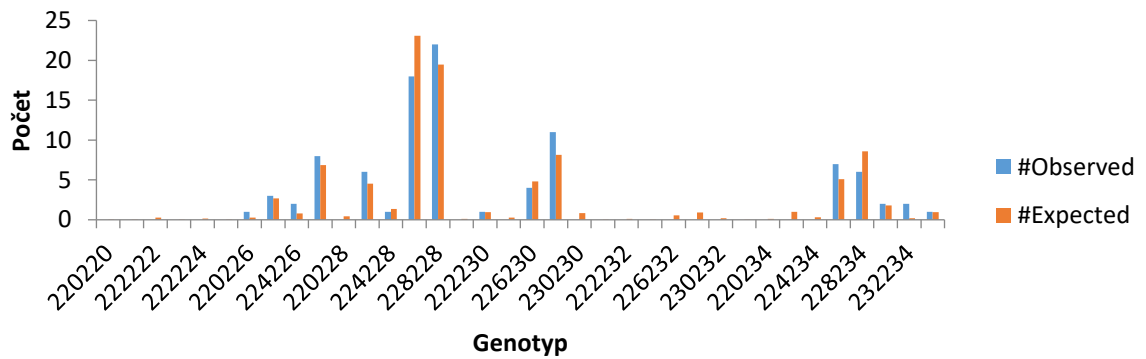
Počet a frekvence genotypů pro jednotlivé lokusy jsou znázorněny v grafech 8-14, přičemž modrá barva (observed) představuje pozorované genotypy a oranžová (expected) očekávané genotypy. Z grafů níže vyplývá, že není významný rozdíl mezi hodnotami pozorovaných a očekávaných genotypů a populace je na lokusech v genetické rovnováze.

Vyšší rozdíly hodnot jsou na lokusech s více genotypy. Největší zastoupení homozygotů (177/177) má lokus B12 a naopak nejvíce heterozygotní zastoupení mají lokusy B209 a B9.

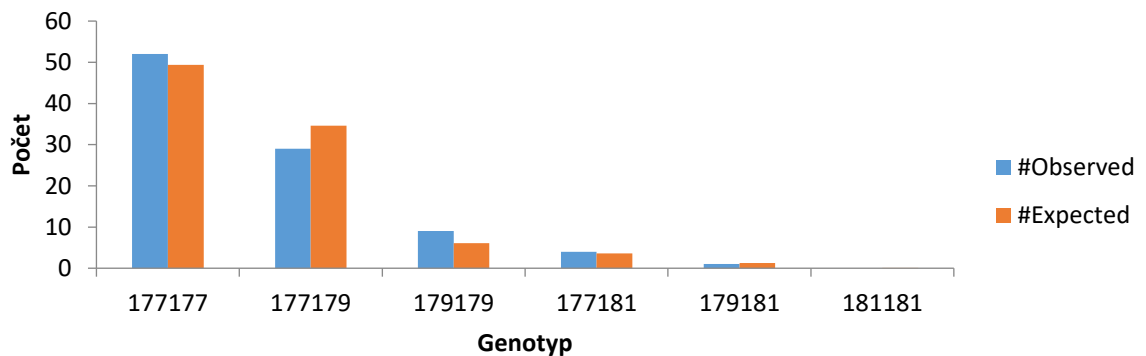
Graf 8. Distribuce genotypů pro lokus A10.



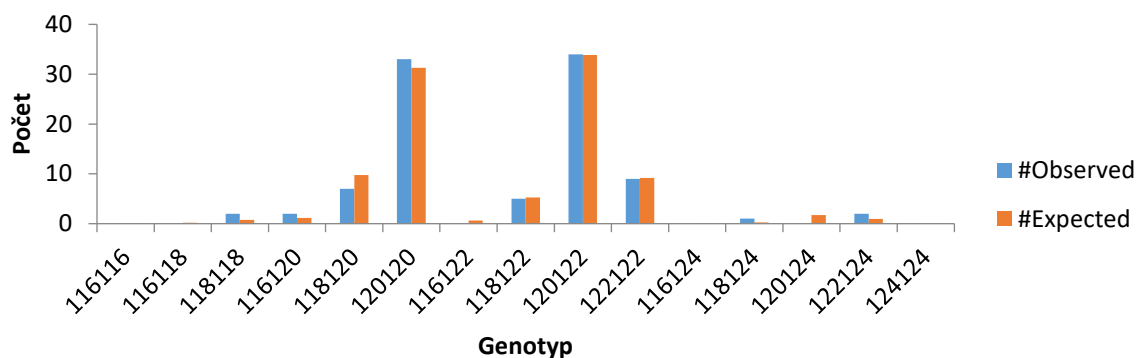
Graf 9. Distribuce genotypů pro lokus A223.



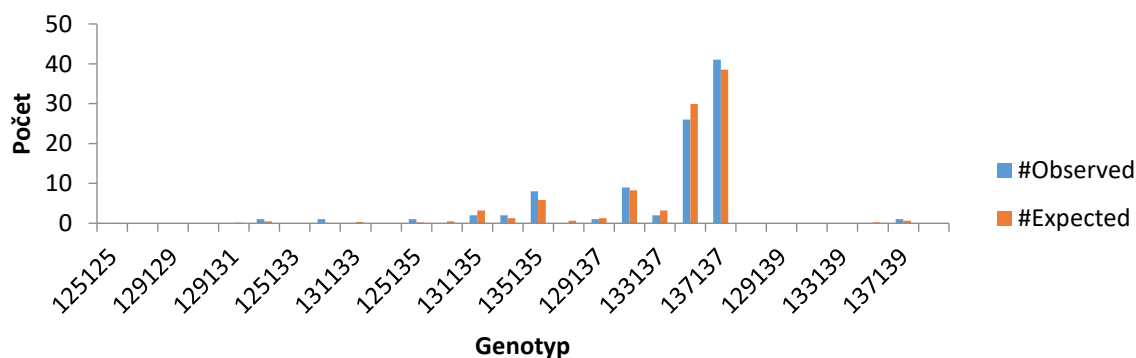
Graf 10. Distribuce genotypů pro lokus B12.



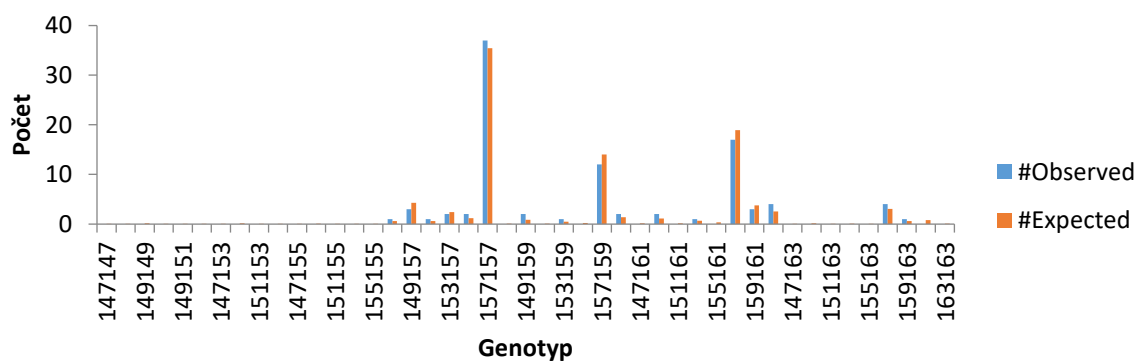
Graf 11. Distribuce genotypů pro lokus B209.



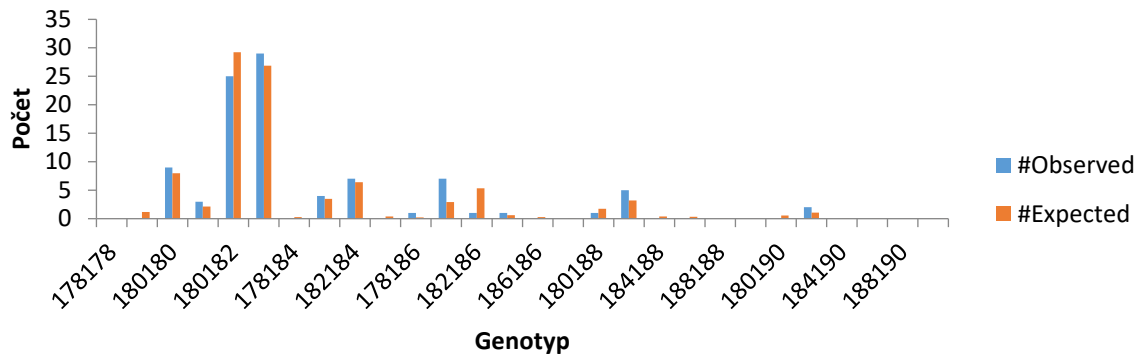
Graf 12. Distribuce genotypů pro lokus B217.



Graf 13. Distribuce genotypů pro lokus B6.



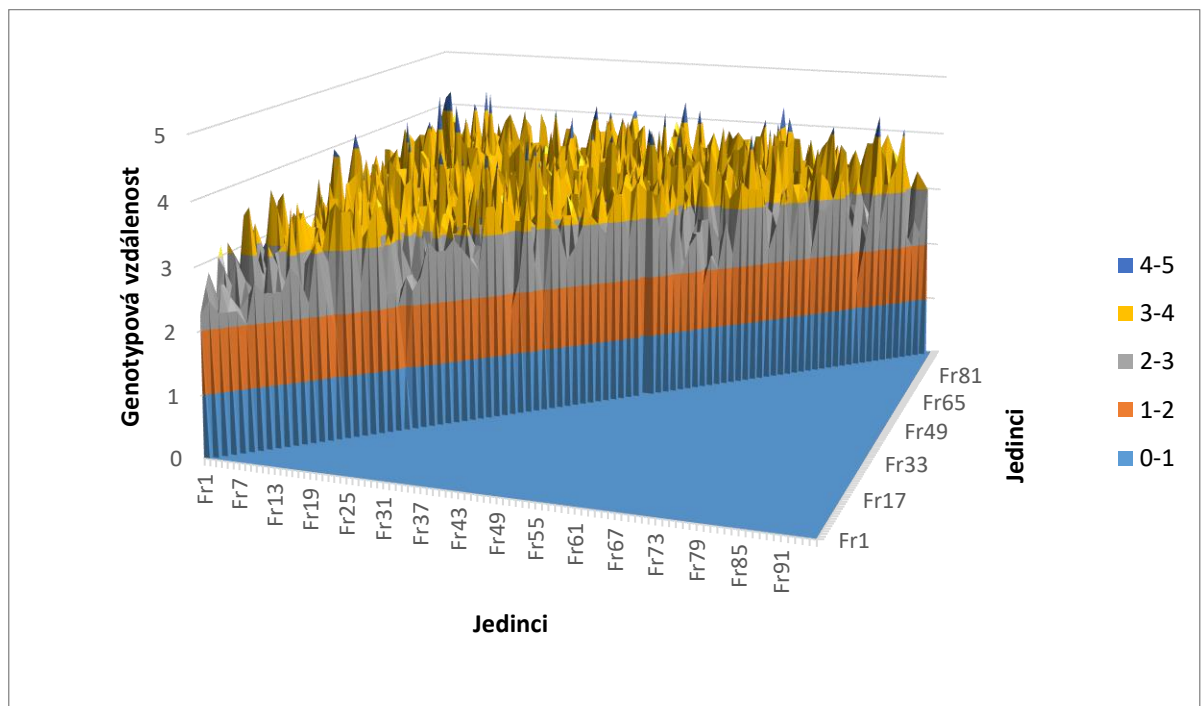
Graf 14. Distribuce genotypů pro lokus B9.



5.3.3 Genotypová vzdálenost mezi jedinci

Program GenALEx vytvořil matici (Tri Matrix) pro lineární kodominantní genotypovou vzdálenost. Vyšší genotypová vzdálenost mezi jedinci značí nižší úroveň inbreedingu, když je hodnota rovna nule, pak jsou jedinci geneticky totožní na sledovaných lokusech. Výsledky ukázaly, že průměrná genotypová vzdálenost je 3,1. Z grafu 15. je znatelné, že genotypová vzdálenost dosahuje píků převážně v šedé zóně a výše, z čehož vyplývá že, populace vykazuje nízké odchylky od průměrné hodnoty a je vyrovnaná.

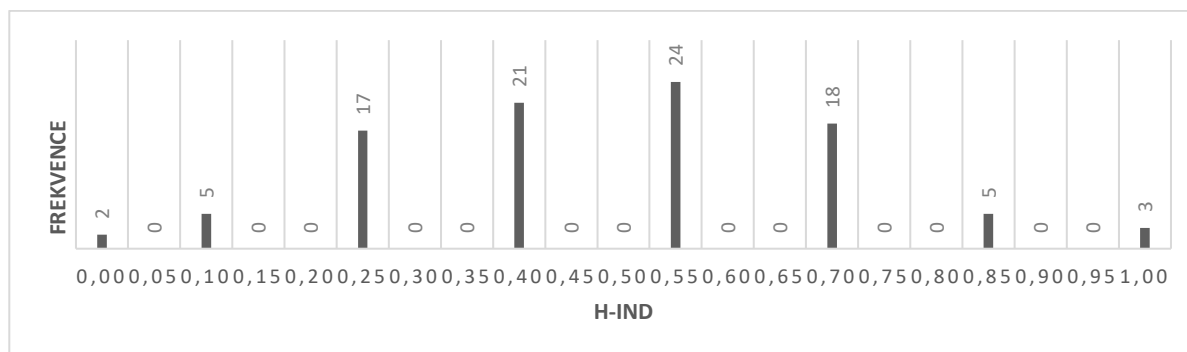
Graf 15. Lineární kodominantní genotypová vzdálenost – vytvořeno podle matice (spodní dvě osy představují kombinace jedinců).



5.3.4 Heterozygotnost

Zastoupení heterozygotů je znázorněno v grafu 16. Zobrazuje distribuci jedinců heterozygotních v n lokusech. Histogram odpovídá Gaussovu rozdělení – populace je vyrovnaná v zastoupení heterozygotů. V grafu je patrné, že v populaci byli zjištěni dva 100% homozygotní a tři 100% heterozygotní jedinci.

Graf 16. Frekvenční distribuce heterozygotů



5.3.5 Souhrn příbuznosti párů

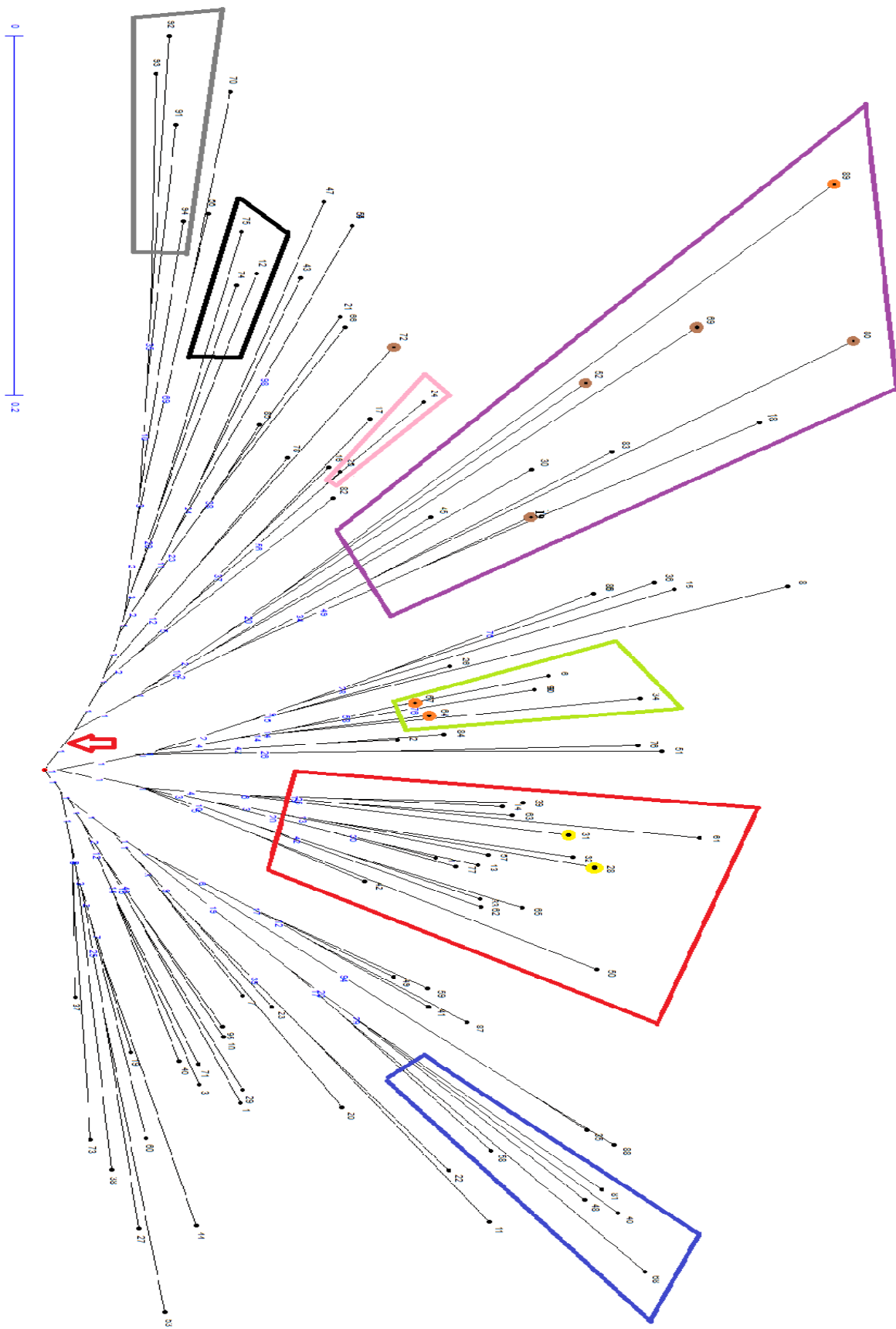
Pro srovnání byly použity dva testy, a to souhrn příbuznosti párů podle Ritland (1996) a podle Queller and Goodnight (1989). Ritland ve výpočtech zohledňuje ještě prostorovou vzdálenost. Testy proběhly s 95% preděpodobností a 1000 bootstraps. V následující tabulce (tabulka 8) je uveden výčet ze souhrnu odhadu příbuznosti párů podle RI (Ritland) a QGM (Queller and Goodnight). Průměr obou koeficientů se pohybuje v záporných hodnotách, tudíž populace nevykazuje žádný inbreeding.

Tabulka 8. Souhrn odhadů příbuznosti

	RI	QGM
Suma	4465	4465
Střední hodnota	-23,995	-47,500
Průměr	-0,005	-0,011
SD	-0,015	-0,010
SE	0,077	0,342
Minimální hodnota	0,001	0,005
Maximální hodnota	-0,166	-1,061

5.3.6 Fylogenetický strom

Na obrázku níže (obrázek 7) je zobrazeno grafické znázornění příbuzenských vztahů v této populaci. Strom byl vytvořen v programu DARwin5.0.158. Oranžové značky označují úplné tchoře, hnědé značky půltchoře. Větév označená šedou barvou představuje fretky ze Slovenska a jednu ze Španělska (nejvzdálenější bod oblasti, Fr92). Černě značená oblast zahrnuje 3 vzorky (Fr74, Fr75 a Fr12). Fr74 a Fr75 je samec a samice z Maďarska černotchořovité barvy, pravděpodobně příbuzní a Fr12 je tchořovitá samice z Čech. Růžově označená oblast obsahuje dva vzorky (Fr24 a Fr25) – sestry tchořovité barvy. Fialová oblast představuje fretky z Maďarska a zároveň má největší koncentraci půltchořů. Zeleně značená větév zahrnuje pouze jedince černotchořovité, tchořovité a dva tchoře. V červené oblasti jsou jen černotchořovití a tchořovití jedinci původem z České republiky a jeden z Ruska. Výjimku tvoří dvě hluché „pandy“ (označené žlutě). Modrá větév obsahuje pouze světlé fenotypy (albino, DEW, champagne). Většina frettek z Maďarska je na větvi označené červenou šipkou.



Obrázek 7. Fylogenetický strom z DARwin.

5.4 Výsledky analýz populace tříděné podle pohlaví

Populace byla v rámci této kapitoly rozdělena na dvě subpopulace, a to samce (N=44) a samice (N=51).

5.4.1 Rozdíly v distribuci alel podle pohlaví

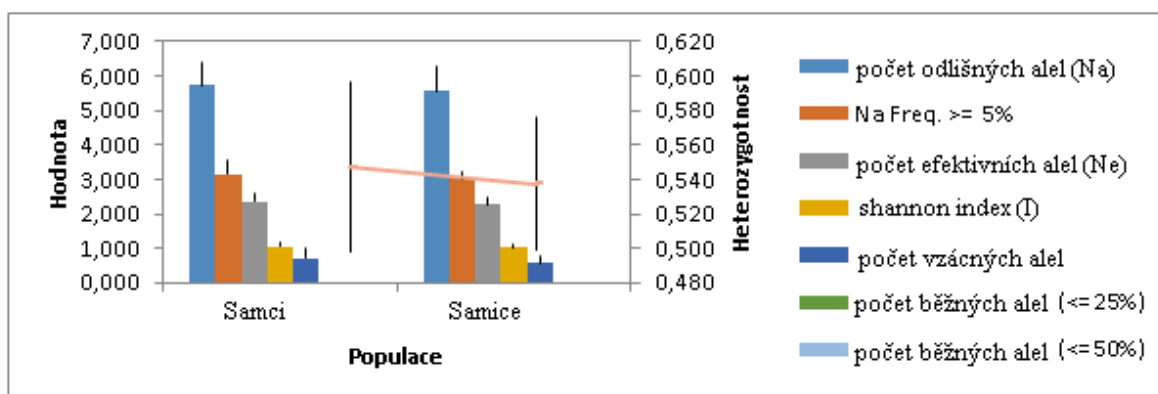
V tabulce 9. jsou uvedeny alely, které se vyskytují jen u jednoho pohlaví, nebo je jejich frekvence u jednoho z pohlaví výrazně vyšší. U alel, které v tabulce nejsou uvedeny není významně velký rozdíl v jejich frekvenci. Z tabulky vyplývá, že alely 220, 116, 129, 139 a 151 jsou zaznamenány pouze u samců a alely 146, 232, 125 a 147 pouze u samic.

Tabulka 9. Rozdíly v distribuci alel v rámci pohlaví

Lokus	Alela	Samci (N=44)	Samice (N=51)
A10	146	0,000	0,010
	149	0,011	0,059
A223	220	0,011	0,000
	224	0,023	0,010
	232	0,000	0,020
B12	181	0,011	0,039
B209	116	0,023	0,000
	124	0,011	0,020
B217	125	0,000	0,010
	129	0,023	0,000
	139	0,011	0,000
B6	147	0,000	0,010
	151	0,011	0,000
	163	0,045	0,010
B9	180	0,250	0,324
	186	0,080	0,029
	188	0,045	0,020

Na grafu 17. je patrné, že nedochází k významně velkým výkyvům hodnot v distribuci alel v rámci pohlaví. U samců je vidět vyšší heterozygotnost než u samic. Běžné alely s výskytem pod 25 % a pod 50% jsou kolem 0 (žádné odchylky). Populace jsou vyrovnané.

Graf 17. Alelický vzor subpopulací.



5.4.2 Základní popisné charakteristiky

Popisné charakteristiky pro každé pohlaví jsou uvedeny v tabulce 10. a 11. Nižší Shannon indexy jsou ovlivněny malou populací. Mezi H_o a H_e jsou zaznamnány rozdíly na každém lokusu mezi oběma populacemi, tudíž jsou polymorfni. U samců došlo k fixaci alel na lokusu B12. Dále je zaznamenána fixace také na lokusech A10, který má o alelu méně než samice a na lokusu B217 na kterém došlo k fixaci alel vazaných na chromozom Y. U samic je vyšší fixace alel na lokusech A223, B209 a B9.

Tabulka 10. Základní popisné charakteristiky pro samce ($N=44$).

Lokus	N_a	N_e	I	H_o	H_e	F
A10	4,000	1,501	0,594	0,273	0,334	0,183
A223	7,000	3,219	1,435	0,750	0,689	-0,088
B209	5,000	2,374	1,052	0,636	0,579	-0,100
B9	7,000	2,862	1,348	0,705	0,651	-0,083
B12	3,000	1,732	0,655	0,273	0,423	0,355
B6	8,000	2,770	1,352	0,614	0,639	0,040
B217	6,000	2,054	1,012	0,455	0,513	0,114

Tabulka 11. Základní popisné charakteristiky pro samice ($N=51$)

Lokus	N_a	N_e	I	H_o	H_e	F
A10	5,000	1,759	0,810	0,471	0,432	-0,090
A223	7,000	3,436	1,458	0,608	0,709	0,143
B209	4,000	2,243	0,958	0,451	0,554	0,186
B9	7,000	2,496	1,168	0,510	0,599	0,149
B12	3,000	1,686	0,689	0,431	0,407	-0,060
B6	8,000	2,098	1,125	0,490	0,523	0,063
B217	5,000	2,162	0,985	0,490	0,537	0,088

5.4.3 Hardy-Weinbergova rovnováha podle pohlaví

V populacích byly pozorovány dvě odchylky od HW rovnováhy, a to jedna u každého pohlaví. Nižší p-hodnota zamítá nulovou hypotézu čili byla porušena HW rovnováha na lokusu B217 u samců a na lokusu A223 u samic. Shrnutí chí kvadrát testů je uvedeno v tabulkách 12 a 13.

Tabulka 12. Chí kvadrát testy HW rovnováhy pro samce (N=44).

Marker	Stupně volnosti (DF)	Chí kvadrát	Pravděpodobnost	Odchylka
A10	6	2,766	0,838	-
A223	21	8,606	0,992	-
B209	10	6,462	0,775	-
B9	21	26,010	0,206	-
B12	3	6,703	0,082	-
B6	28	7,622	1,000	-
B217	15	28,341	0,020	p<0.05

Tabulka 13. Chí kvadrát testy HW rovnováhy pro samice (N=51).

Marker	Stupně volnosti (DF)	Chí kvadrát	Pravděpodobnost	Odchylka
A10	10	2,994	0,982	-
A223	21	32,786	0,049	p<0.05
B209	6	9,630	0,141	-
B9	21	10,170	0,977	-
B12	3	0,308	0,959	-
B6	28	15,439	0,973	-
B217	10	4,385	0,928	-

5.4.3.1 Frekvence genotypů

Nejsou pozorovány významné odchylky mezi pozorovanými a očekávanými genotypy. U samců se nevyskytují genotypy obsahující alelu vázanou na samičí pohlaví a naopak. Pouze na lokusu B12 se u samců očekával ještě genotyp 182182. Četnosti nejfrekventovanějších genotypů jsou uvedeny v tabulce 14., n značí počet jedinců v subpopulaci s genotypem.

Tabulka 14. Nejčtenější genotypy v rámci pohlaví na lokus.

Lokus	Samci				Samice			
	očekávaný	n	pozorovaný	n	očekávaný	n	pozorovaný	n
A10	152152	27,8	152152	29	152152	26,8	152152	25
A223	226228	10,5	228228	11	226228	12,5	228228	12
B209	120122	14,8	120122	18	120122	19,1	120120	20
B9	180182,182182	12	180182,182182	12	180182	17,8	182182	17
B12	177177	21,9	177177	25	177177	27,6	177177	27
B6	157157	13,1	157157	13	157157	22,7	157157	24
B217	137137	19,1	137137	20	137137	19,5	137137	21

5.4.4 Analýza variance alelických frekvencí

Hodnoty testu AMOVA byly vyhodnoceny na základě 999 permutací. Výsledky testu ukázaly (tabulka 15.), že populace má největší zdroj genetické variability u jedinců z opačné populace, jak se v případě rozdělení podle pohlaví očekává. Zdroj variability uvnitř populací je 0%, což ukazuje, že jedinci se uvnitř populace nemohou párovat, neboť jsou totožní. Variabilita mezi vzorky uvnitř populací je samozřejmě velmi nízká (7%). K celkové alelické variabilitě tedy přispívá párování mezi populacemi.

Tabulka 15. AMOVA samci a samice.

Zdroj	d.f.	Suma čtverců	Variance komponentů	%
v populaci mezi vzorky	1	1,417	0,000	0%
uvnitř populací u jedinců	93	190,762	0,133	7%
celkem	95	169,500	1,784	93%
	189	361,679	1,918	100%
Fst	0,004	P hodnota	0,797	

5.5 Výsledky analýzy populace setříděné podle regionů

V této kapitole byla populace rozdělena na 3 subpopulace podle regionů, a to populace České republiky (CZE, N=71), populace severní a východní Evropy (SV, N=20) a populace západní a jižní Evropy (JZ, N=4 – program GenALEX u některých analýz vyžaduje minimálně 5 jedinců v populaci, jinak jsou výsledky zavádějící). Do oblasti SV byly zařazeny fretky z Maďarska (13), Finska (1), Ruska (3) a Slovenska (3). Oblast JZ zahrnuje fretky z Francie (1), Španělska (1), Nizozemí (1) a Itálie (1).

5.5.1 Distribuce alel v regionech

V rámci regionů byly zaznamenány rozdíly v četnosti alel. Tabulky 16.-22. uvádějí frekvence alel v jednotlivých regionech podle lokusů vyjádřené v procentech. Absence více alel a výkyvy hodnot v jejich četnostech v oblasti JZ je ovlivněna malým rozsahem populace, kde je $N=4$. Region spíše pomáhá osvětlit původ alel.

Na lokusu A10 se alely 146 a 149 vyskytují pouze na území České republiky a zároveň zde dominuje alela 152. Alela 154 se vyskytuje pouze u jedinců v oblasti SV. Distribuce ostatních alel v oblastech SV a JZ je vyrovnaná.

Tabulka 16. Frekvence alel v rámci regionů na lokusu A10.

Alela	CZE (%)	SV (%)	JZ (%)
146	1	0	0
149	5	0	0
150	14	32,5	37,5
152	80	62,5	62,5
154	0	5	0

Alela 220 byla zaznamenána pouze u jednoho jedince na území CZE odebraného v útulku v Boleslavi. Pouze u dvou jedinců, z Ruska a Maďarska, byla detekována alela 232. V oblasti SV je největší četnost alely 234.

Tabulka 17. Frekvence alel v rámci regionů na lokus A223.

Alela	CZE (%)	SV (%)	JZ (%)
220	0,7	0	0
222	5,6	5	0
224	1,4	2,5	0
226	31,7	10	25
228	43	50	62,5
230	10,6	7,5	0
232	0	5	0
234	0,7	20	12,5

Pouze v oblasti CZE byly detekovány alely 116 (2x) a 124 (3x). Frekvence zbývajících alel zkrz regiony je vyrovnaná. Na lokusu dominuje alela 120 ve všech regionech. Lokus B209 je z hlediska frekvencí alel v regionech vyrovnaný.

Tabulka 18. Frekvence alel v rámci regionů na lokus B209.

Alela	CZE (%)	SV (%)	JZ (%)
<i>116</i>	1,4	0	0
<i>118</i>	9,2	7,5	12,5
<i>120</i>	53,5	72,5	50
<i>122</i>	33,8	20	37,5
<i>124</i>	2,1	0	0

V regionu SV převažuje u fretkek četnost alely *180*. V oblastech CZE a JZ dominuje alela *182*. Alely *188* a *190* byly detekovány pouze v regionu CZE. Alela *190* byla zaznamenána u dvou jedinců ze severozápadu Čech (Chomutov, Teplice).

Tabulka 19. Frekvence alel v rámci regionů na lokus B9.

Alela	CZE (%)	SV (%)	JZ (%)
<i>178</i>	2,1	2,5	0
<i>180</i>	23,9	47,5	25
<i>182</i>	57,7	35	62,5
<i>184</i>	6,3	7,5	0
<i>186</i>	4,2	7,5	12,5
<i>188</i>	4,2	0	0
<i>190</i>	1,4	0	0

Alela *181* má největší četnost v regionu SV, a to konkrétně v Maďarsku. V CZE byla detekována u dvou jedinců ze severozápadních Čech.

Tabulka 20. Frekvence alel v rámci regionů na lokus B12.

Alela	CZE (%)	SV (%)	JZ (%)
<i>177</i>	78,2	57,5	37,5
<i>179</i>	20,4	35	62,5
<i>181</i>	1,4	7,5	0

Na lokusu B6 jsou pro region CZE dvě privátní alely *147* a *151*. Odebrány byly dvěma jedincům ze středních čech. Absence alely *163* v oblasti SV naznačuje její původ v jižní části Evropy. To potvrzuje i její výskyt u jedné fretky v regionu JZ pocházející ze Španělska.

Tabulka 21. Frekvence alel v rámci regionů na lokus B6.

Alela	CZE (%)	SV (%)	JZ (%)
<i>147</i>	0,7	0	0
<i>149</i>	2,8	7,5	0
<i>151</i>	0,7	0	0
<i>153</i>	1,4	5	0
<i>155</i>	1,4	0	0
<i>157</i>	61,3	60	62,5
<i>159</i>	11,3	12,5	25
<i>161</i>	17,6	15	0
<i>163</i>	2,8	0	12,5

Alela *129* nebyla detekována u jedinců v regionu SV. Alely *125* a *139* mají pouze fretky v oblasti CZE. V rámci lokusu B217 je alela *131* nejčtenější v oblasti SV.

Tabulka 22. Frekvence alel v rámci regionů na lokus B217.

Alela	CZE (%)	SV (%)	JZ (%)
<i>125</i>	0,7	0	0
<i>129</i>	0,7	0	12,5
<i>131</i>	2,1	22,5	12,5
<i>133</i>	2,8	2,5	0
<i>135</i>	25,4	22,5	25
<i>137</i>	67,6	52,5	50
<i>139</i>	0,7	0	0

5.5.2 Základní popisné charakteristiky pro regiony

Tabulky 23.-25. uvádí základní popisné charakteristiky pro jednotlivé regiony. Výsledky v regionu JZ jsou zkrácené malým rozsahem populace. JZ v této kapitole slouží k vyřazení jedinců z oblasti SV, čímž se tento region lépe charakterizuje. Shannon indexy se blíží vyrovnanosti na lokusu A223. Nižší hodnoty ovlivňuje malý rozsah všech populací v regionech. Z hodnot H_o a H_e vyplývá, že na všech lokusech ve všech regionech je polymorfismus. Opět je zde patrná fixace alel na lokusu B217 v populacích. V regionu SV je vidět fixace alel na lokusu B6.

Tabulka 23. Popisné charakteristiky populace v regionu CZE.

Lokus	Na	Ne	I	Ho	He	F
A10	4,000	1,500	0,636	0,366	0,333	-0,099
A223	7,000	3,284	1,408	0,662	0,695	0,048
B209	5,000	2,441	1,062	0,563	0,590	0,046
B9	7,000	2,506	1,243	0,577	0,601	0,039
B12	3,000	1,532	0,577	0,324	0,347	0,067
B6	9,000	2,374	1,243	0,549	0,579	0,051
B217	7,000	1,913	0,899	0,423	0,477	0,115

Tabulka 24. Popisné charakteristiky populace v regionu SV.

Lokus	Na	Ne	I	Ho	He	F
A10	3,000	2,005	0,809	0,450	0,501	0,102
A223	7,000	3,213	1,485	0,700	0,689	-0,016
B209	3,000	1,751	0,749	0,400	0,429	0,067
B9	5,000	2,778	1,202	0,700	0,640	-0,094
B12	3,000	2,180	0,880	0,500	0,541	0,076
B6	5,000	2,462	1,195	0,500	0,594	0,158
B217	4,000	2,649	1,102	0,550	0,623	0,116

Tabulka 25. Popisné charakteristiky populace v regionu JZ.

Lokus	Na	Ne	I	Ho	He	F
A10	2,000	1,882	0,662	0,250	0,469	0,467
A223	3,000	2,133	0,900	0,750	0,531	-0,412
B209	3,000	2,462	0,974	0,750	0,594	-0,263
B9	3,000	2,133	0,900	0,500	0,531	0,059
B12	2,000	1,882	0,662	0,250	0,469	0,467
B6	3,000	2,133	0,900	0,750	0,531	-0,412
B217	4,000	2,909	1,213	1,000	0,656	-0,524

5.5.3 Hardy-Weinbergova rovnováha v regionech

Populace v regionech SV a JZ jsou vyrovnané, nebyly pozorovány odchylky od HW rovnováhy. V regionu CZE byla pozorována odchylka na lokusu B217. Vzhledem k velkému počtu očekávaných genotypů zde dominují dva (graf 18). Ostatní lokusy jsou v rovnováze. Tabulky 26.-28. uvádějí souhrny chí kvadrát testů pro jednotlivé regiony.

Tabulka 26. Souhrn chí kvadrát testů HW rovnováhy v regionu CZE.

Lokus	DF	Chí kvadrát	Pravděpodobnost	Odchylka
A10	6	2,161	0,904	-
A223	21	13,578	0,887	-
B209	10	10,634	0,387	-
B9	21	17,540	0,678	-
B12	3	1,040	0,791	-
B6	36	8,735	1,000	-
B217	21	42,434	0,004	P<0.01

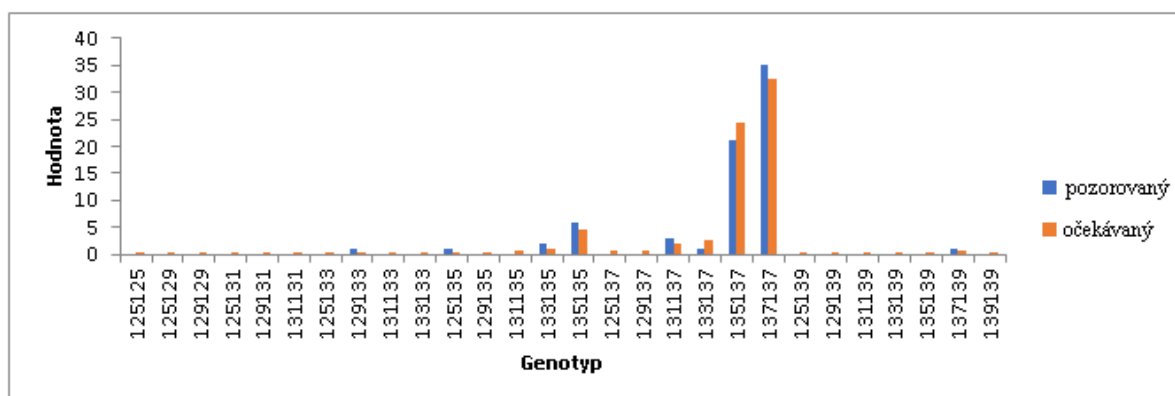
Tabulka 27. Souhrn chí kvadrát testů HW rovnováhy v regionu SV.

Lokus	DF	Chí kvadrát	Pravděpodobnost	Odchylka
A10	3	1,683	0,641	-
A223	21	16,250	0,755	-
B209	3	0,576	0,902	-
B9	10	8,525	0,578	-
B12	3	0,442	0,931	-
B6	10	10,506	0,397	-
B217	6	2,545	0,863	-

Tabulka 28. Souhrn chí kvadrát testů HW rovnováhy v regionu JZ.

Lokus	DF	Chí kvadrát	Pravděpodobnost	Odchylka
A10	1	0,871	0,351	-
A223	3	1,440	0,696	-
B209	3	2,333	0,506	-
B9	3	3,360	0,339	-
B12	1	0,871	0,351	-
B6	3	1,440	0,696	-
B217	6	4,000	0,677	-

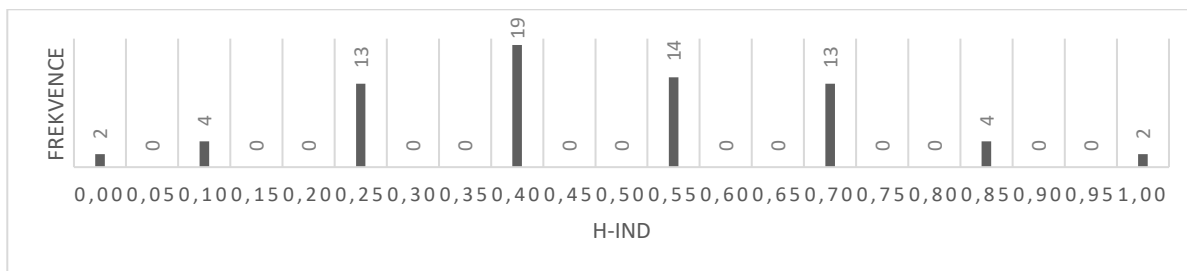
Graf 18. Pozorovaný a očekávaný genotypy na lokusu B217 v regionu CZE.



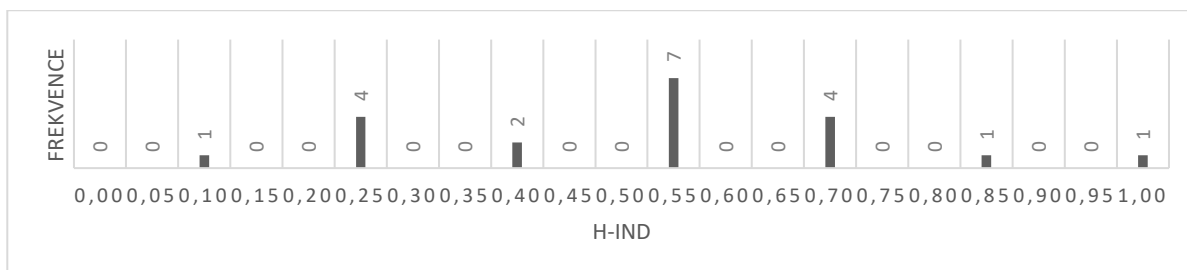
5.5.4 Heterozygotnost regionů

V regionu CZE odpovídá frekvence heterozygotů znázorněná na histogramu Gaussovu rozdělení (graf 19). V regionech SV a JZ nemá histogram Gaussovo rozdělení, což je ovlivněno malým počtem jedinců v subpopulacích. Distribuce heterozygotů v SV a JZ je zobrazena v grafech 20. a 21.

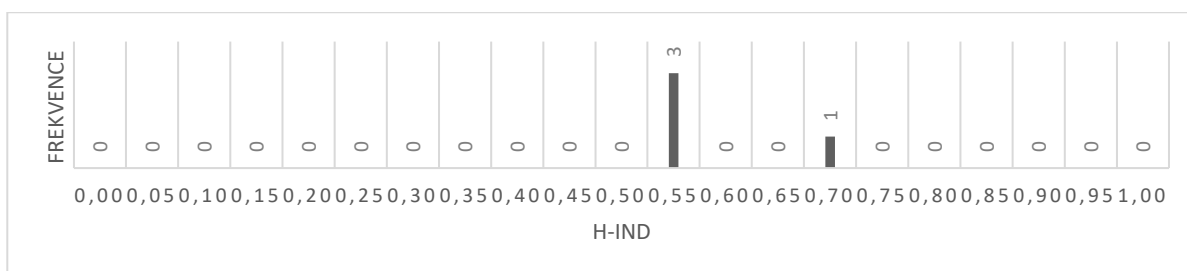
Graf 19. Distribuce heterozygotů v regionu CZE.



Graf 20. Distribuce heterozygotů v regionu SV.



Graf 21. Distribuce heterozygotů v regionu JZ.



5.5.5 Analýza variance alelických frekvencí mezi regiony

V kapitole je popsán tok genů mezi zahraničními populacemi a českou populací. Mezi regiony byly spuštěny dva testy AMOVA. 1. test porovnával alelickou variabilitu populace CZE s populací SV a 2. test AMOVA mezi populacemi CZE a JZ. Hodnoty byly zjištěny na základě 999 permutací. Výsledky prvního testu AMOVY (tabulka 29.) ukázaly, že 96% genetické variability je v rozdílech jedinců v rámci regionu, kdežto rozdíly mezi populacemi přispívají k celkové variabilitě pouze 4 %. V prvním testu byly zjištěny významné rozdíly mezi regiony. Druhý test AMOVA (tabulka 30.) prokázal, že největší zdroj variability v populacích je uvnitř regionů a neprokázal významné rozdíly mezi regiony.

Tabulka 29. AMOVA mezi regiony CZE a SV

Zdroj	d.f.	Suma čtverců	Variace komponentů	%
mezi regiony	1	6,991	0,082	4
uvnitř regionů	180	337,564	1,875	96
celkem	181	344,555	1,957	100
Fst	0,042	P hodnota	0,001	

Tabulka 30. AMOVA mezi regiony CZE a JZ.

Zdroj	d.f.	Suma čtverců	Variace komponentů	%
mezi regiony	1	2,382	0,030	2%
mezi populacemi				
uvnitř regionů	73	140,864	0,088	5%
u jedinců uvnitř				
regionů	75	131,500	1,753	94%
celkem	149	274,747	1,871	100%
Fst	0,016	P hodnota	0,244	

5.6 Výsledky analýz fenotypů

V této kapitole je sledovaná populace fretek rozdělena do 8 subpopulací podle fenotypů. Jednotlivé subpopulace jsou: albino (A, N=13), tmavooký bílý (DEW, N=3), champagne (ChP, N=11), skořicový (C, N=3), tchořovitý (TCh, N=32), černotchořovitý (ČTCh, N=26), panda (PA, N=3), stříbrný (SI, N=3). Subpopulace DEW, C, PA a SI mají malý rozsah (N=3), což ovlivní výsledky některých analýz. Jejich vyčlenění je však důležité pro lepší interpretaci výsledků frekvencí alel, genotypů a jejich vazby na jednotlivé fenotypy.

5.6.1 Distribuce alel v rámci fenotypů

Vyhodnocení frekvence alel v rámci fenotypů ukázalo rozdíly mezi subpopulacemi. V tabulkách 30.-36. jsou uvedeny frekvence jednotlivých alel fenotypů podle lokusů vyjádřené v procentech.

Z tabulky 30. je patrné, že na lokusu A10 dominuje alela 152 u všech fenotypů. Alela 146 se vykytuje pouze u ČTCh. Dále je u fenotypu detekována ještě alela 154, která je zároveň i u fenotypu TCh. Zbylé fenotypy mají pouze dvě alely.

Tabulka 30. Frekvence alel v rámci fenotypů na lokusu A10.

Alela	A	DEW	ChP	C	TCh	ČTCh	PA	SI
146	0	0	0	0	0	1,9	0	0
149	0	0	9,1	16,7	4,7	0	16,7	0
150	19,2	16,7	13,6	0	23,4	21,2	0	16,7
152	80,8	83,3	77,3	83,3	70,3	75	83,3	83,3
154	0	0	0	0	1,6	1,9	0	0

Alela 220 lokusu A223 je detekována pouze jednou, a to u fenotypu A. Narozdíl od lokusu A10 je zde populace A velmi variabilní. Dalšími variabilními subpopulacemi jsou TCh a ČTCh, kdežto nejnižší mají opět DEW a PA. Nejfrekventovanější alelou je 228 u všech fenotypů.

Tabulka 31. Frekvence alel v rámci fenotypů na lokusu A223.

Alela	A	DEW	ChP	C	TCh	ČTCh	PA	SI
220	3,8	0	0	0	0	0	0	0
222	3,8	0	13,6	16,7	4,7	3,8	0	0
224	3,8	0	0	0	0	1,9	16,7	0
226	34,6	33,3	18,2	16,7	25	23,1	50	33,3
228	38,5	66,7	45,5	50	39,1	57,7	33,3	33,3
230	11,5	0	9,1	0	14,1	5,8	0	16,7
232	0	0	0	0	1,6	1,9	0	0
234	3,8	0	13,6	16,7	15,6	5,8	0	16,7

Tabulka 32. ukazuje, že výskyt alely 120 převažuje u všech fenotypů, kromě C. Fenotyp DEW na lokusu B209 je monomorfní (alela 120), čili nevykazuje žádnou variabilitu. Alela 124 byla detekována pouze u fenotypu TCh, který je zároveň v rámci lokusu nejvariabilnější (obsahuje všechny detekované alely).

Tabulka 32. Frekvence alel v rámci fenotypů na lokusu B209.

Alela	A	DEW	ChP	C	TCh	ČTCh	PA	SI
116	0	0	0	0	1,6	0	16,7	0
118	3,8	0	18,2	0	4,7	11,5	0	50
120	57,7	100	50	33,3	56,3	59,6	66,7	33,3
122	38,5	0	31,8	66,7	32,8	28,8	16,7	16,7
124	0	0	0	0	4,7	0	0	0

Nejvariabilnější fenotypy lokusu B9 jsou TCh a ČTCh, u kterých byly detekovány všechny zjištěné alely. Fenotyp A je také poměrně variabilní na rozdíl od lokusu A10. Zbylé fenotypy zde vykazují nižší variabilitu. Nejfrekventovanější alely jsou *180* a *182*.

Tabulka 33. Frekvence alel v rámci fenotypů na lokusu B9.

Alela	A	DEW	ChP	C	TCh	ČTCh	PA	SI
178	0	0	0	0	4,7	1,9	0	0
180	46,2	16,7	22,7	83,3	18,8	30,8	33,3	16,7
182	34,6	66,7	68,2	16,7	64,1	46,2	50	66,7
184	11,5	0	4,5	0	7,8	3,8	0	16,7
186	7,7	0	0	0	1,6	13,5	0	0
188	0	16,7	4,5	0	1,6	1,9	16,7	0
190	0	0	0	0	1,6	1,9	0	0

Lokusu B12 dominuje alela *177* ve všech fenotypech. Fenotypy DEW a C jsou monomorfní a nevykazují žádnou variabilitu. Mají pouze alelu *177*. Největší variabilitu opět vykazují fenotypy TCh a ČTCh společně s A.

Tabulka 34. Frekvence alel v rámci fenotypů na lokusu B12.

Alela	A	DEW	ChP	C	TCh	ČTCh	PA	SI
177	80,8	100	77,3	100	71,9	57,7	66,7	83,3
179	15,4	0	22,7	0	26,6	36,5	33,3	16,7
181	3,8	0	0	0	1,6	5,8	0	0

V rámci lokusu B6 je nejčetnější alela *157*. Alela *155* je zaznamenána pouze u fenotypů TCh a ČTCh. Největší variabilitu mají TCh a ČTCh, fenotyp A je průměrný a nejnižší variabilita byla zaznamenána u DEW a C.

Tabulka 35. Frekvence alel v rámci fenotypů na lokusu B6.

Alela	A	DEW	ChP	C	TCh	ČTCh	PA	SI
<i>147</i>	0	0	4,5	0	0	0	0	0
<i>149</i>	3,8	0	4,5	0	3,1	3,8	16,7	0
<i>151</i>	3,8	0	0	0	0	0	0	0
<i>153</i>	0	0	4,5	0	4,7	0	0	0
<i>155</i>	0	0	0	0	1,6	1,9	0	0
<i>157</i>	65,4	83,3	68,2	50	62,5	51,9	66,7	50
<i>159</i>	19,2	16,7	13,6	0	9,4	9,6	16,7	33,3
<i>161</i>	7,7	0	4,5	50	15,6	28,8	0	0
<i>163</i>	0	0	0	0	3,1	3,8	0	16,7

Interpretace výsledků na lokusu B217 je téměř stejná jako na předchozích. Ve variabilitě převládají fenotypy TCh a ČTCh, nejmenší mají fenotypy DEW, C a PA, kdežto ty zbylé vykazují střední variabilitu. Alela *125* byla detekována jen u fenotypu TCh. U fenotypu SI byla zjištěna alela *139*, která se u jiných fenotypů nevyskytuje.

Tabulka 36. Frekvence alel v rámci fenotypů na lokusu B217.

Alela	A	DEW	ChP	C	TCh	ČTCh	PA	SI
<i>125</i>	0	0	0	0	1,6	0	0	0
<i>129</i>	0	0	4,5	0	0	1,9	0	0
<i>131</i>	3,8	0	0	0	6,3	15,4	0	0
<i>133</i>	0	0	0	0	1,6	7,7	0	0
<i>135</i>	34,6	50	18,2	16,7	28,1	17,3	16,7	16,7
<i>137</i>	61,5	50	77,3	83,3	62,5	57,7	83,3	66,7
<i>139</i>	0	0	0	0	0	0	0	16,7

5.6.2 Fixace alel u fenotypů

Následující tabulka (Tabulka 37.) uvádí pouze lokusy vykazující zvýšené fixační indexy fenotypů. Populace DEW, C, PA a SI zde nejsou uváděny z důvodu malého rozsahu, který snižuje kvalitu výsledků. Na všech lokusech všech fenotypů je pozorovaný polymorfismus, kromě lokusů B209 fenotypu DEW a B12 fenotypů DEW a C. Tyto lokusy jsou monomorfní. Fenotypy TCh a ČTCh nevykazují žádné signifikantní odchylky v popisných charakteristikách. U fenotypu A došlo k fixaci alel na lokusech A10, B6 a B217. Fenotyp ChP má zvýšené F indexy na lokusech B209, B12 a B217.

Tabulka 37. Zvýšené fixační indexy fenotypů.

Fenotyp	Lokus	Na	I	Ho	He	F
A	A10	2/5	0,490	0,231	0,311	0,257
	B6	5/9	1,043	0,308	0,527	0,416
	B217	3/7	0,791	0,308	0,500	0,385
ChP	B209	3/5	1,021	0,364	0,616	0,409
	B12	2/3	0,536	0,091	0,351	0,741
	B217	3/7	0,650	0,273	0,368	0,258

5.6.3 Hardy-Weinbergova rovnováha fenotypů

Populace DEW, C, PA a SI nejsou v kapitole uváděny vzhledem k zavádějící interpretaci výsledků u populací s malým rozsahem. Tabulky 38.-41. uvádějí souhrny chí kvadrát testů podle fenotypů. Z těchto tabulek vyplývá, že populace fenotypů TCh a ČTCh jsou rovnovážné a splňují podmínky pro HW rovnováhu. Fenotyp A vykazuje mírnou odchylku na lokusu B6, který má nejvyšší fixační index a je zde fixována alela 157. Další odchylka je zaznamenána na lokusu B12 fenotypu ChP.

Tabulka 38. Souhrn chí kvadrát testů pro HW rovnováhu u fenotypu A.

Lokus	DF	Chí kvadrát	Pravděpodobnost	Odchylka
A10	1	0,860	0,354	-
A223	21	11,870	0,943	-
B209	3	2,311	0,510	-
B9	6	3,892	0,691	-
B12	3	5,837	0,120	-
B6	10	19,737	0,032	P<0.05
B217	3	3,340	0,342	-

Tabulka 39. Souhrn chí kvadrát testů pro HW rovnováhu u fenotypu ChP.

Lokus	DF	Chí kvadrát	Pravděpodobnost	Odchylka
A10	3	0,952	0,813	-
A223	10	8,666	0,564	-
B209	3	3,589	0,309	-
B9	6	1,222	0,976	-
B12	1	6,043	0,014	P<0.05
B6	15	7,578	0,940	-
B217	3	1,798	0,615	-

Tabulka 40. Souhrn chí kvadrát testů pro HW rovnováhu u fenotypu TCh.

Lokus	DF	Chí kvadrát	Pravděpodobnost	Odchylka
A10	6	2,671	0,849	-
A223	15	11,136	0,743	-
B209	10	12,094	0,279	-
B9	21	4,621	1,000	-
B12	3	0,480	0,923	-
B6	21	8,667	0,992	-
B217	10	7,476	0,680	-

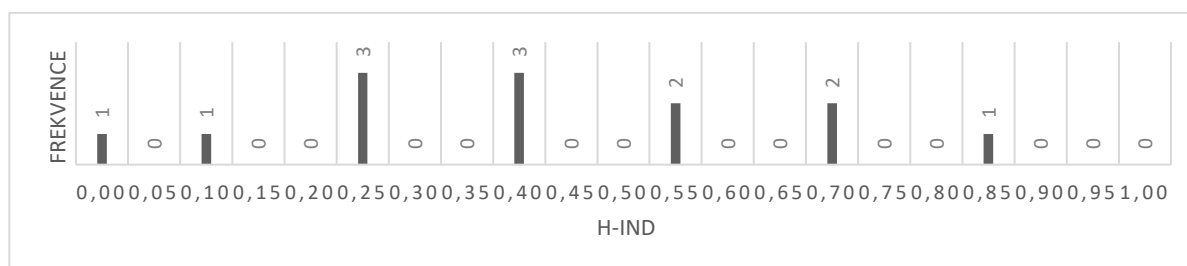
Tabulka 41. Souhrn chí kvadrát testů pro HW rovnováhu u fenotypu ČTCh.

Lokus	DF	Chí kvadrát	Pravděpodobnost	Odchylka
A10	6	4,937	0,552	-
A223	21	19,760	0,537	-
B209	3	1,525	0,677	-
B9	21	20,628	0,482	-
B12	3	3,152	0,369	-
B6	15	10,607	0,780	-
B217	10	14,452	0,153	-

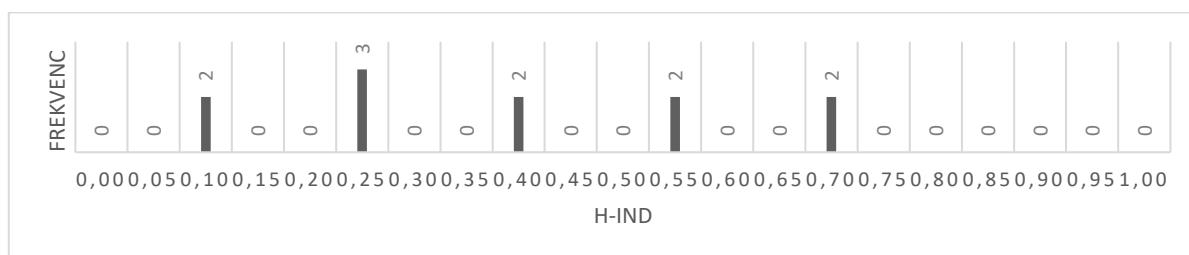
5.6.4 Heterozygotnost fenotypů

V kapitole jsou uvedeny pouze fenotypy A, ChP, TCh a ČTCh. Na grafech 22.-25. je patrné, že fenotypy neodpovídají gausovu rozdělení, tudíž nejsou z hlediska distribuce heterozygotů vyrovnané. Fenotypy A a ChP mají více zástupců v levé části grafů, což znamená, že jsou více homozygotní. Naopak fenotypy TCh a ČTCh mají více obsazenou pravou část grafů – jsou více heterozygotní. Fenotypy se v celkovém odrazu populace vykompenzovaly, proto splňují Gaussovo rozdělení jako celek (graf 16.)

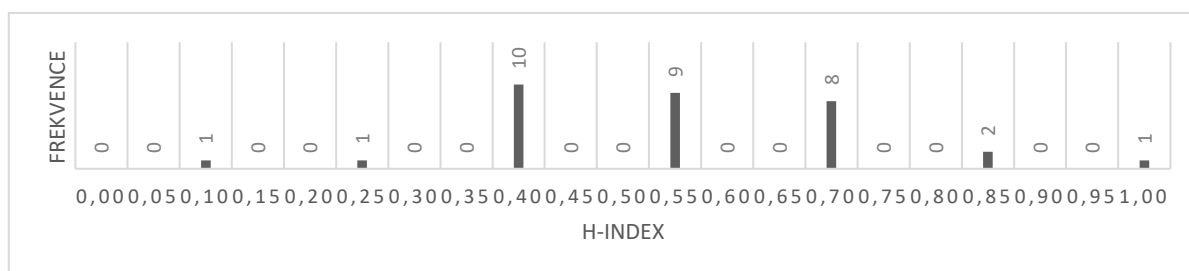
Graf 22. Distribuce heterozygotů fenotypu A.



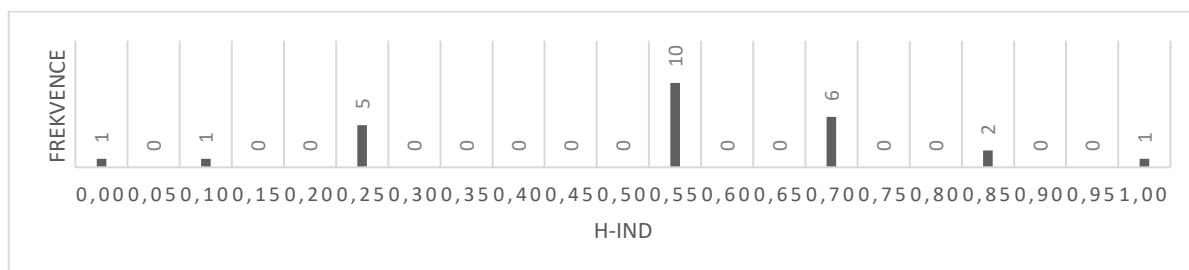
Graf 23. Distribuce heterozygotů fenotypu ChP.



Graf 24. Distribuce heterozygotů fenotypu TCh.



Graf 25. Distribuce heterozygotů fenotypu ČTCh.



5.6.5 Analýza molekulární variance mezi fenotypy tchořovitý a černotchořovitý

Z důvodů podobnosti fenotypů a jedinců vedených jako tchoři nebo pŭltchoři byla mezi fenotypy TCh a ČTCh spuštěna AMOVA (na základě 999 permutací). Výsledky prokázaly (tabulka 42.), že populace se vzájemně nekříží. Zdroj molekulární variability mezi subpopulacemi je pouze 1%, kdežto uvnitř subpopulaci je to 99%. Populace jsou oddělené a nedochází zde k toku genů.

Tabulka 42. AMOVA mezi fenotypy TCh a ČTCh.

Zdroj	d.f.	Suma čtverců	Variace komponentů	%
mezi subpopulacemi uvnitř	1	3,154	0,020	1%
subpopulací	114	225,743	1,980	99%
celkem	115	228,897	2,001	100%
Fst	0,010	P hodnota	0,078	

5.6.6 Genetická vzdálenost

Výsledky populační matice ukázaly (tabulka 43.), že největší genetická vzdálenost je mezi fenotypy DEW a C (0,287). Nejmenší genetickou vzdálenost vykazují fenotypy ChP a TCh (0,018).

Tabulka 43. Populační matice genetické vzdálenosti (Nei).

A	DEW	ChP	C	TCh	ČTCh	PA	SI	
0,000								A
0,084	0,000							DEW
0,051	0,090	0,000						ChP
0,106	0,287	0,157	0,000					C
0,040	0,076	0,018	0,171	0,000				TCh
0,053	0,109	0,053	0,152	0,036	0,000			ČTCh
0,064	0,104	0,061	0,202	0,069	0,083	0,000		PA
0,105	0,155	0,059	0,259	0,081	0,123	0,130	0,000	SI

6 Diskuze

Ve své bakalářské práci Možnosti a současná praxe určování paternity fretky (*Mustela putorius furo*) jsem uváděla že, genetické testování v populaci chovaných fretek v České republice má smysl. Z tohoto důvodu jsem se rozhodla analyzovat mikrosatelitní DNA fretek chovaných na území České republiky a pro porovnání také jedince ze zahraničí, nebo zahraničním původem. Zkoumány byly z hlediska pohlaví, původu a fenotypů. Z hlediska nemoci jsem populaci bohužel populaci analyzovat nemohla z důvodu malého počtu odebraných nemocných jedinců, a to pouze 3 hluší jedinci, mezi kterými nebyla zjištěna významná spojitost v průběhu analýz. Jednotlivé body budou dále diskutovány.

6.1 Celkové vyhodnocení

V rámci diplomové práce bylo detekováno 6 vzácných alel: 146, 220, 125, 139, 147 a 151. Téměř všechny analyzované lokusy vykazaly velkou polymorfnost, kromě lokusu B12, který má pouze 3 alely. Na tomto lokusu zřejmě došlo k vazbě letálních alel vlivem domestikace. Navzdory velkému počtu zjištěných alel (7 alel) lokus B217 vykazuje také nízkou variabilitu. Zde pravděpodobně došlo k fixaci vlivem šlechtění (zvýšený F index: 0,102). U celkové populace (všechny vzorky včetně zahraničních) nebyla pozorována odchylka od Hardy-Weinbergovy rovnováhy. Distribuce heterozygotů je též vyrovnaná (odpovídá Gaussovu rozdělení na histogramu). V populaci byli zjištěni dva 100% homozygotní jedinci, a to černotchořovitý samec z Kladna a abino samice z útulku. Také byli detekováni tři 100% heterozygotní jedinci, a to stříbrný poloangorský samec z útulku (původně z chovné stanice), tchořovitá samice z Prahy a černotchořovitá samice z Maďarska (půltchoř). Analýza celkové populace nevykazuje žádné abnormality v rámci zkoumané mikrosatelitní DNA a populace se zdá být rovnovážná.

Výsledky matice pro lineární kodominantní genotypovou vzdálenost neprokázaly inbreeding. Mezi vzorky Fr05/Fr86 a Fr09/Fr90 se genotypová vzdálenost rovná nule (genotypy jsou totožné). V obou případech byla odebrána ta samá fretka nedopatřením 2x v Praze na výstavě, akorát rok po sobě. Fr09/Fr90 je černotchořovitý samec z Prahy a Fr05/Fr86 je champagne samice z Teplic. Největší genotypová vzdálenost byla naměřena mezi vzorky Fr11/Fr70. Fr11 je tchořovitá samice z Prahy a Fr70 je albino samice z Maďarska. V tomto případě je mezi fretkami velká geografická vzdálenost a fenotypový rozdíl. Dále byl inbreeding analyzován souhrny příbuzností párů podle Ritland (1996) a podle Queller a Goodnight (1989), které také neprokázaly, že by docházelo k příbuzenské plemenitbě. Extrémy byly vykompenzovány v populaci.

Fylogenetický strom z DARwin ukazuje jasně oddělenou populaci fretek (červené pole), která zahrnuje pouze fretky tchořovité, černotchořovité a dva tchoře původem z České republiky, tudíž pravděpodobně nedochází k toku genů mezi jinými fenotypy a regiony. Toto

tvrzení podporují i výsledky analýzy AMOVA mezi regiony a mezi fenotypy tchořovitý a černotchořovitý. Dále je vidět, že Maďarsko (fialové pole) má největší koncentraci pŭltchořů, což naznačuje, že v této zemi používají tchoře v chovu pro oživení krve. Černé pole naznačuje spolupráci českých a maďarských chovatelů, kde jedinec Fr12 by mohl být potomkem či vzdáleným potomkem fretky Fr74 nebo Fr75 (zřejmě sourozenci) od jednoho maďarského chovatele. Většina jedinců od maďarských chovatelů se však odděluje již v první větvi (červená šipka), což potvrzuje, že populace mezi sebou mají genetickou diverzitu. Dále je vidět jistá fenotypová diferenciaci světlých fenotypů (modré pole) i když výsledky genetické vzdálenosti mezi fenotypy ukázaly, že nejbliže si jsou fenotypy champagne a tchořovitý a také zároveň v oblasti modrého pole nejsou všichni jedinci tohoto fenotypu. Oddělená větev (šedé pole) slovenských fretek též značí genetickou diferenciaci regionu.

6.2 Vyhodnocení populace dle pohlaví

Výsledky analýz zkoumající rozdíly v rámci pohlaví odhalily, že alely 220, 116, 129, 139, 151 vyskytující se pouze u samců a alely 146, 232, 125, 147 vyskytující se pouze u samic představují alely vázané na pohlaví. Dle histogramu pro alelický vzor populací je vidět u samců vyšší heterozygotnost. V tabulkách základních charakteristik je patrné, že u samců došlo k fixaci alel na lokusu B12, kde má alela 181 vyšší frekvenci u samic. Dále je zaznamenána fixace také na lokusech A10, který má o alelu méně než samice a na lokusu B217 na kterém došlo k fixaci alel vyskytujících se pouze u samců. U samic je vyšší fixace alel na lokusech A223, B209 a B9, což může být ovlivněno na lokusu A223 a B9 nižší heterozygotností (než u samců) a na lokusu B209 nižším počtem alel u samic. V populacích byly pozorovány dvě odchylky od HW rovnováhy, a to na lokus B217 u samců a na lokusu A223 u samic. Na lokusu B12 je to ovlivněno fixací alel, které jsou vázány na chromozom Y a na A223 samic vazbou letálních alel (nízká heterozygotnost). Lokus A223 samic je inbreední. Četnosti genotypů jsou z hlediska pohlaví vyrovnané, vyjma genotypů obsahující alelu vázanou na pohlaví. Studie Piazza et al., 2014 uvádí že nebyla zjištěna žádná souvislost mezi hluchotou a pohlavím, tudíž alely způsobující hluchotu nejsou vázané na pohlaví.

6.3 Vyhodnocení regionů

Vyhodnocení populací regionů v detekci alel vázaných na region převažuje Česká republika, což je ovlivněno mnohem větším počtem jedinců než ve zbylých regionech. Pouze v České republice byly detekovány běžné alely 149, 116 (samčí), 124, 188, 190 a vzácné samičí alely 146, 147, 125 a samčí 220, 151, 139. Alely detekované pouze u fretek ze severní a východní Evropy jsou 154 a 232. Absence těchto alel v oblastech severní a východní Evropy a jižní a západní Evropy může být dána malým rozsahem populací.

Na lokusu A 223 V oblasti severní a východní Evropy je největší četnost alely 234. Jedinci mající tuto alelu pocházejí z Maďarska (5) a Ruska (2). Jedinec Fr68 pocházející z Maďarska je homozygot 234234. Alela 234 bude tedy pravděpodobně fixovaná v maďarské populaci fretek.

V populaci severní a východní Evropy převažuje na lokusu B9 fretek četnost alely 180. Její populační fixace je tedy pravděpodobně orientována na sever a východ Evropy. V oblasti České republiky, jižní a západní Evropy dominuje alela 182. V populaci jižní a západní Evropy chybí pouze u fretky z Itálie, což naznačuje, že by alela mohla mít původ v západní Evropě. Alela 190 byla zaznamenána u dvou jedinců ze severozápadu čech (Chomutov, Teplice), tudíž je její výskyt v populaci omezen jen na tuto oblast. Alela 190 tedy naznačuje diverzitu i mezi regiony v České republice.

Alela 181 lokusu B12 má největší četnost u fretek ze severní a východní Evropy, a to konkrétně z Maďarska. V České republice byla detekována u dvou jedinců ze severozápadních Čech, což může být způsobeno zahraniční spoluprací chovatele ze severozápadu.

Absence alely 163 na lokusu B6 u jedinců ze severní a východní Evropy naznačuje její původ v jižní části Evropy. To potvrzuje i její detekce u jedné fretky pocházející ze Španělska. V severní a východní Evropě je patrná fixace alely 157 na lokusu B6 pravděpodobně vlivem odběrů vzorků od malého počtu chovatelů z této oblasti (více jedinců od jednoho chovatele).

Na alele 129 (B217) je naznačen její původ v jižní části Evropy, což dokládá její absence v regionu severní a východní Evropy a detekce u fretky z Itálie. Alely 125 a 139 jsou zaznamenány pouze v České republice. Obě byly detekovány u jedinců ze středních Čech, kde bylo zároveň odebráno i nejvíce vzorků. V rámci lokusu B217 je alela 131 nejčetnější v oblasti severní a východní Evropy, kde bude pravděpodobně fixována v populaci, což naznačuje i fretka pocházející z Finska, která je v homozygotní soustavě 131131.

6.3.1 Populace fretek v České republice

Oba testy AMOVA prokázaly, že zdrojem variability pro Českou republiku je její populace a k tokům genů ze zahraničí dochází málo. Toto potvrzují i výsledky z DARwin, kde jsou populace sledovaných oblastí většinou na oddělených větvích stromů. Zdrojem variability populace fretek pro Českou republiku jsou tedy tuzemské chovy. Distribuce heterozygotů v České republice má na histogramu náznak Gaussova rozdělení, tudíž je populace vyrovnanější než ostatní regiony z hlediska distribuce heterozygotů. Tyto analýzy neprokazují inbreeding v populaci fretek chovaných v České republice. Jedinou analýzou, která zaznamenala v populaci odchylku, byl Test Hardy-Weingergovy rovnováhy. Test ukázal odchylku na lokusu B217, který je v české populaci homozygotní. Převládá zde genotyp

137137 (35 jedinců ze 71). Dalším frekventovaným genotypem je 135137 (21 jedinců ze 71). Vzhledem k velkému počtu očekávaných genotypů se zde objevují pouze dva. Na lokusu zřejmě došlo ke snížení variability vlivem inbreedingu. Ostatní lokusy jsou v rovnováze.

Při porovnání výsledků se studií Ernest et al.,2012 je patrné, že na každém lokusu byl detekován větší počet alel a téměř na každém lokusu je vyšší pozorovaná heterozygotnost, kromě lokusů B12 a B6 v australské populaci. Populace fretek chovaná v Evropě tedy vykazuje větší genetickou variabilitu než populace v Austrálii a USA, k čemuž zřejmě přispívá revitalizace evropských chovů fretek tchoři. Toto potvrzuje fylogenetický strom z DARwin a také zmínka na stránkách Svazu chovatelů fretek, která umožňuje zápis jedinců křížených s tchořem do plemenné knihy (SCHF,2020). Studie Ernest et al.,2012 také prokázala, že mikrosatelitní markery tchoře a fretky mají využitelnost při genetických analýzách obou druhů, což potvrzuje blízký genetický vztah a tudíž možnost křížení za účelem zvyšování variability těchto domestikovaných šelem.

6.4 Vyhodnocení fenotypů

Výsledky analýz spuštěných mezi fenotypy prokázaly, že nejvariabilnějšími fenotypy jsou tchořovitý a černotchořovitý. Všechny fenotypy vykazují nízkou variabilitu na lokusu A10, pravděpodobně vlivem inbreedingu. Výjimku tvoří pouze tchořovitý a černotchořovitý. Na lokusu B209 u jedinců zaznamenaných jako tchoři a půltchoři byly detekovány jen dvě alely, a to 120 a 118, což vzhledem k vysoké frekvenci alely 122 naznačuje, že se v populaci zafixovala vlivem domestikace. Alela 124 byla detekována jen u fenotypu tchořovitý, ale zároveň se nevyskytuje u jedinců vedených jako tchoři nebo půltchoři, což též naznačuje fixaci vlivem domestikace. Fenotypy tchořovití a černotchořovití nevykazují žádné signifikantní odchylky v popisných charakteristikách, ani Hardy-Wenbergově rovnováze, což potvrzuje vyrovnanost těchto populací. Alela 146, což je vzácná samčí alela je zaznamenána pouze u černotchořovitých, tudíž bude pravděpodobně spjata s těmito rysy. V rámci fenotypů mají nejvyšší heterozygotnost. Z důvodů sdílení některých alel (154, 155, 190 a 178) mezi těmito fenotypy byl spuštěn test AMOVA, který prokázal, že populace jsou oddělené a nedochází mezi nimi ke křížení.

Albíni, champagne a stříbrný vykazují střední hodnoty v porovnání s ostatními fenotypy. Alela 220 na lokusu A223 je vázaná na albino zbarvení. Detekována je pouze jednou, a to u samce z České republiky. Narozdí od lokusu A10 jsou na lokusu A223 velmi variabilní. albíni vykazují odchylku od HW rovnováhy na lokusu B6, který má zvýšený fixační index a je zde fixována alela 157 vlivem šlechtění. Další odchylka od HW rovnováhy je zaznamenána na lokusu B12 fenotypu champagne, kde došlo k fixaci alely 177 (nejvyšší fixační index v populaci) zřejmě vlivem šlechtění. Na stříbrný fenotyp je pravděpodobně vázána alela 139, která u jiných nebyla detekována a zároveň byla zjištěna u všech odebraných stříbrných jedinců. U albínů je vidět v popisných charakteristikách, že došlo k fixaci alel 152 (83,3%), 157 (65,4%) a 137 (61,5%) a u champagne alel 122 (31,8%), 177 (77,3%) a také 137

(77,3%) pravděpodobně vlivem šlechtění. Dle distribuce heterozygotů představují albíni a champagne největší zastoupení homozygotů, což může být způsobeno inbreedingem.

Naopak nejnižší variabilitu vykazují pandy, DEW a skořicový. Na lokusu B12 jsou DEW a skořicový monomorfní, tudíž nevykazují žádnou variabilitu. Mají pouze alelu 177, což může být ovlivněno malým rozsahem obou populací a zároveň i nízkou polymorfností lokusu B12. Výsledky analýz těchto fenotypů ukazují sníženou heterozygotnost, což se v důsledku inbreedingu děje. Výsledky pro tyto fenotypy mohou být samozřejmě způsobeny malým rozsahem populací.

Výsledky z populační matice na základě Neiovy genetické vzdálenosti ukázaly, že nejmenší genetická vzdálenost je mezi fenotypy champagne a tchořovitý (0,018). Studie Grabolus et al., 2019 uvádí že, champagne byla jedna z prvních mutací, která vznikla a byla v chovech fixována (Wales, 1900), a dále také, že výsledkem křížení čokoládových a champagne fretek je vrh tchořovitých mláďat. Tyto dva faktory pravděpodobně ovlivňují malou genetickou vzdálenost mezi fenotypy.

7 Závěr

Cílem diplomové práce bylo získat vzorky DNA zástupců fretky (*Mustella putorius furo*) chovaných v České republice, optimalizovat panel vybraných mikrosatelitních markerů specifických pro tento druh a ozřejmit rozsah genetické variability v místních chovech.

- Odběr vzorků DNA proběhl na území České republiky v útulku fretek Boleslav, na výstavách (rok 2018 a 2019) a u soukromých chovatelů. Útulok představuje velmi variabilní soubor jedinců vzhledem k tomu, že se sem dostávají fretky od chovatelů, z chovných stanic a fretky odchycené venku. Soubor vzorků pro zpracování diplomové práce by tedy měl představovat reprezentativní zastoupení chované populace v Čechách. Pro porovnání a lepší interpretaci výsledků byly na výstavách odebrány i fretky od zahraničních chovatelů.
- Optimalizace panelu mikrosatelitních markerů podle studie Ernest et al., 2012 pro podmínky Katedry Genetiky a Šlechtění proběhla úspěšně. Pokus byl spuštěn po druhé optimalizaci, kdy byly ozřejmeny optimální koncentrace primerů a křížové reakce mezi primery v multiplex PCR.
- Podle výsledků jednotlivých analýz je variabilita fretek v České republice na dobré úrovni. Na inbreeding poukazuje pouze odchylka od Hardy-Weinbergovy rovnováhy na lokusu B217, kde došlo k fixaci dvou genotypů. Analýzy také ukázaly, že zdrojem variability jsou zejména tuzemské chovy. Při porovnání výsledků se studií Ernest et al., 2012 vykazuje česká (i evropská) populace vyšší polymorfismus než populace australská a americká. Vzhledem k výsledkům této studie (u tchořů byl zaznamenán vyšší polymorfismus) by k zvýšení variability jistě přispělo častější křížení feretk s tchoři, jak je to více praktikováno v zahraničních evropských chovech. Podle stránek Svazu chovatelů fretek by revitalizace českých chovů tchoři měla probíhat, i když v menší míře. Z hlediska pohlaví samci vykazují větší heterozygotnost, jinak jsou vyrovnané. Podle analýz fenotypů vykazují jistou míru inbreedingu fenotypy tmavooký bílý, skořicový a panda (nízká variabilita). Zde by k zvýšení variability přispěla například větší zahraniční chovatelská spolupráce. U pand (bílá hlava) je největší riziko hluchoty. Potvrzením je, že všechny odebrané pandy byly hluché a také studie Piazza et al, 2014. Naopak velmi dobře je na tom populace tchořovitých a černotchořovitých, kteří jsou po všech stránkách vyrovnaní a mají vyšší heterozygotnost. Vzhledem k tomu, že se tyto dvě populace mezi sebou nekříží, tak představují vyrovnané fenotypy, které by měli méně trpět genetickými vadami.

8 Literatura

- American Ferret Association.ferret.org. dostupné z: <https://www.ferret.org/index.html> (accessed 2020).
- Anistoroaei K, Christensen K. 2006. Mink microsatellite markers in the ferret: amplification and sequence comparisons. *Hereditas* (**143**): 198-201.
- Blandford P RS. 1987. Biology of the polecat *Mustela putorius*: a literature review. *Mammal review* (**17**): 155-197.
- Budowle B, Garofano P, Hellman A, Ketchum M, Kanthaswamy S, Parson W, van Haeringen W, Fain S. 2005. Recommendations for animal DNA forensic and identity testing. *International Journal Of Legal Medicine*. (**119**): 295-302.
- Bo P, Tagliavia C, Canova M, De Silva M, Bombardi C, Grandis A . 2019. Comparative characterization of the prostate gland in intact, and surgically and chemically neutered ferrets. *Journal of exotic pet medicine* (**31**): 68-74.
- Davison A, Birks, JDS, Griffiths HI, Kitchener AC, Biggins D, Butlin RK. 1999. Hybridization and the phylogenetic relationship between polecats and domestic ferrets in Britain. *Biological Conservation* (**87**): 155–161.
- Ernest HB, Drazenovich TL, Dalbeck LS, Hawkins MG. 2012. Isolation and Characterization of Microsatellite Markers in the Domestic Ferret (*Mustela putorius furo*). *International Journal of Molecular Science* (**13**): 16592–16597.
- Flégr J. editor. Biologická evoluce. pages 35-79 in: Flégr, J. (ed). 2009. Evoluční biologie. Academia. Česká republika.
- Fox JG. editor. Taxonomy, history and use. pages 3-18. In: Fox JG, Marini RP. 2014. *Biology and Diseases of the Ferret*. John Wiley & Sons. Baltimore.
- Frykman I. 1972. Chromosome studies of *Mustela putorius* in tissue culture. *Hereditas* **70**: 59-68
- Gaš B. 2001. Kapilární elektroforéza: separační analytická metoda pro věk mikročipů. *Vesmír* (**80**): 370.
- Grafodatskij AS, Volobuev VT, Ternofskij DV, Radzhabli SI. 1976. G-banding of the chromosomes in seven species of *Mustelidae* (*Carnivora*). *Zoologicheskii zhurnal* (**55**): 1704–1709.

- Grabolus D, Waclawik P, Zatoń-Dobrowolska M. 2019. Genetic basis of coat colour inheritance in ferrets (*Mustela putorius furo*): Pedigree analysis. Acta Scientiarum Polonorum Zootechnica (18), 27–34.
- Grossman PD, Colburn JC. 1992. Capillary Electrophoresis: Theory and Practice. Academic Press. California.
- Heber S. 1999. Peas in a Pod: Expression of undesirable genes ferrets. American ferret report (10): 22-23.
- Hosoda T, Suzuki H, Hrada M, Tsuchiya K, Han SH, Zhang Y. 2000. Evolutionary trends of the mitochondrial lineage differentiation in species of genera *Martes* and *Mustela*. Genes & Genetic Systems (75): 259.
- Hrapkiewicz K, Medina L. 2006. Clinical Laboratory Animal Medicine: An Introduction. John Wiley & Sons. Iowa.
- Innis MA, Gelfand DH, Sninsky J J, White T J. editors. Part one: Basic methodology. pages 3-168 In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky J J, White T J. 2012. PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. Academic Press. USA.
- Koetsier PA, Schorr J, Doerfler W. 1993. A rapid optimized protocol for downward alkaline Southern blotting of DNA. Biotechniques (2):260-262.
- Lewington JH. 2007. Ferret Husbandry, Medicine and Surgery. Elsevier. United Kingdom.
- Lindeberg H. 2008. Reproduction of the female ferret (*Mustela putorius furo*). Reproduction domestic animal (43): 150-156.
- Matoušková KM. Fretka.cz [online]. Vystaveno 2012 [cit 2020-27-2]. Dostupné z: <http://www.fretka.cz/cerna-fretka-blacsable-barvy-fretek-norek/>
- Michaux JR, Hardy OJ, Justy F, Fournier P. 2005. Conservation genetics and population history of the threatened European mink *Mustela lutreola*, with an emphasis on the west European population. Molecular Ecology (14): 2373 – 2388.
- Nedrařicová P. 1999. Fretka jako domácí zvíře. Jan Vašut. Praha.
- Omodeo P, Renzoni A. 1966. The karyotype of some Mustelidae. Caryologia (19): 219-226.

- Ouborg, N. J., Pertoldi, C., Loeschcke, V., Bijlsma, R., Hedrick, P. W. 2010. Conservation genetics in transition to conservation genomics. *Trends in Genetics* (26):177-187.
- Piazza S, Abitbol M, Gnirs K, Huynh M, Cauzinille L. 2014. Prevalence of deafness and association with coat variations in client-owned ferrets. *Journal of the American Veterinary Medical Association* (9): 1047-1054.
- Poirel L, Walsh TR, Cuvillier V, Nordmann P. 2011. Multiplex PCR for detection of acquired carbapenemase genes. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* (70): 119-123.
- Purcell K, Brown S. A. 1999. *Essentials of Ferrets: A Guide for Practitioners*. AAHA Press. USA.
- Queller DC, Goodnight KF. 1989. Estimating relatedness using genetic markers. *Evolution* (39): 1169-1174.
- Ralls K, Ballou JD, Templeton A. 1988. Estimates of lethal equivalents and the cost of inbreeding in mammals. *Conservation biology* (2): 185-193.
- Relichová J. Míry genetické variability. pages 29-46. In: Relichová J. 2014. *Genetika populací*. Masarykova univerzita. Brno.
- Ritland K. 1996. A marker-based method for inferences about quantitative inheritance in natural populations. *Evolution* (50): 1062-1073.
- Rzepka Z, Buszman E, Beberok A, Wrześniok D. 2016. From tyrosine to melanin: Signaling pathways and factors regulating melanogenesis. *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej* (70): 695–700.
- Shoemaker N J, Schuurmans M, Moorman H, Lumeij J, Sjeng T. 2000. Correlation between age at neutering and age at onset of hyperadrenocorticism in ferrets. *Journal of the American Veterinary Medical Association* (216): 195-197.
- Skoupá L. 1998. *Fretka. DONA*. České Budějovice. Jan Vašut.
- Spolek chovatelů fretek. 2015. schf.cz. Webnode. Dostupné z: <https://www.schf.cz/>
- Svoboda J. 1998. *Problematika chovu a chorob fretek*. MVDR. Michaela Liškov. Český Těšín.
- Thompson AD. 1951. A history of the ferret. *Journal of History of Medicine and Allied Science* (6): 471–480.

- van Grouw H. 2006. Not every white bird is an albino: sense and nonsense about colour aberrations in birds. *Dutch Birding* (**28**): 79-80.
- van Zeeland YRAV, Pabon M, Roest J, Schoemaker NJ. 2014. Use of a GnRH agonist implant as alternative for surgical neutering in pet ferrets. *Veterinary Record* (**175**): 66-71.
- Wagner RA, Finkler MR, Fecteau KA, Trigg TE. 2009. The Treatment of Adrenal Cortical Disease in Ferrets with 4.7-mg Deslorelin Acetate Implants. *Journal of Exotic Pet Medicine* (**18**): 146-152.
- Williams ES, Anderson SL, Cavender J, Lynn C, List K, Hearn C, Appel MJG. 1996. Vaccination of black-footed ferret (*Mustela nigripes*)× Siberian polecat (*M. eversmanni*) hybrids and domestic ferrets (*M. putorius furo*) against canine distemper. *Journal of Wildlife Diseases* (**32**): 417-423.

