

MENDELOVA ZEMĚDĚLSKÁ A LESNICKÁ UNIVERZITA V BRNĚ

Agronomická fakulta

Ústav morfologie, fyziologie a genetiky zvířat



GENOMIKA V URČOVÁNÍ PATERNITY U PSŮ

Bakalářská práce

Brno 2006

Vedoucí bakalářské práce:
Prof. Ing. Josef Dvořák, CSc.

Vypracovala:
Marta Bryndová

Souhrn

V bakalářské práci jsem se pokusila shrnout nejnovější poznatky týkající se ověřování rodičovství u psů. Pro ověřování rodičovství je možné použít několik možností: krevní skupiny, biochemické polymorfny znaky, mikrosatelity nebo SNPs. Krevní skupiny a biochemické polymorfny znaky se ale používají pouze omezeně.

Základem pro ověřování rodičovství jsou nejrůznější metody založené na DNA analýze. Mezi nejdůležitější se řadí především PCR, elektroforéza nebo fragmentační analýza.

Co se týká ověřování rodičovství u psů pomocí mikrosatelitů, v současné době neexistuje mezinárodně uznaný panel mikrosatelitů. Z tohoto důvodu jednotlivé laboratoře používají různé panely mikrosatelitů (American Kennel Club, ISAG a LamGen).

Zatímco ověřování rodičovství pomocí mikrosatelitů je už vcelku zaběhlou záležitostí, novým trendem do budoucnosti se stávají SNPs. Ty mohou umožnit nejen spolehlivé určení rodičovství, ale mohou pomoci při detekci dědičných chorob. V současnosti ovšem u psů není sestaven panel SNPs, který by umožnil širší využití.

Summary

I have tried to summarize the newest informations about the canine parentage verifying in my bachelor thesis. Some genetic possibilities can be used for the parentage verifying: blood groups, biochemical polymorphisms, microsatellites or SNPs. Blood typing and biochemical polymorphisms are not used a lot today.

DNA analysis is the main principle for the parentage verifying. PCR, electroferesis or fragment analysis is the most important.

As for the canine parentage verifying by means of microsatellites in this time there is not an international panel of microsatellites. That is why the laboratories use the different panels of microsatellites (American Kennel Club, ISAG, LamGen).

While the canine parentage verifying by means of microsatellites is very common, the new trend of SNPs has become. This could facilitate not only the confident determining parentage, but also help with detection of hereditary diseases. Today there is not commonly used panel of the SNPs.

Poděkování

Ráda bych touto cestou srdečně poděkovala Ing. Kateřině Svobodové, která mi obětavě poskytovala připomínky při tvorbě bakalářské práce a stala se mou ochotnou rádkyní.

Dále děkuji panu Prof. Ing. Josefu Dvořákovi, CSc. a pracovníkům na Ústavu morfologie, fyziologie a genetiky zvířat, kteří mi pomohli při řešení bakalářské práce.

Chtěla bych také poděkovat panu Ing. Pavlu Horákovi, který mi poskytl první pomoc v počátcích psaní mé bakalářské práce.

Poděkování patří i mé rodině a příteli, díky nimž jsem mohla překonat nejrůznější překážky při řešení bakalářské práce.

„Spatřil jsem v psích očích prchavý výraz pobaveného pohrdání a jsem přesvědčen, že psi si v podstatě myslí, že lidé jsou blázni.“

John Steinbeck

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci na téma „Genomika v určování paternity u psů“ vypracovala samostatně a použila jen pramenů, které cituji a uvádím v příloženém soupisu literatury.

Souhlasím, aby práce byla uložena v knihovně Mendelovy zemědělské a lesnické univerzity v Brně a zpřístupněna ke studijním účelům.

V Brně, dne

[Podpis studenta]

OBSAH

OBSAH	6
SEZNAM TABULEK A OBRÁZKŮ	7
1 ÚVOD.....	8
1.1 VZNIK A PŮVOD PSŮ	8
1.2 TÉMA A CÍL PRÁCE	9
1.3 TERMÍNY A DEFINICE POUŽITÉ V BAKALÁŘSKÉ PRÁCI	10
2 TRADIČNÍ METODY OVĚŘOVÁNÍ PARENTITY	11
2.1 OVĚŘOVÁNÍ PŮVODU POMOCÍ KREVNÍCH SKUPIN	11
2.1.1. <i>Charakteristika krevních skupin</i>	11
2.1.2 <i>Nevýhody ověřování pomocí krevních skupin</i>	12
2.2 OVĚŘOVÁNÍ PŮVODU POMOCÍ BIOCHEMICKÝCH POLYMORFNÍCH ZNAKŮ	12
2.2.1 <i>Polymorfní znaky v erythrocytech, krevní plazmě a krevním séru psů</i>	12
2.2.2 <i>Používané polymorfní znaky</i>	13
3 METODY GENOMIKY V OVĚŘOVÁNÍ PARENTITY	16
3.1 DNA ANALÝZY	16
3.2 PRINCIP DNA ANALÝZY	17
3.3 OVĚŘOVÁNÍ PARENTITY POMOCÍ MIKROSATELITŮ	19
3.3.1 <i>Charakteristika mikrosatelitů</i>	19
3.3.2 <i>Význam mikrosatelitů</i>	19
3.4 OVĚŘOVÁNÍ PARENTITY POMOCÍ SNPS	21
3.4.1 <i>Charakteristika SNPs</i>	21
3.4.2 <i>Význam SNPs</i>	21
4 OVĚŘOVÁNÍ PARENTITY DNA TESTY U PSŮ VE SVĚTĚ	22
4.1 ISAG	22
4.2 AMERICAN KENNEL CLUB	23
5 OVĚŘOVÁNÍ PARENTITY DNA TESTY U PSŮ V ČR.....	24
5.1 MIKROSATELITY V ČR	24
5.2 SNPS V ČR	24
6 ZÁVĚR	27
7 POUŽITÁ LITERATURA.....	28

SEZNAM TABULEK A OBRÁZKŮ

Tab. 1: Krevní antigeny psa	12
Obr. 1: Ideogram psích chromozomů	17
Obr. 2: PCR analýza	18
Tab. 2: Panely mikrosatelitů ISAG 2002	22
Tab. 3: Panely mikrosatelitů ISAG 2004	22
Tab. 4: Panely mikrosatelitů American Kennel Club	23
Tab. 5: Panely mikrosatelitů StockMarks®	24

1 ÚVOD

1.1 Vznik a původ psů

Už od pradávných dob pes neodmyslitelně patří k člověku. Pomáhal mu přežít v přírodě, doprovázel ho na lovu nebo při práci s dobyt看em. Nepochybně se stal i jeho nejvěrnějším společníkem v dobách dobrých i zlých. Nejen proto se na něho začala ubírat větší pozornost.

Vznik psa je zahalen určitým tajemstvím a panuje o něm několik teorií. Nejpravděpodobnější se jeví ta, podle které pes pochází z vlka. Svědčí pro to velká variabilita především tělesných rozměrů vlčí populace. Dále se hovoří o příbuznosti se šakaly. Určitý podíl na původu psa jim nelze odepřít zvláště kvůli tomu, že si značují teritorium jako psi. Dalším předpokladem svědčícím o příbuznosti těchto druhů (pes, vlk, šakal) také je, že všichni vlastní 78 chromozomů a křížením se psem dávají plodné potomstvo.

V minulosti se mnozí psi celkovým vzhledem podobali těm dnešním. V porovnání s hospodářskými zvířaty pes vykazuje největší plemennou variabilitu. Nyní celkový rejstřík čítá 414 čistokrevných psích plemen. Hlavním důvodem vzniku nových plemen psů bylo získání nových vlastností v průběhu procesu domestikace. To mohlo být způsobeno pozvolným vývojem nebo mutací.

Některé nové výzkumy ukazují, že psy lze rozdělit do čtyř základních větví. První tři z nich byly označeny jako moderní a jejich historie není starší než několik staletí. Patří sem ovčáci, hlídači a lovečtí psi. Čtvrtá větev zahrnující většinou psy z Afriky a Asie (např. malamut, husky, šarpej nebo pekinéz) je archaická a její historie sahá do období před několika tisíci lety. Důležitým poznatkem ovšem je, že některá „archaická“ plemena mají dlouhý historický původ, ale přitom opak je pravdou. Jedním příkladem může být faraonský pes, jehož původ je odvozován od psů chovaných na staroegyptském faraonském dvoře. Genetickou analýzou se ale ukázalo, že toto plemeno vzniklo před několika staletími křížením různých plemen.

1.2 Téma a cíl práce

Jak lze vidět, psi mají opravdu hlubokou historii spojenou s člověkem. Byl to hlavně člověk, který ovlivnil vznik jednotlivých plemen psů, a podílelo se na tom i dané historické období, kdy psi byli využíváni pro lov. V současnosti se do popředí dostává spíše exteriérové hledisko. Chov psů se stává módní záležitostí a začíná se zapomínat na původní účel chovu těchto zvířat. Jednou z hrozeb je i příbuzenská plemenitba, která úzce souvisí s tzv. inbrídingovou depresí, úbytkem genetické variability a poklesem životaschopnosti. Z tohoto důvodu by chovatelé neměli zapomínat i na etická hlediska a měli by dodržovat základní pravidla správného a zdravého chovu. Jednou z možností, jak toto zajistit, je i ověřování původu, rodičovství či otcovství.

Hlavním cílem méj bakalářské práce (téma Genomika v ověřování paternity u psů) je podat ucelený přehled o významu ověřování rodičovství u psů. Chtěla bych nastínit využití nejnovějších trendů v tomto oboru a zároveň i jejich další uplatnění v jiných sférách genetiky. Dále bych se také chtěla zaměřit na možnosti jejich použití v praxi a pro běžné chovatele nebo majitele psů.

1.3 Termíny a definice použité v bakalářské práci

✧ Genomika

Genomiku lze charakterizovat jako obor, jehož cílem je stanovit úplnou dědičnou informaci organismů a interpretovat ji v termínech životních pochodů. V některé literatuře se rozděluje na tzv. strukturní genomiku, spočívající ve stanovení sledu nukleotidů genomu organismu. Dále pak na bioinformatiku, která počítačovými metodami a prací v databázích interpretuje přečtenou dědičnou informaci, a posledně na funkční genomiku. Zde je základem experiment, kdy se například vyřazením nějakého genu z činnosti snažíme přiřadit funkci neznámým genům nebo funkci genů studovat. Tím nám genomika může poskytnout nástroje k praktickému využití genetické informace jedince třeba právě při určování otcovství (PAČES, 2002)

✧ Polymorfismus

Genetický polymorfismus se vysvětluje jako výskyt minimálně dvou různých alel v daném lokusu. Pokud se vzácnější alela objevuje alespoň v 1% případů, potom je gen polymorfní (DVOŘÁK et VRTKOVÁ, 2001).

✧ Marker

Genetický marker je hodnocen jako vysoce polymorfní znak, vysoce informativní, početný a relativně snadno detekovatelný. Vykazuje mendelistickou kodominantní dědičnost (KNOLL et VYKOUKALOVÁ, 2002). Mezi genetické markery se řadí například minisatelity, mikrosatelity a SNPs.

✧ Paternita

Paternitu lze přeložit jako otcovství (lat. pater znamená otec). V některých pramenech se dočteme, že je to skutečnost, kdy kopulačně investované spermie daného samce skutečně fertilizovaly samici (ŠTYS, 1996).

Pojem paternita se často nesprávně používá v souvislosti s ověřováním původu u zvířat. To ovšem platí pouze pro soudní lékařství, kde se vychází ze starodávné římské zásady: "Mater semper certa est, pater incertus", aneb matka je vždy jistá, otec nejistý. U zvířat je situace zcela jiná, protože se ověřování původu netýká pouze samců, ale i samic (DVOŘÁK et al., 2002). Z tohoto důvodu jsme se rozhodla ve své bakalářské práci používat pojem parentita místo pojmu paternita.

✧ Parentita

Parentitu chápeme jako rodičovství (lat. parentes znamená rodiče).

2 TRADIČNÍ METODY OVĚŘOVÁNÍ PARENTITY

2.1 Ověřování původu pomocí krevních skupin

Krevní skupiny se k ověřování parentity začaly využívat už v šedesátých letech 20. století. Jejich objevitelem u lidí se v první polovině 20. století stal Karl Landsteiner, který zavedl termín krevní skupiny. Krevní skupiny byly v té době označeny A, B, C (později 0) (EBC, 2002). Na objevu se podílel i Jan Jánský, jemuž později americká lékařská komise udělila prvenství v tomto oboru. Jánský upozornil na přítomnost čtyř krevních skupin. Těm přiřadil římské číslice I., II., III., IV (dnes A, B, AB, 0) (KUPKA). Pro ně byl zaveden nový termín, krevně skupinový systém.

U hospodářských zvířat se vyskytuje větší počet krevně skupinových systémů, pro které se používá označení velkými písmeny abecedy (DVOŘÁK et al., 2002).

2.1.1. Charakteristika krevních skupin

První zprávy o studiu krevních skupin u psů podává YOUNG et al. (1950). Popsal výskyt pěti erythrocytárních izoantigenů u psů. Na jeho práci navazuje SWISHER et al. (1961), který našel již 8 antigenů a prostudoval jejich genetickou kontrolu. V roce 1973 bylo navrženo označovat erythrocytární antigeny u psů symboly CEA 1, CEA 2 atd., jako Canine Erythrocyte Antigens (VRIESENDORP et al., 1973). Toto označení však neodpovídá mezinárodním potřebám, poněvadž zkratkou CEA jsou označeny karcinogenní embryonální antigeny (DOSTÁL, 1995).

V současné době je systém označován zkratkou DEA (Dog Erythrocyte Antigen) spolu s číslem, jež specifikuje antigen: DEA-1.1, DEA-1.2, DEA-3, DEA-4, DEA-5, DEA-6, DEA-7 a DEA-8. Za extrémně vzácnou se považuje DEA-1.3.

Červené krvinky psa mohou obsahovat každý jednotlivý antigen. V případě přítomnosti jakéhokoli antigenu je označován pes jako pozitivní, v případě že krvinky antigen neobsahují, je pes tzv. negativní. To znamená, že teoreticky může pes mít i všech osm antigenů (CHVMG, 2003).

Tab. 1: Krevní antigeny psa

správný název	často používaný název	% výskytu v populaci
DEA 1.1	A1	40
DEA 1.2	A2	20
DEA 3	B	5
DEA 4	C	98
DEA 5	D	25
DEA 6	F	98
DEA 7	Tr	45
DEA 8	He	4

Zdroj: http://www.chastainvets.info/focus/fs_bloodtype.htm

2.1.2 Nevýhody ověřování pomocí krevních skupin

Nevýhodou krevních skupin u psů pro ověřování původu je náročné testování a příprava specifických reagentů. Mimo to systémy krevních skupin u psů nejsou takzvaně uzavřené, to znamená, že fenotypické vyjádření např. homozygota D^aD^a je stejné jako vyjádření heterozygota D^aD^r . Tato skutečnost dovozuje jen velmi omezené využití krevních skupin u psů pro ověřování původu (DOSTÁL, 1995).

2.2 Ověřování původu pomocí biochemických polymorfních znaků

2.2.1 Polymorfní znaky v erytrocytech, krevní plazmě a krevním séru psů

K praktickému využití pro ověřování parentity jsou vhodné jen ty polymorfní znaky (systémy), u nichž jsou alely v kodominantním genetickém vztahu, jejich fenotyp se nemění během života jedince a dají se snadno testovat bez ohrožení životních funkcí jedince. Pro ověřování parentity se tedy nehodí genetické znaky testované ve tkáních vnitřních orgánů těla psa a nevhodné jsou také genetické znaky mléka, semenné plazmy, případně dalších tekutin, které jsou produktem pouze jednoho pohlaví.

2.2.2 Používané polymorfní znaky

Pro ověřování parentity se nevyužívá hemoglobin, který nebyl nalezen u našich plemen polymorfní. Mohou být ale snadno využity následující systémy polymorfních znaků: albumin, kyselá fosfatáza, leucinaminopeptidáza, tetrazolium oxidáza, transferin. Jejich vhodnost se však poněkud mění podle plemene a podle individuálních podmínek každého případu. Proto nelze při ověřování parentity žádný z uvedených znaků vynechat. Z dalších známých polymorfních systémů mohou být perspektivně využity ještě peptidáza D (Pep D) a glukózofosfátizomeráza (GPI) (DOSTÁL, 1995).

✧ Albumin

DAY et al. (1971) popsali polymorfismus sérového albuminu psů pomocí elektroforézy ve škrobovém gelu. Sérový albumin u psů je kontrolován dvěma kodominantními alelami (*Alb F* a *Alb S*) z jednoho autozomálního lokusu. Distribuce albuminu je charakterizována frekvencemi alel *Alb F* = 0,57 a *Alb S* = 0,43. Tyto výsledky potvrdil také MGHENI et al. (1979).

TOWENSLEY et al. (1972) navrhuji označení rychlejší frakce *Alb A* a pomalejší frakce *Alb B*. Popsali frekvence *Alb A* = 0,435 a *Alb B* = 0,565. Výsledky analýzy rodin uvádí VRIESENDORP et al. (1973). Naproti tomu SIMONSEN (1976) našel v populaci 197 psů jen jednoho heterozygota, i když ke studiu používal popsané metody škrobové elektroforézy podle Daye et al. (1971). Stejnou metodou elektroforézy ve škrobovém gelu byl pozorován a popsán polymorfismus albuminu u našich plemen psů (DOSTÁL, 1981).

CHRISTENSEN et al. (1985) studovali souvislost polymorfismu albuminu u psů s jejich výškou, popř. délkou končetin. Zjistili, že mezi genem pro albumin a geny pro délku končetin neexistuje vazba, a že jsou tedy lokalizovány na odlišných chromozomech.

✧ Glukózofosfátizomeráza

Genetický polymorfismus glukózofosfátizomerázy (GPI) popsali TANABE et al. (1977) v hemolyzátu erytrocytů šesti plemen psů chovaných v Japonsku. GPI je kontrolována dvěma kodominantními alelami z jednoho autozomálního lokusu. Frekvence alely *GPI A* = 0,962 a alely *GPI B* = 0,038.

✧ Kyselá fosfatáza

První zprávy o polymorfismu kyselé fosfatázy u psů podává HEIDEL (1968). Jako dvoualelový kodominantní systém kyselé fosfatázy, řízený z jednoho autozomálního lokusu, popsali v hemolyzátu erytrocytů u psů BRAEND and AUSTAD (1973). Autoři jej nazvali systémem kyselé fosfatázy, protože tento polymorfní enzym štěpí v kyselém prostředí

fenolftalein difosfát na fenolftalein. Rychleji putující frakci ve škrobovém gelu označují *Pac F* a pomaleji putující frakci *Pac S*. U popsané skupiny psů plemene labradorský retrievr byly nalezeny frekvence $Pac F = 0,13$ a $Pac S = 0,87$. WEIDEN et al. (1974) popsali výskyt pouze jedné varianty kyselé fosfatázy. DOSTÁL (1981) popsal polymorfismus kyselé fosfatázy u našich ušlechtilých plemen psů s podobně nižší frekvencí *Pac F*, jak uvádí původní autoři.

✧ **Leucinaminopeptidáza**

Genetický polymorfismus leucinaminopeptidázy v krevní plazmě u psů popsali TANABE et al. (1974). Analýza rodin ukázala, že jde o dvoualeleový systém kodominantních alel *Lap A* a *Lap B*, řízených z jednoho autozomálního lokusu. U většiny studovaných plemen psů v Japonsku byly frekvence $Lap A = 0,97$ a $Lap B = 0,03$. SIMONSEN (1976) tento polymorfismus nepozoroval. Byla vyslovena domněnka, že jde o charakteristický znak japonských plemen psů. Polymorfismus *Lap* však byl potvrzen u plemene český fousek, německý krátkosrstý ohař a novofundlandský pes (DOSTÁL, 1981), čímž byla domněnka o charakteristickém znaku vyvrácena.

✧ **Peptidáza D**

Škrobovou elektroforézou popsala SAISON (1972) polymorfismus peptidázy D v hemolýzátu erytrocytů u psů. Studium rodin prokázala, že jde o dvoualeleový kodominantní autozomální systém s frekvencí alel $Pep-Da = 0,76$ a $Pep-Db = 0,24$ u testované skupiny psů. Tyto výsledky rovněž potvrdila KHAN et al. (1973).

✧ **Tetrazolium oxidáza**

Dvoualeleový systém tetrazolium oxidázy v hemolýzátu erytrocytů u psů popsali BAUR and SCHOOR (1969). Autoři zjistili, že jde o kodominantní autozomální řízení tohoto polymorfního systému z jednoho lokusu. U většiny plemen je popsána frekvence alel tetrazolium oxidázy $TO A = 0,94$ a $TO B = 0,06$. U německých ovčáků byla frekvence alel významně odlišná ($TO A = 0,80$ a $TO B = 0,20$). Elektroforetický obraz psí *TO A* je velmi podobný lidskému obrazu tetrazolium oxidázy. Hemolýzát lidských erytrocytů proto může sloužit jako standard při studiu tetrazolium oxidázy u psů. Podobné výsledky uvádí též KHAN et al. (1973), WEIDEN et al. (1974), SIMONSEN (1976) a DOSTÁL (1981).

✧ **Transferin**

BRAEND (1966) podobně jako STEVENS a TOWNSLEY (1970) popsal polymorfismus sérového transferinu u psů. Tato bílkovina je kontrolována třemi kodominantními alelami *Tf A*, *Tf B* a *Tf C* z jednoho autozomálního lokusu. Ke studiu

transferinu u psů doporučuje používat jednodušší metodu elektroforézy ve škrobovém gelu.

STEVENS a TOWNSLEY (1970) pozorovali menší výskyt homozygotů v transferinovém typu při páření heterozygotů mezi sebou. Rovněž tak VRIESENDORP et al. (1973) pozorovali menší výskyt homozygotů *Tf AA* při páření heterozygotů mezi sebou a při páření jedinců genotypu *Tf AA*×*Tf AB*. Počet těchto páření však nebyl natolik velký, aby stačil k seriózním genetickým závěrům. Ve studované populaci byly frekvence *Tf A* = 0,611, *Tf B* = 0,373, *Tf C* = 0,016 a byly v souladu s frekvencemi předpokládanými.

Elektroforézou ve škrobovém gelu popsal REETZ et al. (1976) u psů výskyt dvou odlišných typů transferinů, které označil jako *Tf M1* a *Tf M2*. Analýzou rodin prokázal, že jde o dvě kodominantní alely jednoho autozomálního lokusu. Vyslovuje domněnku, že se mu touto technikou podařilo rozlišit mezi Braendem (1966) popsanými alelami *Tf F*, *Tf M* a *Tf S* ještě další. K mezinárodnímu porovnání nomenklatury však nedošlo.

Polymorfismus sérového transferinu u psů potvrdili další autoři, jako VRIESENDORP et al. (1973), KNAPP a HUNTER (1975), SIMONSEN (1976), REETZ et al. a DOSTÁL (1981).

Co se týká České republiky, tak testace rodičovství pomocí polymorfních systémů krve se využívá jen zřídka u některých plemen. Příkladem může být plemeno hovawart, kde se jako biochemické polymorfní znaky využívají: albumin krevní plazmy, transferin krevní plazmy, leucine amonopeptidase (enzym krevní plazmy), alkalická fosfatáza (enzym hemolýzátu erytrocytů), superoxide dismutase (enzym hemolýzátu erytrocytů, dříve tetrazolium oxidáza) (HOVAWART KLUB, 2006).

U skotu a koní v České republice ovšem došlo k úplnému přechodu z techniky krevních skupin na techniku DNA (používání mikrosatelitů) už v roce 2003 (GLASNÁK, 2003).

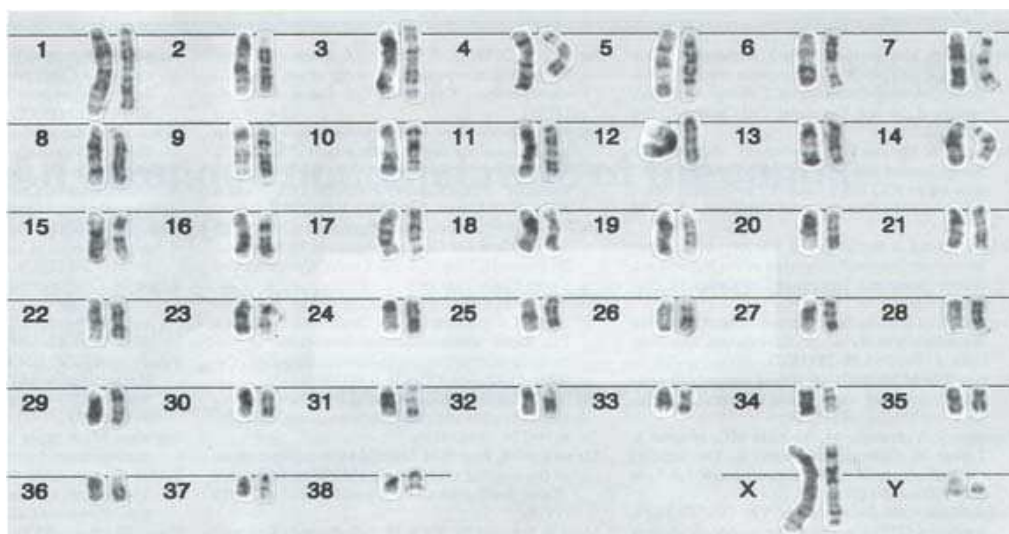
3 METODY GENOMIKY V OVĚŘOVÁNÍ PARENTITY

3.1 DNA analýzy

V současné době se pro ověřování parentity většinou používají metody molekulární genetiky, DNA analýzy. Hlavní princip spočívá především v získání DNA jedince a v její následné analýze. Mezi používané metody patří testování pomocí mikrosatelitů a jednonukleotidových mutací DNA (tzv. SNPs), o nichž bude ještě dále pojednáno.

Mezi zásadní výhody testování DNA analýzou proti imunogenetickým a biochemickým genetickým metodám se řadí:

- ✓ DNA je jako nositel dědičnosti pro každého jedince naprosto specifická a její polymorfismus poskytuje nesčetné varianty (minisatelitní a mikrosatelitní sekvence, SNPs), proto ji můžeme považovat za téměř identifikační.
- ✓ K ověřování parentity pomocí krevně skupinových a polymorfních proteinových systémů jsou zapotřebí čerstvé nesražené krve, kdežto zdrojem pro DNA analýzy mohou být i různé tkáně, sperma, nebo chlupové cibulky.
- ✓ DNA analýzou lze nejen vyloučit samce jako možného otce, ale s vysokou jistotou lze říci o samci, že je otcem testovaného potomka, a to s pravděpodobností, která přesahuje hranici 90 %.
- ✓ Polymorfismus DNA (mikrosatelity a SNP) je na vyšší úrovni než polymorfismus proteinových systémů.
- ✓ Za dodržení určitých podmínek lze DNA uchovávat po dlouhou dobu a tím je umožněno případné opakované ověření parentity (DNA banky).
- ✓ Pro DNA analýzu se používá jednotná technologie, která je automatizovaná.

Obr. 1: Ideogram psích chromozomů

Zdroj: <http://www.canine-gene-project.de/>

3.2 Princip DNA analýzy

Každý jedinec je geneticky unikátní a jeho genetická výbava se nemění během života. Z tohoto důvodu genetická analýza DNA představuje široce využitelnou metodu pro ověřování rodičovství nebo identifikaci jedince.

Ověření rodičovství tímto způsobem je založeno na porovnání složení DNA (mikrosatelitů) potenciálních rodičů s potomkem. Základem je, že každý mikrosatelit, který se vyskytuje u potomka, musí být přítomen minimálně u jednoho z rodičů (nebo obou rodičů). Jestliže mikrosatelit potomka není přítomen ani u jednoho z rodičů, nejedná se o jeho skutečné rodiče (JOHNSON, 2002).

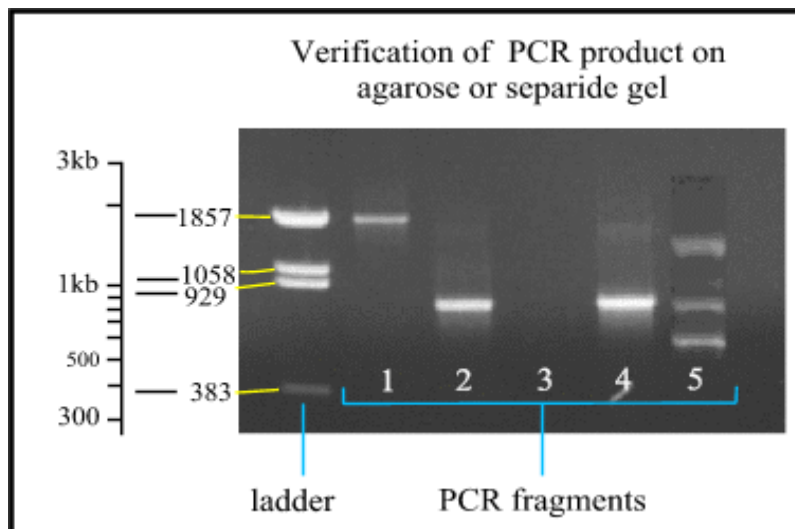
Laboratorní analýzy využívají proces, který je velmi podobný skutečné amplifikaci (množení) DNA v buňkách. Polymorfismus mikrosatelitů nebo SNPs může být rychle a spolehlivě testován například pomocí metod: PCR, elektroforézy a dnes zejména moderní metodou fragmentační analýzy (ANONYM, 2005).

Pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR) prováděné na automatickém termálním cykleru (termocykleru) se namnoží dané úseky DNA, přitom z jednoho vzorku tkáně je možné získat až milióny kopií (HAMANOVÁ, 1999). Podstatou PCR je cyklicky se opakující enzymová syntéza nových řetězců vybraných úseků dvouřetězcové DNA ve směru 5' → 3' prostřednictvím DNA – polymerázy. Výsledným produktem jsou amplikony

(úseky DNA definované délky o velikosti obvykle desítky až tisíce bp). Jejich přítomnost v reakční směsi se prokazuje stanovením velikosti elektroforézou (ŠMARDA, 2005).

Principem elektroforézy je pohyb nabitých molekul DNA v elektrickém poli (migrují od katody k anodě přes laserový detektor) (HAMANOVÁ, 1999). Vzorek je nanesen na speciální medium (agarózový nebo polyakrylamidový gel), kde dojde k separaci jednotlivých alel DNA. Výsledkem je uspořádání alel a jejich velikostí (bp) v řadách, ty je možné rozlišit pomocí barevného fluorescenčního značení (JOHNSON, 2002). Alely o stejné velikosti jsou pak v gelu patrné jako proužky (ŠMARDA, 2005).

Obr. 2: PCR analýza



Zdroj: <http://users.ugent.be/~avierstr/principles/pcr.html>

Základem pro fragmentační analýzu jsou dvouřetězcové DNA fragmenty definované délkou, které jsou na 5' konci značeny fluorescenčními barvivy. DNA velikostní fragmenty mohou být použity jako interní referenční bod pro přesnější a preciznější určení velikosti neznámých DNA fragmentů (např. při analýze mikrosatelitů) (EAST PORT, 2005).

Pro ověření jednonukleotidových polymorfismů (SNP) v sekvencích se používá metoda minisekvencování. Ta umožňuje spolehlivě odlišit jednotlivé alely genů (ŠMARDA).

3.3 Ověřování parentity pomocí mikrosatelitů

3.3.1 Charakteristika mikrosatelitů

Mikrosatelity, také známé jako krátké tandemové repetice (syn. STRs – short tandem repeats, SSR – simple sequence repeat), jsou složené z mono-, di-, tri- nebo tetranukleotidových repeticí (KNOLL et VYKOUKALOVÁ, 2002). Pro názornost si můžeme představit mikrosatelit jako poškrábanou vinylovou gramofonovou desku, která při přehrávání „kocká“ – tedy opakuje několikrát po sobě jedno a totéž, než se rozeběhne zase dál (PETR, 1999).

Mikrosatelity samy o sobě neovlivňují produkční znak, ale mohou být v molekule DNA blízko (tzn. v genetické vazbě) s dosud neznámým, ekonomicky významným, lokusem = ETL. Potom alely mikrosatelitů, které stanovíme molekulárně genetickými technikami, mohou být markery pro odlišné varianty ETL (DVOŘÁK et al., 1999).

Délka repetitivní sekvence se obvykle pohybuje od 1. do 4.bp (může ale být až 6 bp), ta se označuje jako jednoduchá repetice. Počet jejich opakování v každém lokusu je do 100 bp. (DVOŘÁK et al., 2002). V eukaryotní buňce genomu savců se nejčastěji vyskytuje motiv $(CA)_n$, který se nachází asi v 50 – 100 tisících kopiích na různých lokusech (KNOLL et VYKOUKALOVÁ, 2002).

Mikrosatelity se řadí mezi užitečné genetické markery díky vysokému polymorfismu a relativně snadné detekci (HAMANOVÁ, 1999). Výhodou mikrosatelitů je vysoká míra jejich informativnosti v rodokmenech, díky své vysoké variabilitě se využívají pro určování otcovství (paternity) a rodičovství (parentity) (KNOLL et VYKOUKALOVÁ, 2002). Vyšetření založené na mikrosatelitech je relativně jednoduché a levné, široce se využívá ve vazebných, asociačních a populačních studiích, pro DNA diagnostiku i pro forenzní účely. Polymorfismus mikrosatelitů může být rychle a spolehlivě testován pomocí nejrůznějších metod založených na analýze DNA.

3.3.2 Význam mikrosatelitů

Ověřování parentity pomocí polymorfismu mikrosatelitních markerů patří u psů mezi nejspolehlivější.

Ke genetické identifikaci a následnému ověřování rodičovství se vybírají mikrosatelity s délkou 70–360 bp (bp = pár bází, např. GC). Dva nepříbuzní jedinci mohou mít v genetické výbavě úseky o stejné délce. Proto musíme k ověření rodičovství prověřit

několik mikrosatelitních oblastí (obvykle 10–12), aby se zvýšila pravděpodobnost vyloučení nesprávného rodiče. Frekvence výskytu mikrosatelitů o stejné délce je samozřejmě vyšší v rámci plemene a velice vysoká při úzké příbuzenské plemenitbě. Pokud je původ potomka označený jako nesouhlasný, je to výsledek takřka stoprocentní. Souhlasný původ lze v závislosti na stupni příbuzenské plemenitby deklarovat s přesností přibližně 96%. Pravděpodobnost vyloučení falešného potomka v případě, že je testován pouze jeden z rodičů, se snižuje zhruba o třetinu (SCHRÖFFELOVÁ, 2001).

U psů se nejvíce vyskytovaly repetice $(CA)_n \times (GT)_n$ skoro každých 43 kb. Vzdálenost mezi tri- a tetranukleotidovými mikrosatelity byla průměrně kolem 320 kb. GAAA tetranukleotidová repetice byla u psa zjištěna jako silně polymorfní (FRANCISCO et al., 1996). Další tetranukleotidové repetice byly v psím genomu zjištěny asi jedenkrát každých 100–200 kb (ZAJC et al., 1997).

Podstatné je, že na rozdíl od hospodářských zvířat k ověřování parentity u psů neexistuje žádný mezinárodně uznaný a používaný panel mikrosatelitů. Zatímco některé druhy hospodářských zvířat mají povinnost ověřování parentity a stanovení genetického typu nařízeno zákonem č. 154/2000 Sb., o šlechtění, plemenitbě a evidenci hospodářských zvířat (v pozdějším znění zákonem č. 130/2006 Sb.), psi v tomto zákoně uvedeni nejsou. Vše závisí pouze na jednotlivých chovatelských klubech, které mohou mít tuto povinnost ve svých stanovách. Proto mohou být značné rozdíly ve složení používaných panelů k určování genetického typu a ověřování rodičovství.

Například klub chovatelů československého vlčáka má ve svých stanovách uvedeno pro sporné situace týkající se ověřování rodičovství: „Test paternity může nařídít výbor Klubu na návrh chovatelské komise. V případě, že paternita potvrdí údaje uvedené v dokladech vrhu, hradí náklady Klub. V opačném případě hradí náklady chovatel.“ (KCHČSV, 2006).

3.4 Ověřování parentity pomocí SNPs

3.4.1 Charakteristika SNPs

SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms) patří do skupiny jednonukleotidových mutací DNA. Jde o nejčastější formu polymorfismu v lidském genomu, vyskytující se asi jedenkrát na 1000 bází (ANONYM, 2003). Základem je změna v DNA, která vznikne delecí (ztrátou), substitucí (záměnou) nebo inzercí (vložením) jednoho nukleotidu. Přesněji řečeno, SNP se objevuje tam, kde jeden nukleotid jako třeba adenin (A) je například nahrazen jakýmkoli jiným nukleotidem thyminem (T), cytosinem (C) nebo guaninem (G), a to ve významné části populace (>1 %). Důležité je, že jeden nukleotid znamená ve skutečnosti 1 pár bází v DNA, takže jestli je A nahrazen C, musí být v komplementárním řetězci T nahrazen G (ANONYM, 2005). Tyto záměny se vyskytují v kódujících i nekódujících oblastech savčího genomu s četností přibližně 1 SNP na 50 – 500bp (PADHUKASAHASRAM et al., 2004).

Dědičně předávané změny jednotlivých bází jsou označovány jako genový polymorfismus. Pokud ke změnám jednotlivých nukleotidových bází dojde v průběhu života, jsou označovány jako mutace. Odhaduje se, že u člověka existuje okolo 900 genů vykazujících polymorfismus, který v důsledku vede k tvorbě proteinů se změněnou funkcí (KREJSEK, 2004).

3.4.2 Význam SNPs

SNPs u psů jsou v současnosti pouze ve fázi výzkumu. U některých zvířat (myš, masný a mléčný skot) byly už sestaveny jednotlivé panely SNPs. Například panel pro masný skot je sestaven z 32 lokusů. Při pokusech bylo zjištěno, že pravděpodobnost vyloučení náhodně vybraného kandidátního otce je 99,4 % pro čistokrevnou populaci plemene Aberdeen Angus a 99,9 % pro populaci z více plemen (HEATON et al., 2002).

SNPs představují do budoucna alternativu, která by postupně mohla nahradit mikrosatelity při ověřování rodičovství a jedinečné identifikaci jedinců. Další studium a výběr jednonukleotidových mutací DNA nejen u psů by mohlo umožnit značný pokrok i při výzkumu vzniku některých dědičných onemocnění.

4 OVĚŘOVÁNÍ PARENTITY DNA TESTY U PSŮ VE SVĚTĚ

4.1 ISAG

V roce 2002 na 28. konferenci International Society for Animal Genetics (ISAG) bylo komisí pro aplikovanou genetiku psů navrženo 23 mikrosatelitních markerů pro mezinárodní panel (ISAG, 2002). V té době ISAG pracoval s 29 mikrosatelity (tab.2), od roku 2005 je to pouze 22 mikrosatelitů (tab.3) (ISAG, 2005).

Tab. 2: Panely mikrosatelitů ISAG 2002

Panel 1			
AHT121	C22.279	FH2001	FH2247
AHTh171	PEZ 08	FH2054	FH2289
AHTk253	INRA21	FH2164	FH2611
Panel 2			
AHTk211	FH2305	PEZ 03	PEZ 12
FH2326	FH2328	PEZ 10	PEZ 22
FH2361	LEI2D2	PEZ 11	
Panel 3			
FH2148	FH2165	FH2293	FH2324
FH2161	FH2200		

Tab. 3: Panely mikrosatelitů ISAG 2004

Panel 1A		Panel 1B	
AHTk253	CXX279	AHTh171	REN162C04
AHT121	FH2054	AHTh260	
AHTk211	INRA21	REN54P11	
Panel 2A		Panel 2B	
Amelogenin	REN105L03	REN169018	INU005
AHTh130	REN64E19	REN247M23	INU030
AHT137	REN169D01	FH2848	INU055

- ◆ Shodné mikrosatelity používané ISAGem v roce 2002 a zároveň i AKC
- ◆ Shodné mikrosatelity používané ISAGem v roce 2002 a 2005

4.2 American Kennel Club

American Kennel Club v současné době používá 17 mikrosatelitů (tab.4) pro ověřování rodičovství u psů. Ty byly rozděleny do dvou panelů, první obsahuje 10 a druhý 7 mikrosatelitních markerů. První panel se stal komerčně používaný jako StockMarks® Paternity PCR Tyliny Kit (Applied Biosystems). Panely obsahují 2 typy mikrosatelitů : FHC markery byly identifikovány a zveřejněny Francisco et al. (1996), Fred Hutchinson Cancer Research centrem, PEZ markery identifikoval Halverson et al. (1995).

Při pokusech se prokázalo, že PEZ 03 (panel 1) je vysoce polymorfní u všech zkoumaných plemen, naopak v panelu 2 byl vysoce polymorfní PEZ 10. Při celkovém zhodnocení jen 4 markery byly označeny za monomorfní, ale jen u velmi malého počtu plemen. Například FHC 2079 byl monomorfní u plemene boxer, bullteriér, anglický kokršpaněl, a skye teriér, FHC 2010 u norfolkského teriéra a skye teriéra, PEZ 20 u skotského jeleního psa (deerhound) a skye teriéra, PEZ 05 u faraónského psa.

Jednotlivá plemena se lišila v PIC (polymorfní informační obsah), ale průměrná hodnota PIC markerů byla vysoká (v panelu 1–0,53, v panelu 2–0,61). Panel 1 (10 mikrosatelitů) umožnil 99% pravděpodobnost vyloučení otcovství u 61 % zkoumaných plemen. V kombinaci s panelem 2 (7 mikrosatelitů) 100 % testovaných plemen dosáhlo 99% pravděpodobnost vyloučení. Všech 17 mikrosatelitů prokázalo, že jsou vysoce informativní a použitelné při genetických metodách. Kombinace 10–15 mikrosatelitů z obou panelů by mohla být použita jako mezinárodní panel pro ověřování rodičovství a další identifikační metody (DeNISE et al., 2004).

Tab. 4: Panely mikrosatelitů American Kennel Club

Panel 1			
PEZ 01	PEZ 06	PEZ 20	FHC2079
PEZ 03	PEZ 08	FHC2010	
PEZ 05	PEZ 12	FHC2054	
Panel 2			
PEZ 10	PEZ 13	PEZ 16	PEZ 21
PEZ 11	PEZ 15	PEZ 17	

◇ Shodné mikrosatelity používané ISAGem v roce 2002 a zároveň i AKC

5 OVĚŘOVÁNÍ PARENTITY DNA TESTY U PSŮ V ČR

5.1 Mikrosatelity v ČR

V České republice se ověřováním rodičovství zabývá laboratoř imunogenetiky ČMSCH a.s. Hradištko pod Medníkem a Ústav morfologie, fyziologie a genetiky hospodářských zvířat (LAMGen) Mendelovy zemědělské a lesnické univerzity v Brně. LAMGen využívá pro ověřování komerčně dodávaný StockMarks® Paternity PCR Tyliny Kit (tab.5) (HORÁK, 2004).

Tab. 5: Panely mikrosatelitů StockMarks®

Panel 1			
PEZ 01	PEZ 06	PEZ 20	FHC2079
PEZ 03	PEZ 08	FHC2010	
PEZ 05	PEZ 12	FHC2054	

5.2 SNPs v ČR

V laboratořích LAMGen byly k výzkumu detekce SNPs u psů vybrány: gen beta A3/A1 crystallinu (*CRYB*), gen von Willebrandova faktoru (*VWF*), gen KIT ligand (*KITLG*), Transducin-gama gen (*GNGT1*).

Gen beta A3/A1 crystallinu se u psů nachází na 9. chromosomu (WERNER et al., 1997). Tento gen kóduje jednu z podjednotek strukturálního proteinu crystallinu, proto se předpokládá i jeho souvislost s výskytem některých typů katarakty (šedý zákal) (GRAW and LOSTER, 2003). Gen von Willebrandova faktoru byl mapován na chromosomu CFA16. Tato mutace způsobuje u některých plemen psů poruchy srážlivosti krve, je detekovatelná restrikčním enzymem MspI (HORÁK, 2003). Gen KIT ligand se vyskytuje na 15. chromozomu, který má souvislost s hematopoetickým růstovým faktorem (ovlivňuje tvorbu krve a vývoj některých buněčných typů) (SCHMUTZ and BERRYERE, 2005). Umístění psího *GNGT1* genu je neznámé (WANG et al., 1997).

Ve sledovaném souboru 22 zvířat (plemena anglický kokršpaněl, pudl, německý ovčák a jezevčík) byly zachyceny obě alely genu beta A3/A1 crystallinu, ale výskyt všech genotypů byl zjištěn pouze u plemene anglický kokršpaněl.

Zastoupení všech genotypů genu *VWF* bylo odhaleno opět u plemene anglický kokršpaněl, ale též u pudlů. U německých ovčáků byla detekována velmi vysoká četnost alely *P*, u zbývajících plemen byly frekvence obou alel poměrně vyrovnané.

Nejvyšší meziplemenná variabilita v rozložení četností genotypů a alel byla zjištěna v genu *KITLG*. Ani u jednoho ze sledovaných plemen nebyli zachyceni jedinci všech tří možných genotypů, přičemž jedinci plemene německý ovčák byli dokonce monomorfní pro alelu *A*. U ostatních plemen byla naopak detekována mnohem vyšší četnost alely *G* (HORÁK, 2003).

Je nezbytné říci, že předešlé pokusy byly prováděny pouze na malém souboru testovaných zvířat (přesný počet 22). Z tohoto důvodu můžeme usuzovat pouze na malou vypovídací schopnost výsledků. Naopak SVOBODOVÁ (2005) testovala vybrané SNPs u psů na referenční skupině 50 zvířat (6 jezevčků, 5 jedinců amerických kokršpanělů, 8 německých ovčáků, 19 zástupců plemene pudl a 12 anglických kokršpanělů).

Gen *CRYB* byl polymorfní v celé populaci zvířat, výskyt všech genotypů byl však zjištěn jen u plemen americký kokršpaněl, pudl a anglický kokršpaněl. U jezevčků a anglických kokršpanělů byla vyšší frekvence alely *G*, u ostatních plemen tomu bylo naopak.

U genu *KITLG* byly zachyceny všechny tři možné genotypy jen u plemene pudl. Německý ovčák je monomorfní pro alelu *A*, americký kokršpaněl naopak pro alelu *G*. U anglického kokršpaněla a jezevčíka se shodně nevyskytoval genotyp *AA*.

Nejnižší meziplemenná variabilita v rozložení četnosti genotypů a alel byla zjištěna v genu *TYRPI*. Jediné plemeno, které nebylo monomorfní pro alelu *N*, byl anglický kokršpaněl. I u tohoto plemene se však vyskytl pouze jediný heterozygot.

Narozdíl od předešlých pokusů byl zde navíc sledován transducin-gama gen (*GNGT1*).

U žádného plemene se v genu *GNGT1* nevyskytoval genotyp *BB*. Jezevčík, německý ovčák a anglický kokršpaněl jsou v tomto genu monomorfní pro alelu *A*. U amerického kokršpaněla i u pudla pak také převládá alela *A*. Tyto výsledky korespondují s WANG et al. (1997), kteří také uvádějí velmi vysoké zastoupení (0,906) alely *A*.

Pravděpodobnost vyloučení rodičovství je u všech SNP nízká. Celkově je nejvyšší u lokusu *CRYB*, kde však nepřekročí hodnotu 0,3. Z těchto výsledků bylo vyvozeno, že sledované SNPs mimo *CRYB* nejsou vhodné pro využití při ověřování rodičovství a individuální identifikaci jedince. Přestože zjištěné hodnoty pro gen *CRYB* nejsou

optimální, umožňují zvážit jeho zařazení do panelu pro testování rodičovství a individuální identifikaci jedince (SVOBODOVÁ, 2005).

6 ZÁVĚR

V současné době se genetika dostává do podvědomí široké veřejnosti. Nejnovější poznatky pomáhají při řešení nejrůznějších problémů. Z hlediska chovu zvířat patří mezi nejdůležitější ověřování rodičovství či studium dědičně podmíněných nemocí. Jednou z možností, jak tyto problémy řešit, jsou DNA analýzy. Zatímco ověřování rodičovství pomocí mikrosatelitů je už vcelku zaběhlou záležitostí, novým trendem do budoucna se stávají SNPs. Ty mohou umožnit nejen spolehlivé určení rodičovství, ale mohou pomoci při detekci dědičných chorob.

Podle mého názoru důležitou oblastí v ověřování rodičovství u psů je genetický výzkum, kde se získávají nové možnosti pro tuto sféru. Jejich zavedení do praxe ale mnohdy trvá velice dlouhou dobu. Dnes se upírá pozornost především na SNPs, jenž by mohly vyřešit spoustu problémů nejen v ověřování rodičovství. Ve výzkumech v České republice byly sledovány různé SNPs : gen beta A3/A1 crystallinu (*CRYB*), gen von Willebrandova faktoru (*VWF*), gen KIT ligand (*KITLG*), Transducin-gama gen (*GNGT1*). Výsledky ovšem nebyly velice uspokojivé, jelikož pouze pro *CRYB* bylo navrženo zvážit jeho zařazení do panelu pro testování rodičovství a individuální identifikaci jedince.

V Evropě a Americe se momentálně pro ověřování rodičovství nejčastěji používají mikrosatelity. U psů sice neexistuje žádný mezinárodně uznaný panel mikrosatelitů, ale jednotlivé laboratoře mají svůj vlastní. Zajímavé je, že ISAG a AKC v současné době nepoužívá žádné shodné mikrosatelity. V roce 2002 ISAG ale používal 5 stejných mikrosatelitů jako AKC. LamGen Mendelovy zemědělské a lesnické univerzity využívá pro ověřování rodičovství komerčně dodávaný StockMarks® Paternity PCR Tyliny Kit, který je plně shodný s prvním panelem mikrosatelitů AKC.

Co se týká chovu psů, často se můžeme setkat se spornými situacemi, kdy je zapotřebí určitého řešení při potvrzení či vyloučení rodičovství. Domnívám se, že ve většině případů se jedná o spor mezi chovatelem a potenciálním majitelem, eventuelně chovatelským klubem. Zde je provedení zkoušky rodičovství naprosto opodstatněné a může vést k rychlému a úspěšnému vyřešení sporu.

Osobně si myslím, že ověřování rodičovství u psů může v mnohém usnadnit chov psů. Mohlo by též zajistit správný chov těchto krásných zvířat, který by byl podle všech etických zásad.

7 POUŽITÁ LITERATURA

AMERICAN KENNEL CLUB (AKC). *DNA and the AKC*. [online]. © 2006. [cit. 2006-04-10]. Dostupné z: <<http://www.akc.org/dna/index.cfm>>

BAKOŠ, A. *Plemena loveckých psů*. 1.vyd. Bratislava: Kontakt plus, s.r.o., 1998. 112 s. ISBN 80-88855-21-7

BAUR, E. W., SCHORR, R. T. *Genetic polymorphism of tetrazolium oxidase in dogs*. Science 166, 1969. s. 1524–1525.

BRAEND, M. *Serum transferrins of dogs*. Proc. 10th Eur. Conf. Anim. Blood Grps. biochem Polymorphism. Paris, 1966. s. 319–322.

BRAEND, M., AUSTAD, R. *Polymorphism of red cell acid phosphatase in dogs*. Anim. Blood Grps. biochem. Genet. 4, 1973. s. 189–192.

ČECHOVÁ, K. *DNA a American kennel club*. [online]. © 2002. [cit. 2006-04-15].

Dostupné z:

<<http://www.schnauzer.cz/clanek.php?id=11&PHPSESSID=0c609d437c4074378e319e6f80f3be2f>>

DAY, M. E., KRAAY, G. J., STEVENS, R. W. C. *Polymorphism of canine serum albumin*. Anim. Blood Grps. biochem. Genet. 2, 1971. s. 195–199.

DeNISE, S., JOHNSTON, E., HALVERSON, J., MARSHALL, K., ROSENFELD, D., McKENNA, S., SHARP, T., EDWARDS, J. Power of exclusion for parentage verification and probability of match for identity in American kennel club breeds using 17 canine microsatellite markers. [online]. © 2004. [cit. 2006-04-15]. Animal Genetics 35, 2004. s. 14–17. Dostupné z: <<http://www.blackwell-synergy.com/doi/full/10.1046/j.1365-2052.2003.01074.x>>

DOSTÁL, J. *Paternity control in Dogs by Polymorphic Markers*. Mezinárodní konference u příležitosti Světové výstavy myslivosti a rybářství, Plovdiv. Sborník, 1981. s. 455–460.

DOSTÁL, J. *Chov psů, genetika v kynologické praxi*. 1. vyd. České Budějovice: Dona, 1995. 208 s. ISBN 80–85463–58–X.

DVOŘÁK, J. PUTNOVÁ, L. VRTKOVÁ I. *Ověřování parentity u prasat, skotu a koní*. CD-ROM. MZLU v Brně, 2002.

DVOŘÁK, J., VRTKOVÁ, I., HRUŠKA, D., COUFALOVÁ, M. *Genetické markery pro mastnou užitkovost prasat*. [online]. © 1999. [cit. 2006-04-10]

Ústav genetiky - MZLU v Brně.

Dostupné z: <<http://kchpd.af.czu.cz/old/konference/99/dvorak.html>>

DVOŘÁK, J., VRTKOVÁ, I. *Malá genetika prasat II*. MZLU v Brně, 2001. 91 s. ISBN 80–7157–521–6.

EAST PORT. *Fragmentační analýza*. [online]. © 2005. [cit. 2006-04-29].

Dostupné z: <http://www.genetika.cz/firmy.php?kat1=visgen&kat2=trugene_hiv-1&kat3=fragment_anal>

EDUCATIONAL BROADCASTING CORPORATION (EBC). *Karl Landsteiner*.

[online]. © 2002.[cit. 2006-04-10]. Dostupné z:

<http://www.pbs.org/wnet/redgold/innovators/bio_landsteiner.html>

FRANCISCO, L. V., LANGSTON, A. A., MELLERSH, C. S., NEAL, C. L., OSTRANDER, E. A. *A class of highly polymorphic tetranucleotide repeats for canine genetic mapping*. *Mammalian Genome* 7, 1996. s. 359–362.

Genetická kartografie. [online]. © 2005. [cit. 2006-04-02]. Dostupné z:

<http://biol.lf1.cuni.cz/ucebnice/geneticka_kartografie.htm>

Genetika – Váš zdroj informací. [online]. © 2003 – 2006. [cit. 2006-04-15] Dostupné z: <<http://genetika.wz.cz/>>

GLASNÁK, V. *Poslední rok plošného používání krevních skupin k ověřování původu.* [online]. © 2003. [cit. 2006-04-10].

Dostupné z: <<http://www.agroweb.cz/projekt/clanek.asp?pid=2&cid=8745>>

GRAW, J., LOSTER, J. *Developmental genetics in ophthalmology.* *Ophthalmic Genetics* 24(1), 2003. s. 1–33.

HAMANOVÁ, K. *Polymorfismus DNA se zaměřením na mikrosatelity u koní* (zkrácený obsah disertační práce – podklad pro seminář určený pro chovatelskou veřejnost). [online]. © 1999. Poslední revize 19. 6. 2005, [cit. 2006-04-25]. Dostupné z: <http://www.hucul.net/knihy/Hucul_rk.htm>

HANZAL, V., VOCHOZKA, V. *Lovečtí psi – výchova a výcvik.* 2. vyd. České Budějovice: Dona, 2000. 184 s. ISBN 80–86136–74–4.

HEATON, M. P., HARHAY, G. P., BENNETT, G. L., STONE, R. T., GROSSE, W. M., CASAS, E., KEELE, J. W., SMITH, T. P. L., CHITKO-MCKOWN, C. G., LAEGREID, W. W. *Selection and use of SNP markerks for animal identification and paternity analysis in U. S. beef cattle.* [online]. © 2002. [cit. 2006-04-29]. *Mammalian Genome* 13, s. 272–281. Dostupné z:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=pubmed&dopt=Abstract&list_uids=12016516&itool=iconabstr&query_hl=2&itool=pubmed_DocSum>

HEIDEL, G. *Polymorphism of erythrocyte acid phosphatase in dogs.* *Deutsch. Gesundh.* 23, 1968. s. 2197–2198.

HORÁK, P. DVOŘÁK, J. *Detekce bodového polymorfismu DNA u psů.* LAMGen Ústavu genetiky MZLU v Brně, 2003.

HORÁK, P. *Jednonukleotidové polymorfismy DNA u psů a jejich využití v chovatelské praxi*. [online]. © 2003. [cit. 2006-04-10]. Dostupné z:

<<http://old.mendelu.cz/~agro/af/mendelnet2003/obsahy/zoo/horak.pdf>>

HOVAWART KLUB. *Zdraví – kontrola původu chovných jedinců a izolace DNA*.

[online]. © 2006. [cit. 2006-04-02]. Dostupné z:

<<http://www.hovawart.cz/Zdravi/polymznaky.htm>>

CHASTAIN VETERINARY MEDICAL GROUP (CHVMG). *Animal Blood Types*.

[online]. © 2002 – 2006. [cit. 2006-04-10]. Dostupné z:

<http://www.chastainvets.info/focus/fs_bloodtype.htm>

CHRISTENSEN, K., ARNBJERG, J., ANDERSEN, E. *Polymorphism of serum albumin in dog breeds and its relation to weight and leg length*. *Hereditas* 102, 1985. s.219–223.

ISAG 2002. *Canine applied genetics workshop*. [online]. © 2002. [cit. 2006-04-10].

Dostupné z: <<http://www.vgl.ucdavis.edu/research/canine/ISAG/index.html>>

ISAG 2002. *Current ISAG Panels Aug2002*. [online]. © 2002. [cit. 2006-04-10].

Dostupné z:

<http://www.vgl.ucdavis.edu/research/canine/ISAG/Current_ISAGPanels_Aug2002.htm>

ISAG 2005. *Canine Panel for parentage verification*. [online]. © 2005. [cit. 2006-04-10].

Dostupné z: <<http://www.isag.org.uk/ISAG/all/2005ISAGPanelDOG.pdf>>

JOHNSON, P. G. *Basic Genetics and the Australian Shepherd Part Three: DNA Fingerprinting of Canines*. [online]. © 2002. [cit. 2006-04-25]. Dostupné z:

<http://www.ashgi.org/articles/gene_bank_dna_fingerprint.htm>

KHAN, M. P., LOSS, W. R. T., von der DOES, J. A., EPSTEIN, R. B. *Isoenzyme markers in dog blood cells*. *Transplantation* 15, 1973. s. 624–628.

KNAPP, K., HUNTER, R. *Serum proteins of the Beagle dog: two-dimensional electrophoretic study*. Am. J. Vet. Res., 36, 1975. s. 193–195.

KLUB CHOVATELŮ ČESKOLOVENSKEHO VLČÁKA (KCHČSV). *Chovatelský řád klubu chovatelů ČSV*. [online]. © 2005. [cit. 2006-04-10]. Dostupné z : <<http://www.cswolfdog.cz/Article462.html>>

KNOLL, A., VYKOUKALOVÁ, Z. *Molekulární genetika zvířat (Metody detekce polymorfizmů DNA genů)*. (scriptum), MZLU v Brně, 2002, 100 s.

KREJSEK, J. *Komentář k technice microarray*. [online]. © 2004. [cit. 2006-04-10]. Dostupné z: <<http://www.tigis.cz/alergie/aler403/14.htm>>

KUPKA, M. *Jan Jánský*. [online]. © 2002. [cit. 2006-04-10]. ISSN 1801-111X. Dostupné z: <<http://zivotopisyonline.cz/zipy/jansky.rtf>>

LUPKE, L. DISTL, O. *Microsatellite marker analysis of the genetic variability in Hanoverian Hounds*. [online]. © 1997. [cit. 2006-04-10]. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=pubmed&dopt=Abstract&list_uids=16130480&query_hl=2&itool=pubmed_docsum>

MGHENI, M., CHRISTENSEN, K., ANDRESEN, E. *Albumin polymorphism in domestic dog breeds*. Heredita 91, 1979. s. 307–308.

PAČES, V. *Genomika – věda pro 21. století*. [online]. © 2002. [cit. 2006-04-10]. Ústav molekulární genetiky AVČR a VŠCHT Praha. Dostupné z: <<http://mujweb.cz/Veda/gy%2Dchemie/NEWS.htm>>

PADHUKASAHASRAM, B., MARJORAM, P., NORDBORG, M. *Estimating the rate of gene conversion on human chromosome 21*. [online]. © 2004. [cit. 2006-04-10]. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=pubmed&dopt=Abstract&list_uids=15250027&itool=iconpmc&query_hl=13&itool=pubmed_docsum>

PAZDERA, J. *Matkou psů dingo byla fena čínského domestikovaného psa*. [online].

© 2004. [cit. 2006-04-10].

Dostupné z: <<http://www.osel.cz/index.php?clanek=866>>

Pes a dárcovství krve. [online]. © 2005. [cit. 2006-04-10]. Dostupné z:

<<http://www.hafbezobav.cz/view.php?cisloclanku=2005021703>>

PETR, J. *Mikrosatelity – tajemné koktání genů*. *Věda, technika a my*, 6, 1999. s. 42–43.

PETR, J. *Genetické tajemství psích plemen*. [online]. © 2004. [cit. 2006-04-02].

Dostupné z: <<http://www.osel.cz/index.php?obsah=6&clanek=765>>

PETR, J. *Muž a jeho pes*. [online]. © 2003. [cit. 2006-04-15].

Dostupné z: <<http://www.osel.cz/index.php?clanek=409>>

Porovnání tzv. "krevních testů" a DNA testů k určení otcovství. [online]. © 2004. [cit.

2006-04-10].

Dostupné z: <http://www.generi-biotech.com/DNA_testy/porovnaní.htm>

Principle of the PCR. [online]. © 1999. Poslední revize 8. 11. 1999, [cit. 2006-04-25].

Dostupné z: <<http://users.ugent.be/~avierstr/principles/pcr.html>>

REETZ, J., SCHNEIDER, P., GIESE, W. *Das Serum-Transferrin-System beim Hund: Ein 4 – Allele. System?*. *Dtsch. Tierarzth. Wschr.* 83, 1976. s. 377–379.

SAISON, R. *Red cell peptidase in dogs, mink, pigs and cattle*. *Abstract, Anim. Blood Groups* 42. 1972.

SCHELLING, C. GAILLARD C. DOLF G. *Genetic variability of seven dog breeds based on microsatellite markers*. [online]. © 2005. [cit. 2006-04-10]. Dostupné z:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=pubmed&dopt=Abstract&list_uids=16130460&query_hl=2&itool=pubmed_docsum>

SCHMUTZ, S. M., BERRYERE, T. G. *Color Implications in Health*. [online]. © 2001. [cit. 2006-04-10]. Dostupné z: <http://www.ashgi.org/articles/color_implications.htm>

SCHRÖFFELOVÁ, D. *Můj táta? Kde je a kdo ho zná...?*. [online]. © 2001. [cit. 2006-04-10]. Svět myslivosti, ročník 2, s. 18, ISSN:1212-8430. Dostupné z: <http://www.silvarium.cz/svetmyslivosti/2001/04/clanek10_pes.html>

SIMONSEN, V. *Electrophoretic studies on the blood proteins of domestic dogs and other Canidae*. Hereditas 82, 1976. s. 7-18.

STEVENS, R. W. C., TOWNSLEY, M. E. *Canine serum transferrins*. J. Hered. 61, 1970. s. 71-73.

SVOBODOVÁ, K., HORÁK, P., DVOŘÁK, J. Analýza variability vybraných SNPs u psů. In *MendelNet'05 Agro*. Brno: MZLU v Brně, 2005. s. 1-19. ISBN 80-7157-905-X.

SVOBODOVÁ, K., HORÁK, P., DVOŘÁK, J. Meziplenná variabilita vybraných SNPs u psů. In *VI. mezinárodní konference doktorandů a pregrad. studentů "Genetika a šlechtění zvířat"*; CD-ROM. 1. vyd. Brno: MZLU v Brně, 2005, s. 160-165. ISBN 80-7157-858-4.

SWISHER, S. N., YOUNG, L. E. *The blood group systems of dogs*. Physiol. Rev. 41, 1961. s. 495-520.

ŠMARDA, J et al. *Metody molekulární biologie*. 1.vyd. Masarykova univerzita v Brně: MU, Brno-Kraví Hora, 2005. 180 s. ISBN 80-210-3841-1.

ŠTYS, P. *Morfologie milování*. [online]. © 1996. [cit. 2006-04-10]. Dostupné z:< <http://www.vesmir.cz/clanek.php3?CID=3884>>

TANABE, Y., SUGIURA, S., ASANOMA, M., OTA, K. *Genetic polymorphism of leucine aminopeptidase in canine plasma*. Anim. Blood Grps. biochem. Genet. 5, 1974. s. 225-230.

TANABE, Y., OMI, T., OTA, K. *Genetic variants of Glukose phosphate isomerase (E. C. 5.3.1.9) in canine erythrocytes*. Anim. Blood Grps. biochem. Genet. 8, 1977. s. 191-195.

TANABE, Y., OTA, K., ITO, S., HASHOIMOTO, Y., SUNG, Y. Y., RYU, J. |K., FARUQUE, M. O. *Biochemical-genetic relationships among Asian and European dogs and the ancestry of the Japanese native dogs*. Journal of Animal Breeding and Genetics 108, 1991. s. 455–478.

TOWENSLEY, M. E., KRAAY, G. STEVENS, R. W. C. *Polymorphism of canine serum albumin*. Anim. Blood Grps. biochem. Genet. 2, 1972. s. 195–199.

VRIESENDORP, H. M., WESTBROEK, D. L., DAMARO, V., van der DOES, J. A., van der STEEN, G. J., van ROOD, J. J., ALBERT, E., BERNINI, L, BULL, R. W., CABASSON, J., EBSTEIN, R. B., ERIKSON, V., FELTKAMP, T. E. W., FLAD, H. D., HAMMER, C., LANG, R., LARGIADER, F., von LORINGBOVEN, K., LOS, W., KHAN, P. M., SAISON, R. SERRON, B., SCHNAPPAUF, H., SWISHER, S. N., TEMPLETON, J. W., UHLSCHMIDT, G., ZWEIBAUM, A. *Joint of 1st International Workshop on Canine Immunogenetics*. Tissue Antigens 3, 1973. s. 145–172.

WACHTEL, H. *Chov psů v roce 2000*. 1. vyd. České Budějovice: Dona, 1998. 280 s. ISBN 80–86136–29–9.

WANG, W., AGUIRRE, G. D., RAY, K. *PCR/RFLP marker in the canine transducin- γ gene (GNGT1)*. Animal Genetics 28, 1997. s. 319–320.

WEIDEN, A. S., STORB, R., KOLB, H. J., GRAHAM, T., ANDERSON, J., GIBLETT, E. *Genetic variation of red blood cell enzymes in the dog*. Transplantation 17, 1974. s. 115–120.

WERNER, P., RADUCHA, M. G., PROCIUK, U., HENTHORN, P.S., PATTERSON, D. *Physical and linkage mapping of human chromosome 17 loci to dog chromosomes 9 and 5*. Genomics 42(1), 1997. s. 74–82.

YOUNG, L. E., CHRISTIAN, R. M., ERVIN, D. M., SWISHER, S. N., O`BRIEN, W. A., STEWART, W. B., YUILE, C. L. *Erythrocyte isoantibody reactions in dogs*. Proc. Int. Soc. Hematol., 1950. s. 226–233.

ZAJC, I., MELLERSH, C., SAMPSON, J. *Variability of canine microsatellites within and between different dog breeds*. [online]. © 1997. [cit. 2006-04-10]. *Mammalian Genome* 8, s. 182–185. Dostupné z:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&list_uids=9069118&dopt=Citation>

ZAJC, I. SAMPSON, J. *DNA microsatellites in domesticated dogs: application in paternity disputes*. [online]. © 1996. [cit. 2006-04-10]. Dostupné z:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&list_uids=8739334&dopt=Abstract>

ZAJC, I. SAMPSON, J. *Utility of canine microsatellites in revealing the relationships of pure bred dogs*. [online]. ©1999. [cit. 2006-04-10]. *Journal of heredity* 90 (1), s. 104–107.

Dostupné z: <http://www.garfield.library.upenn.edu/histcomp/cavallisforza_all_auth-citing/index-lcs-42.html>

Zákon č. 154/2000 Sb., o šlechtění, plemenitbě a evidenci hospodářských zvířat (plemenářský zákon).