

VARIABILITY OF SELECTED SNPs IN SEVERAL CANINE BREEDS

ANALÝZA VARIABILITY VYBRANÝCH SNPs U PSŮ

Svobodová K., Horák P., Dvořák J.

Ústav morfologie, fyziologie a genetiky zvířat, Agronomická fakulta, Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, Zemědělská 1, 613 00 Brno, Česká republika.

E-mail: xsvobo21@node.mendelu.cz, dvorakJ@mendelu.cz

ABSTRACT

The aim of the study was to determine a variability of selected SNPs and to evaluate a suitability of their inclusion in the SNPs panel for parentage verification. Moreover, genetic distance and genetic identity between investigated breeds were estimated. The variability of the SNPs in the beta A3/A1 crystallin (*CRYB*) gene, the KIT ligand (*KITLG*) gene, the transducin- γ (*GNGT1*) gene and the tyrosine-related protein (*TYRPI*) gene was evaluated in following breeds – American Cocker Spaniel, English Cocker Spaniel, Dachshund, Poodle and German Shepherd. The variability of investigated markers was evaluated by means of PIC (polymorphic information content), theoretical heterozygosity (tH), and probability exclusion (PE1, PE2, PE3). The highest level of variability was determined in the *CRYB* gene. The lowest genetic distance was found between Dachshund and English Cocker Spaniel and the highest distance was observed between German Shepherd and American Cocker Spaniel. The dendrogram indicated genetic identity of American Cocker Spaniel, English Cocker Spaniel, Dachshund, Poodle and segregation of German Shepherd from those four breeds. The obtained results brought new information about variability of specific single nucleotide polymorphisms in several breeds of dogs. The SNPs in the *CRYB* gene showed sufficient rate of variability for its inclusion in the SNPs-panel for parentage verification.

Keywords: dog, polymorphism, SNP, *CRYB*, *KITLG*, *GNGT1*, *TYRPI*

ABSTRAKT

Hlavním cílem práce bylo určit variabilitu vybraných SNPs a zhodnotit vhodnost zařazení těchto SNPs do panelu pro ověřování původu. Navíc byla odhadnuta genetická vzdálenost a genetická identita mezi zkoumanými plemeny. Variabilita SNPs v beta A3/A1 crystallin genu (*CRYB*), KIT ligand genu (*KITLG*), transducin- γ genu (*GNGT1*) a tyrosine-related protein genu (*TYRPI*) byla hodnocena u plemen americký kokršpaněl, anglický kokršpaněl, jezevčík, pudl a německý ovčák. Variabilita zkoumaných markerů byla hodnocena pomocí PIC (polymorfni informační obsah), teoretické heterozygotnosti (tH), a pravděpodobnosti vyloučení (PE1, PE2, PE3). Nejvyšší variabilita byla stanovena u genu *CRYB*. Nejnižší genetická vzdálenost byla nalezena mezi jezevčíkem a anglická kokršpaněl a nejvyšší vzdálenost byla pozorována mezi německým ovčákem a americkým kokršpanělem. Dendrogram znázorňuje genetickou identitu mezi americkým kokršpanělem, anglickým

kokršpanělem, jezevčíkem a pudlem a odděluje od těchto čtyř plemen německého ovčáka. Získané výsledky přináší nové znalosti o variabilitě specifických jednonukleotidových polymorfizmů u několika plemen psů. Pouze u genu *CRYB* byla prokázána dostatečná variabilita pro zahrnutí do SNPs-panelu pro ověřování původu.

Klíčová slova: pes, polymorfizmus, SNP, *CRYB*, *KITLG*, *GNGT1*, *TYRP1*

ÚVOD

Metody molekulární genetiky přinášejí v dnešní době možnosti snadné individuální identifikace a ověřování rodičovství.

Zatímco u některých druhů a kategorií hospodářských zvířat je stanovení genetického typu a ověřování původu nařízeno zákonem č. 154/2000 Sb., u psů je to vyžadováno chovatelskými kluby pouze u některých plemen.

V České republice je v chovu jednotlivých plemen psů značně rozdílná situace. Původní metoda ověřování původu pomocí detekce polymorfních systémů krve je stále ještě používána například u plemene hovawart. U většiny ostatních plemen, pokud je ověřování původu vůbec prováděno, je testování založeno na variabilitě mikrosatelitních sekvencí. Žádný obecně uznávaný a široce využívaný panel mikrosatelitů pro ověřování původu u psů však v současné době neexistuje.

V budoucnu se očekává rozsáhlé využívání jednonukleotidových mutací DNA tzv. SNPs (Single Nucleotide Polymorphism). Jejich podstatou je změna sekvence DNA vznikající delecí, substitucí, inverzí nebo inzercí jednoho nukleotidu. Tyto záměny se vyskytují v kódujících i nekódujících oblastech savčího genomu s četností 1 SNP na 50 – 500 bp.

Předpokládá se, že jednonukleotidové mutace postupně nahradí mikrosatelity při jedinečné identifikaci jedinců a ověřování rodičovství zvířat. Uvažuje se, že pro tyto účely bude prováděna automatizovaná (např. microarray) detekce panelu cca 40 – 50 jednonukleotidových polymorfizmů. Při sestavování uvedeného panelu SNPs je třeba především zohlednit umístění jednotlivých lokusů na odlišných chromozomech, jejich obdobnou variabilitu v různých populacích, selekční neutralitu, vyrovnanou četnost alel atd.

Cílem naší práce bylo na základě literárních údajů vybrat vhodné SNPs a na referenčním souboru zvířat ověřit jejich variabilitu u různých plemen psů. Dalším cílem bylo stanovit genetickou shodu a genetickou vzdálenost mezi jednotlivými plemeny psů.

Za tímto účelem byly zvoleny:

Beta-A3/A1-crystallin gen (*CRYB*)

U myši je beta-A3/A1-crystallin gen lokalizován na druhém chromozomu (GRIFFIN and MUGGLETON-HARRIS, 1992). Lidský *CRYB* gen je lokalizován na chromozomu 17q

(WERNER et al., 1997). U člověka jsou mutace v *CRYB* genu charakteristické pro některé postnatální progresivní katarakty (GRAW and LOSTER, 2003).

U psa byl beta-A3/A1-crystallin gen vazbově zmapován na 9. chromozom (WERNER et al., 1997).

KIT ligand (*KITLG*)

KIT ligand byl dříve také známý jako mast cell growth factor (růstový faktor žírných buněk – MGF). Mutace v KIT ligand genu je zodpovědná za takzvanou "ocelovou" barvu u myši a za takzvané "grošování" u skotu. U obou, myši i skotu, jsou někteří homozygotní jedinci neplodní. Žírné buňky jsou tedy důležité i v imunologických funkcích (SCHMUTZ and BERRYERE, 2003). U skotu je navíc mutace v *KITLG* genu asociována s vývojovými anomáliemi Mülerových kanálků (také známými jako syndrom bílých jalovic) se složitou, mnohofaktoriální dědičností. Společný účinek genového zdvojení a mutace v *KIT* genu způsobuje převládající plášťově bílou barvu u prasat. Nicméně tyto mutace mají pleiotropický efekt na hematopoézu a lokusy se chovají jako QTL, které ovlivňují počet červených a bílých krvinek (ANDERSSON and GEORGES, 2004).

Gen *KITLG* je u psa lokalizován na chromozomu číslo 15 (SCHMUTZ and BERRYERE, 2005).

Transducin-gama gen (*GNGT1*)

U člověka kóduje *GNGT1* podjednotku (gamma1) rodiny heterotrimerických G-proteinů, která je specifická pro tyčinky. *GNGT1* gen je umístěn v lidském chromozomu 7q21.3 (SCHERER et al., 1996). Podobná místa sestřihu intronů jako *GNGT1* má G gama c gen (*GNGT2*), který je lokalizován na lidském chromozomu 17q21. Protein kódovaný genem *GNGT2* je exprimován specificky v čípcích sítnice (ONG et al., 1997).

Umístění psího *GNGT1* genu je neznámé (WANG et al., 1997).

Gen tyrosinase-related protein 1 (*TYRPI*)

U myši je tento gen lokalizován na chromozomu 4 a je také nazýván B lokus (RINCHIK et al., 1994). U skotu se *TYRPI* nachází na chromozomu 8 (SCHIMPF et al., 1999) a u koně na chromozomu 23 (RIEDER, 1999). Nedávné studie u koní neprokázaly žádné mutace v *TYRPI*, které by měly vztah k určité barvě srsti (RIEDER et al., 2001). U člověka je *TYRPI* lokalizovaný na 9. chromozomu (BOX et al., 1998), zakódovaný v 7 exonech rozprostřených přes 24 kb genomické DNA (STURM et al., 1995) a má vztah k nemetastázovému fenotypu tumoru prsu (WANG-RODRIGUEZ et al., 2003). Analýza 100 Kavkazanů s různými barvami vlasů neodhalila žádné změny v sekvenci aminokyselin v TYRPI (BOX et al., 1998).

TYRPI byl vazbově zmapován na 11. psí chromozom s SNP v 7. exonu. V porovnání s *TYRPI* geny pěti dalších savčích druhů bylo odhadnuto, že psí gen kóduje 538 aminokyselin dlouhý protein. Je zřejmé, že hnědá barva srsti je výsledkem recesivního genotypu v *TYRPI*. Mutace v *TYRPI* však není asociována s odstíny barvy srsti u psů, kteří jsou homozygotní pro celou délku *MC1R*. *TYRPI* také ovlivňuje společně s jinými geny barvu nosu a často i barvu šlapky (SCHMUTZ et al., 2002).

MATERIÁL A METODY

Referenční populace je tvořena celkem 50 jedinci z pěti různých plemen. Jedná se o 6 jezevčíků, 5 jedinců amerických kokršpanělů, 8 německých ovčáků, 19 zástupců plemene pudl a 12 anglických kokršpanělů.

Pro amplifikaci specifických úseků jednotlivých genů pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR) bylo použito následujících primerů:

- 1) gen *CRYB* (SHIBUYA et al., 1995):
F 5'-GTTTCCCCCTCTTAAATATTTCTCCATG- 3'
R 5'- TGAGATGGAGCTCCGCACTCAGTGGG- 3'
- 2) gen *KITLG* (SCHMUTZ et al., 2003):
F 5'-GCCTCAAATTCCATTGAAGATTCC-3'
R 5'-TTATTTTCATTATCCTCTTCATTAATCTG-3'
- 3) gen *GNGT1* (WANG et al., 1997):
F 5'-GAT GAC CAA AAA TTA GTA CTG TC – 3'
R 5'- GTC TCC AAA TGT TGT GAA GAA GT- 3'
- 4) gen *TYRPI* (SCHMUTZ et al., 2002):
F 5'-ACC AAT GGT GCA ACG TCT TCC TGA ACC G -3'
R 5'-GCC TTC CAC TGT GTT TCG GAA ACT G-3'

PCR byla prováděna na teplotním cykleru PTC-100TM (fy MJ Research. Inc.). Složení reakční směsi bylo následující:

- 1) gen *CRYB* (celk. objem 25 μ l) - 5 μ l deionizované vody, 5 μ l lyzátu DNA, 9,3 μ l deion. H₂O, 2,5 μ l 10 x PCR Buffer bez MgCl₂ (100mM Tris-HCl (pH 8,8 při 25 °C), 500 mM KCl, 0,8% Nonidet P40, Fermentas, Vilnius, Litva), 800 μ M dNTP (Fermentas, Vilnius, Litva), po 0,5 μ l obou primerů (10 pmol/ μ l), 0,13 μ l Taq DNA Polymerase recombinant (5 U/ μ l, Fermentas, Vilnius, Litva) a 2 μ l MgCl₂ (25 mM)
- 2) gen *KITLG* (celk. objem 15 μ l) - 4 μ l deionizované vody, 1 μ l lyzátu DNA, 4,9 μ l deion. H₂O, 1,5 μ l 10 x PCR Buffer bez MgCl₂ (100 mM Tris-HCl (pH 8,8 při 25 °C), 500 mM KCl, 0,8% Nonidet P40, Fermentas, Vilnius, Litva), 800 μ M dNTP (Fermentas, Vilnius, Litva), po 1 μ l obou primerů (10 pmol/ μ l), 0,1 μ l Taq DNA Polymerase recombinant (5 U/ μ l, Fermentas, Vilnius, Litva) a 1,2 μ l MgCl₂ (25 mM)

- 3) gen *GNGT1* (celk. objem 25 μ l) - 7 μ l deionizované vody, 3 μ l lyzátu DNA, 7,87 μ l deion. H₂O, 2,5 μ l 10 x PCR Buffer bez MgCl₂ (100mM Tris-HCl (pH 8,8 při 25 °C), 500mM KCl, 0,8% Nonidet P40, Fermentas, Vilnius, Litva), 800 μ M dNTP (Fermentas, Vilnius, Litva), po 1 μ l obou primerů (10 pmol/ μ l), 0,13 μ l Taq DNA Polymerase recombinant (5 U/ μ l, Fermentas, Vilnius, Litva) a 2 μ l MgCl₂ (25 mM)
- 4) gen *TYRPI* (celk. objem 15 μ l) - 4 μ l deionizované vody, 1 μ l lyzátu DNA, 5,2 μ l deion. H₂O, 1,5 μ l 10 x PCR Buffer bez MgCl₂ (100mM Tris-HCl (pH 8,8 při 25 °C), 500mM KCl, 0,8% Nonidet P40, Fermentas, Vilnius, Litva), 800 μ M dNTP (Fermentas, Vilnius, Litva), po 1 μ l obou primerů (10 pmol/ μ l), 0,1 μ l Taq DNA Polymerase recombinant (5 U/ μ l, Fermentas, Vilnius, Litva) a 0,9 μ l MgCl₂ (25 mM)

Teplotní profil PCR byl dodržen přesně dle původních metodik jednotlivých autorů:

- 1) gen *CRYB* (SHIBUYA et al., 1995): počáteční denaturace 94 °C / 3 min., 36 cyklů - denaturace 94 °C / 1 min., annealing 47 °C / 90 s, elongace 72 °C / 1 min., závěrečná elongace 72 °C / 10 min.
- 2) gen *KITLG* (SCHMUTZ et al., 2003): počáteční denaturace 94 °C / 4 min., 30 cyklů - denaturace 94 °C / 50 s, annealing 53 °C / 50 s, elongace 72 °C / 50 s, závěrečná elongace 72 °C / 4 min.
- 3) gen *GNGT1* (WANG et al., 1997): počáteční denaturace 94 °C / 3 min., 30 cyklů - denaturace 94 °C / 1 min., annealing 56 °C / 1 min, elongace 72 °C / 1 min., závěrečná elongace 72 °C / 10 min.
- 4) gen *TYRPI* (SCHMUTZ et al., 2002): počáteční denaturace 94 °C / 4 min., 30 cyklů - denaturace 94 °C / 50 s, annealing 57 °C / 50 s, elongace 72 °C / 50 s, závěrečná elongace 72 °C / 4 min.

Štěpení PCR-produktů genů *CRYB*, *GNGT1* a *TYRPI* příslušnými restrikčními endonukleázami probíhalo při teplotě 37 °C po dobu 3 hod. při níže uvedeném složení restrikční směsi:

- 1) gen *CRYB*: 20 μ l PCR-produktu, 2,6 μ l deionizované vody, 2 μ l pufru NEB4 a 0,4 μ l restrikční endonukleázy *NcoI* (New England Biolabs)
- 2) gen *GNGT1*: 10 μ l PCR-produktu, 3,4 μ l deionizované vody, 1,5 μ l pufru NEB2, 0,1 μ l restrikční endonukleázy *XmnI* (New England Biolabs)
- 3) gen *TYRPI*: 5 μ l PCR-produktu, 3,9 μ l deionizované vody, 1 μ l pufru G+, 0,1 μ l restrikční endonukleázy *MnII* (Fermentas, Vilnius, Litva)

PCR-produkt genu *KITLG* byl štěpen při teplotě 65 °C po dobu 3 hod. restrikční směsí o následujícím složení: 10 μ l PCR produktu, 3,1 μ l deionizované vody, 1,5 μ l pufru TaqI+ a 0,4 μ l endonukleázy – *TaqI* (Fermentas, Vilnius, Litva)

Separace jednotlivých fragmentů byla prováděna na 4–4,5% (dle očekávané délky fragmentů) agarosovém gelu (Agarosa 3:1) s přidavkem ethidium bromidu při 100–120 V po dobu 20–40 minut. Po vizualizaci pod UV-světlem byly odečteny jednotlivé genotypy.

Odečítání genotypů v jednotlivých polymorfních místech bylo prováděno dle následujícího klíče:

- 1) gen *CRYB*: 165 bp dlouhý PCR – produkt je štěpen na fragmenty 141 bp a 24 bp (alela *G*) či zůstává neštěpen (alela *T*)
- 2) gen *KITLG*: 788 bp dlouhý PCR – produkt je stabilně štěpen na dva fragmenty o délce 247 bp a 541 bp, delší z fragmentů obsahuje polymorfní restrikční místo tzn. je v případě přítomnosti mutace štěpen na fragmenty 473 bp a 68 bp (alela *G*), neštěpená alela je označována jako *A*
- 3) gen *GNGT1*: 181 bp dlouhý PCR – produkt je štěpen na fragmenty 138 bp a 51 bp (alela *B*) či zůstává neštěpen (alela *A*)
- 4) gen *TYRPI*: 121 bp dlouhý PCR – produkt je štěpen na fragmenty 73 bp a 48 bp (alela *N*) či zůstává neštěpen (alela *D*)

Frekvence jednotlivých genotypů byly vypočteny ze zjištěných absolutních hodnot jako prosté procentické zastoupení.

Četnosti výskytu alel byly vypočteny pomocí vzorců dle HRUBAN et al. (2000).

Skutečná i očekávaná heterozygotnost sledované populace byla vypočtena podle RELICHOVÁ (1997).

Polymorfní informační obsah (PIC) byl stanoven dle BOTSTEIN et al. (1980) a pravděpodobnost vyloučení rodičovství (PE) dle JAMIESON and TAYLOR (1997).

Pro výpočet genetických vzdáleností byl použit program Popgene, verze 1.31 (YEH et al., 1997). Genetická vzdálenost a identita byla odhadnuta dle Nei's (1972) a Nei's (1978).

Vyhotovení dendrogramu je založeno na použití Nei's genetických vzdáleností UPGMA. Tento program je převzat z programu NEIGHBOR PHYLIP verze 3.5c. Nákres je proveden pro skupiny nebo složené populace (clustry).

VÝSLEDKY A DISKUSE

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 (viz. Tab. 1).

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* (viz. Tab. 3).

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* (viz. Tab. 5). Tyto výsledky korespondují s WANG et al. (1997), kteří také uvádějí velmi vysoké zastoupení (0,906) alely *A*.

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 (viz. Tab. 7).

Pravděpodobnost vyloučení rodičovství je u všech SNP nízká (viz. Tab. 2, 4, 6 a 8). Celkově je nejvyšší u lokusu *CRYB*, kde však nepřekročí hodnotu 0,3.

Tab. 1: Frekvence genotypů a alel genu *CRYB* u sledovaných plemen psů

plemeno	n	Frekvence genotypů			H _o	Frekvence alel	
		GG	TG	TT		G	T
jezevčík	6	0,50	0,50	0	0,50	0,750	0,250
americký kokršpaněl	5	0,20	0,40	0,40	0,40	0,40	0,60
německý ovčák	8	0	0,625	0,375	0,625	0,313	0,688
Pudl	19	0,053	0,368	0,579	0,368	0,237	0,763
anglický kokršpaněl	12	0,50	0,167	0,333	0,167	0,583	0,417
Celkem	50	0,220	0,380	0,40	0,380	0,410	0,590

Tab. 2: Vybrané statistické charakteristiky genu *CRYB* u sledovaných plemen psů

plemeno	PIC	H _e	PE 1	PE 2	PE 3
jezevčík	0,305	0,375	0,152	0,070	0,239
americký kokršpaněl	0,365	0,480	0,182	0,115	0,275
německý ovčák	0,337	0,430	0,169	0,092	0,258
pudl	0,296	0,361	0,148	0,065	0,234
anglický kokršpaněl	0,368	0,486	0,184	0,118	0,277
celkem	0,367	0,484	0,183	0,117	0,276

Tab. 3: Frekvence genotypů a alel genu *KITLG* u sledovaných plemen psů

plemeno	n	Frekvence genotypů			H _o	Frekvence alel	
		AA	AG	GG		A	G
jezevčík	6	0	0,50	0,50	0,50	0,250	0,750
americký kokršpaněl	5	0	0	1,0	0	0	1,0
německý ovčák	8	1,0	0	0	0	1,0	0
Pudl	19	0,053	0,263	0,684	0,263	0,184	0,816
anglický kokršpaněl	12	0	0,583	0,417	0,583	0,292	0,708
Celkem	50	0,180	0,30	0,520	0,30	0,330	0,670

Tab. 4: Vybrané statistické charakteristiky genu KITLG u sledovaných plemen psů

plemeno	PIC	H _e	PE 1	PE 2	PE 3
jezevčík	0,305	0,375	0,152	0,070	0,239
americký kokršpaněl	0	0	0	0	0
německý ovčák	0	0	0	0	0
pudl	0,255	0,301	0,128	0,045	0,208
anglický kokršpaněl	0,328	0,413	0,164	0,085	0,253
celkem	0,344	0,442	0,172	0,098	0,263

Tab. 5: Frekvence genotypů a alel genu GNGT1 u sledovaných plemen psů

plemeno	n	Frekvence genotypů			H _o	Frekvence alel	
		AA	AB	BB		A	B
jezevčík	6	1,0	0	0	0	1,0	0
americký kokršpaněl	5	0,40	0,60	0	0,60	0,70	0,30
německý ovčák	8	1,0	0	0	0	1,0	0
pudl	19	0,895	0,105	0	0,105	0,947	0,053
anglický kokršpaněl	12	1,0	0	0	0	1,0	0
celkem	50	0,9	0,1	0	0,10	0,950	0,050

Tab. 6: Vybrané statistické charakteristiky genu GNGT1 u sledovaných plemen psů

plemeno	PIC	H _e	PE 1	PE 2	PE 3
jezevčík	0	0	0	0	0
americký kokršpaněl	0,332	0,420	0,166	0,088	0,255
německý ovčák	0	0	0	0	0
pudl	0,095	0,100	0,047	0,005	0,088
anglický kokršpaněl	0	0	0	0	0
celkem	0,090	0,095	0,045	0,005	0,084

Tab. 7: Frekvence genotypů a alel genu TYRP1 u sledovaných plemen psů

plemeno	n	Frekvence genotypů			H _o	Frekvence alel	
		NN	ND	DD		N	D
jezevčík	6	1,0	0	0	0	1,0	0
americký kokršpaněl	5	1,0	0	0	0	1,0	0
německý ovčák	8	1,0	0	0	0	1,0	0
pudl	19	1,0	0	0	0	1,0	0
anglický kokršpaněl	12	0,917	0,083	0	0,083	0,958	0,042
celkem	50	0,98	0,02	0	0,020	0,990	0,010

Tab. 8: Vybrané statistické charakteristiky genu TYRP1 u sledovaných plemen psů

plemeno	PIC	H _e	PE 1	PE 2	PE 3
jezevčík	0	0	0	0	0
americký kokršpaněl	0	0	0	0	0
německý ovčák	0	0	0	0	0
pudl	0	0	0	0	0
anglický kokršpaněl	0,141	0,153	0,071	0,012	0,126
celkem	0,020	0,020	0,010	0	0,019

Genetická shoda a genetická vzdálenost sledovaných plemen

Největší genetická shoda byla vypočtena pro plemena jezevčík a anglický kokršpaněl (0,9907). Druhá největší podobnost (0,9618) je mezi plemeny americký kokršpaněl a pudl a třetí (0,9571) mezi anglickým kokršpanělem a pudlem. Teprve čtvrtá nejvyšší hodnota (0,9313) je stanovena pro amerického a anglického kokršpaněla. Tyto výsledky jsou v rozporu s RÄBREM (1995), který uvádí, že americký kokršpaněl byl zřejmě vyšlechtěn z anglického bez přikřížení jiných plemen. Téměř stejně velká genetická shoda je mezi plemeny jezevčík a pudl a plemeny jezevčík a americký kokršpaněl, a to 0,9166 respektive 0,9136. Nejvzdálenější od ostatních plemen je německý ovčák. Největší podobnost má s anglickým kokršpanělem (0,8279), dále s pudlem (0,8030), menší už s jezevčíkem (0,7798) a nejmenší genetická shoda byla vypočtena mezi německým ovčákem a americkým kokršpanělem (0,6726). Kompletní výsledky genetické shody a vzdálenosti znázorňuje tabulka 9.

Jednu z nejrozsáhlejších studií provedli TANABE et al. (1991), kteří zkoumali 2959 jedinců 40 různých asijských a evropských plemen. Mezi nimi byla i čtyři z námi testovaných plemen, a to německý ovčák (76 jedinců), anglický kokršpaněl (19 jedinců), jezevčík (17 jedinců) a pudl (15 jedinců). TANABE et al. (1991) testovali 14 polymorfizmů proteinů a zjistili, že největší genetickou podobnost má jezevčík a pudl (0,951), dále jezevčík a kokršpaněl (0,950), následoval německý ovčák a jezevčík (0,945), kokršpaněl a pudl (0,935), německý ovčák a pudl (0,931) a nejméně podobní si podle nich byli německý ovčák a kokršpaněl (0,914). Přestože tyto výsledky zcela nekorespondují s našimi, je z nich patrná vzájemná genetická podobnost jezevčíka, pudla a kokršpaněla a výrazné oddělení německého ovčáka od těchto plemen.

Tab. 9. Genetická shoda a genetická vzdálenost podle Nei's (1972)

Populace	1	2	3	4	5
1		0,9136	0,7798	0,9166	0,9907
2	0,0903		0,6726	0,9618	0,9313
3	0,2487	0,3967		0,8030	0,8279
4	0,0870	0,0389	0,2194		0,9571
5	0,0093	0,0711	0,1889	0,0439	

Pozn.: pop. 1 = jezevčík; pop. 2 = am. kokr; pop. 3 = něm. ovčák; pop. 4 = pudl; pop. 5 = angl. kokr

V tabulce 10 jsou uvedeny hodnoty genetické shody a genetické vzdálenosti mezi jednotlivými plemeny podle novějšího zpřesněného výpočtu. Výsledné hodnoty genetické shody jsou o něco vyšší, nicméně na vztazích mezi jednotlivými plemeny nic nemění.

Tab. 10. Genetická shoda a genetická vzdálenost podle Nei's (1978)

Populace	1	2	3	4	5
1		0,9254	0,7853	0,9227	0,9992
2	0,0776		0,6791	0,9708	0,9418
3	0,2418	0,3870		0,8058	0,8323
4	0,0804	0,0297	0,2159		0,9619
5	0,0008	0,0600	0,1835	0,0388	

Pozn.: pop. 1 = jezevčík; pop. 2 = am. kokr; pop. 3 = něm. ovčák; pop. 4 = pudl; pop. 5 = angl. kokr

Dendrogram

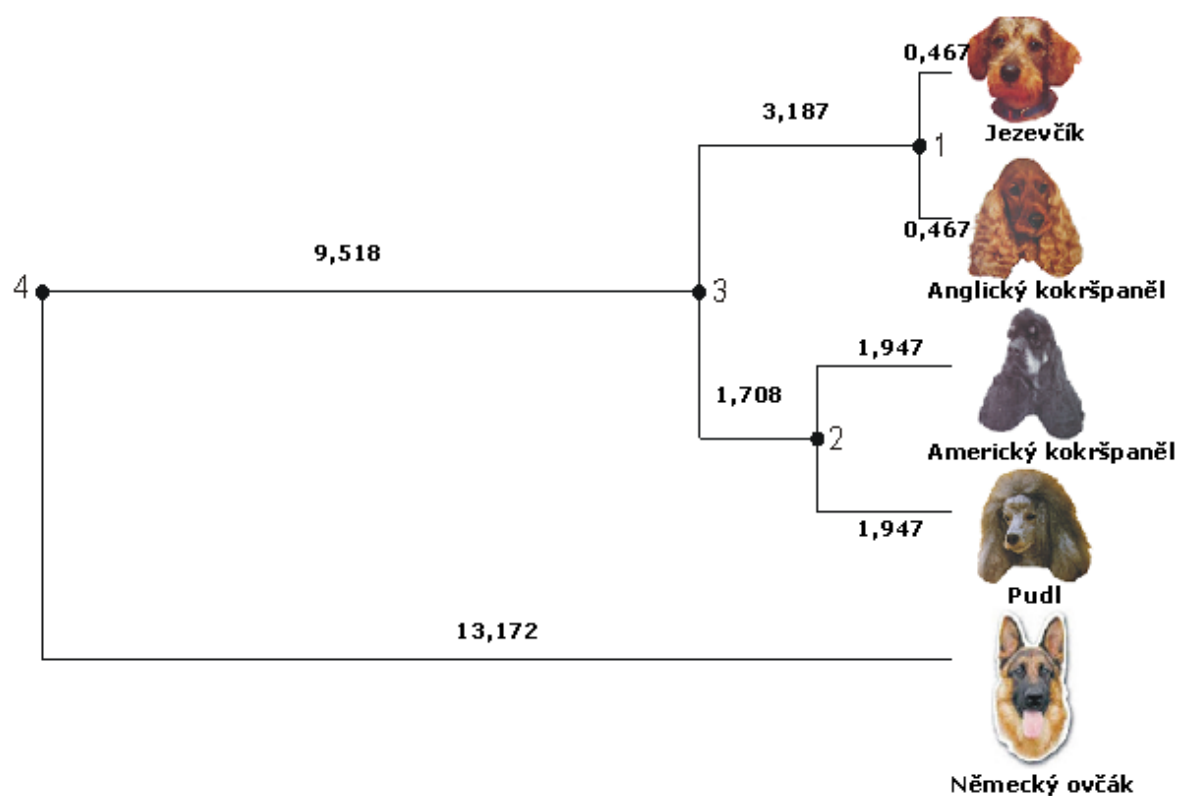
Dendrogram je grafickým znázorněním vazeb mezi jednotlivými plemeny a navíc vzdáleností mezi tzv. clustery a mezi clustery a plemeny. Clustery jsou fiktivní skupiny (body 1, 2, 3 a 4) vyjadřující hypotetickou fylogenetickou populaci, ze které se mohla jednotlivá plemena vyvinout.

Tab. 11. Hodnoty pro dendrogram podle Nei's (1972)

Skupina		Vzdálenost
I	II	
4	3	9,518
3	1	3,187
1	pop.1	0,467
1	pop.5	0,467
3	2	1,708
2	pop.2	1,947
2	pop.4	1,947
4	pop.3	13,172

Pozn.: pop. 1–5 viz výše

Obr. 1. Dendrogram podle Nei's (1972)

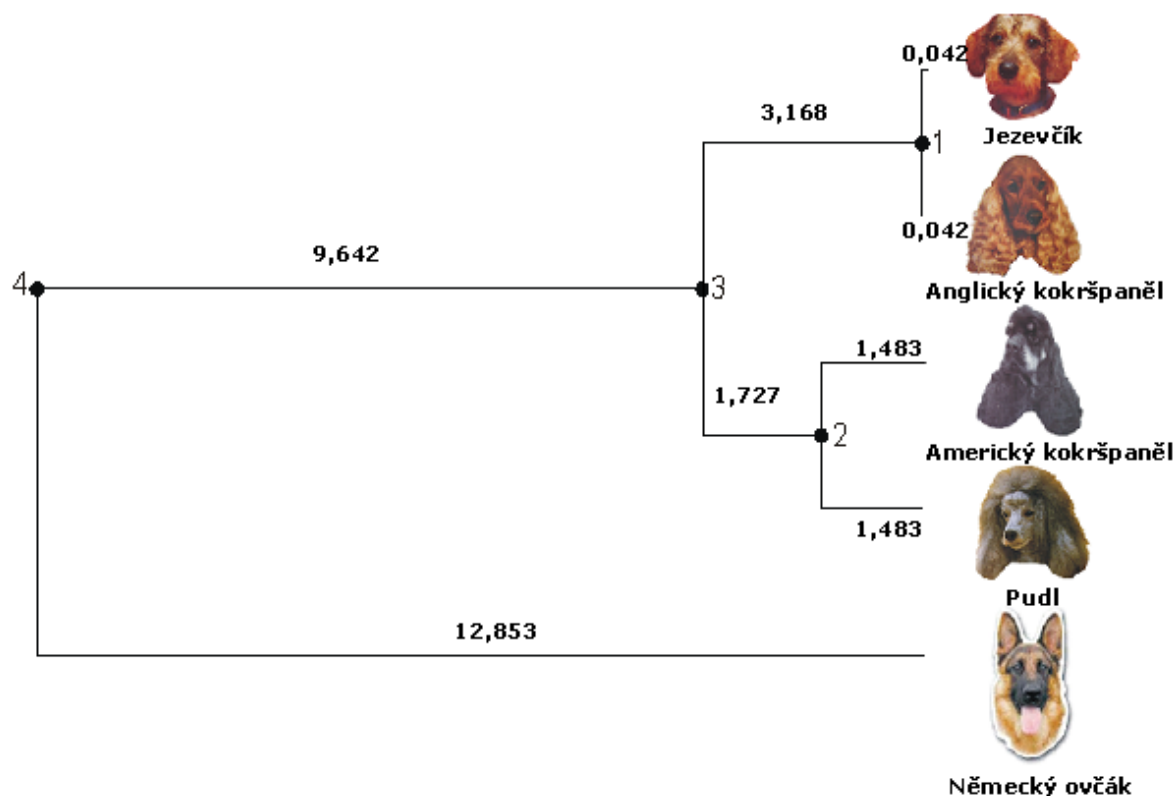


Tab. 12. Hodnoty pro dendrogram podle Nei's (1978)

Skupina		Vzdálenost
I	II	
4	3	9,642
3	1	3,168
1	pop.1	0,042
1	pop.5	0,042
3	2	1,727
2	pop.2	1,483
2	pop.4	1,483
4	pop.3	12,853

Pozn.: pop. 1–5 viz výše

Obr. 2. Dendrogram podle Nei's (1978)



Z dendrogramů je jasně patrné, že nejbližší jsou si plemena jezevčík a anglický kokršpaněl, dále pudl a americký kokršpaněl a od těchto čtyř plemen je zcela oddělen německý ovčák. Podobné výsledky uvádí i TANABE et al. (1991).

ZÁVĚR

Porovnali jsme čtyři různé SNPs genů beta-A3/A1-crystallin gen (*CRYB*), KIT ligand gen (*KITLG*), transducin-gama gen (*GNTG1*) a tyrosinase-related protein 1 gen (*TYRPI*) za účelem posouzení vhodnosti jejich zařazení do panelu pro testování rodičovství a individuální identifikaci jedince. Hodnocení bylo provedeno u pěti různých plemen – jezevčík, americký kokršpaněl, německý ovčák, pudl a anglický kokršpaněl.

Zjistili jsme, že v genu *CRYB* se vyskytovaly všechny genotypy u plemen americký kokršpaněl, pudl a anglický kokršpaněl. U jezevčíka, německého ovčáka a anglického kokršpaněla převládala alela *G*, u pudla a amerického kokršpaněla alela *T*. Celkem bylo ve sledované populaci zjištěno 41 % alely *G* a 59 % alely *T*. V genu *KITLG* byly všechny tři možné genotypy nalezeny pouze u plemene pudl. Frekvence alely *A* byla v celé populaci 0,33 a alely *G* 0,67. V genu *GNTG1* se u žádného z testovaných plemen nevyskytl genotyp *BB*. U všech plemen výrazně převládala alela *A*, které bylo v celé populaci 95 %. Nejnižší meziplemenná variabilita v rozložení četnosti genotypů a alel byla zjištěna v genu *TYRPI*. Jediný zjištěný heterozygot byl plemene anglický kokršpaněl. Všichni ostatní jedinci byli monomorfní pro alelu *N*, četnost této alely tedy byla 0,99. Všechny zjištěné genotypové

četnosti jsou u všech genů a plemen v H-W rovnováze. Na základě statistických charakteristik jsme zjistili, že očekávaná heterozygotnost ($H_{oček}$), polymorfní informační obsah (PIC) i pravděpodobnost vyloučení nesprávného rodiče (PE) jsou u genů *KITLG*, *GNGT1* a *TYRP1* nízké. Nejvyšší hodnoty byly pro všechny statistické charakteristiky vypočteny u genu *CRYB*.

Z těchto výsledků můžeme vyvodit, že námi 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.

V další části práce jsme pomocí stanovení genetické vzdálenosti a genetické shody zjistili, že největší genetickou podobnost vykazují plemena jezevčík a anglický kokršpaněl, nejmenší německý ovčák a americký kokršpaněl. Dendrogram pak znázornil genetickou podobnost plemen jezevčík, anglický kokršpaněl, pudl a americký kokršpaněl a odlišnost plemene německý ovčák od zbývajících čtyř plemen.

LITERATURA

ANDERSSON, L., GEORGES, M. (2004): *Domestic-animal genomics: deciphering the genetics of complex traits*. Nature Reviews Genetics 5 (3), s. 202–212.

BOTSTEIN, D., WHITE, R. L., SKOLNICK, M., DAVIS, R. W. (1980): Construction of genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. American Journal Human Genetics 32, s. 314–331.

BOX, N. F., WYETH, N. R., MAYNE, C. J., O'GORMAN, L. E., MARTIN, N. G., STURM, R. A. (1998): Complete sequence and polymorphism study of the human TYRP1 gene encoding tyrosinase-related protein 1. Mammalian Genome 9, s. 50–53.

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

GRIFFIN, C. S., MUGGLETON-HARRIS, A.L. (1992): Localisation of the beta crystallin CRYB gene to mouse Chromosome 2B-->C1 by in situ hybridisation, Cytogenet Cell Genetics, 61(2), s. 141–142.

HRUBAN, V., MAJZLÍK, I.: Obecná genetika (scriptum). ČZU v Praze, 2000. 316 s.

JAMIESON, A., TAILOR, C. S. (1997): Comparisons of tree probability formulae for parentage exclusion. Animal Genetics 28, s. 397–400.

ONG, O. C., HU, K., RONG, H., LEE, R. H., FUNG, B. K. (1997): Gene structure and chromosome localization of the G gamma c subunit of human cone G-protein (GNGT2). Genomics 44(1), s. 101–109.

RÄBER, H.: Encyklopedie Plemena psů. 2. díl, Ostrava 2 : Blesk, 1995. 912 s. ISBN 80-85606-79-8.

RELICHOVÁ, J.: Genetika populací (scriptum). Masarykova univerzita v Brně, Přírodovědecká fakulta, Brno, 1997, s. 19–20, ISBN 80 – 210 – 1542 X

RIEDER, S. (1999): Angewandte, vergleichende Genetik am Beispiel des Melanoms beim Pferd. Diss Naturwiss. ETH Zürich, Nr. 13071.

RIEDER, S., TAOURIT, S., MARIAT, D., LANGLOIS, B., GUÉRIN, G. (2001): Mutations in the agouti (ASIP), the extension (MC1R), and the brown (TYRP1) loci and their association to coat color phenotypes in horses (*Equus caballus*), *Mammalian Genome* 12, s. 450–455.

RINCHIK, E. M., BELL, J. A., HUNSICKER, P. R., FRIEDMAN, J. M., JACKSON, I. J., RUSSELL, L. B. (1994): Molecular genetics of the brown (b)-locus region of mouse chromosome 4. I. Origin and molecular mapping of radiation- and chemical-induced lethal brown deletions. *Genetics* 137(3), s. 845–854.

SCHERER, S. W., FEINSTEIN, D. S., OLIVEIRA, L., TSUI, L. C., PITTLER, S. J. (1996): Gene structure and chromosome localization to 7q21.3 of the human rod photoreceptor transducin gamma-subunit gene (GNGT1). *Genomics* 35(1), s. 241–243.

SCHIMPF, R. J., MOKER, J. S., BUCHANAN, F. C., SCHMUTZ, S. M. (1999): TYRP1 gene maps to chromosome 8 in cattle. *Plant and Animal Genome VII*, San Diego, CA, <<http://www.intl-pag.Org/pag/7/abstracts/pag7461.html>>

SCHMUTZ, S. M., BERRYERE, T. G. (2003): The Pigmentation Pathway. In: *Genetics of coat color in dogs*. <<http://skyway.usask.ca/~schmutz/pathway.html>>

SCHMUTZ, S. M., BERRYERE, T. G. (2005): Color Implications in Health. <http://www.ashgi.org/articles/color_implications.htm>

SCHMUTZ, S. M., BERRYERE, T. G., GOLDFINCH, A. D. (2002): TYRP1 and MC1R genotypes and their effect on coat color in dogs. *Mammalian Geonome* 13, s. 380–387.

SCHMUTZ, S. M. , BERRYERE, T. G. , SHARP, C. A. (2003): KITLG maps to canine chromosome 15 and is excluded as a candidate gene for merle in dogs. *Animal Genetics* 34, s. 75–76.

SHIBUYA, H., MRAD, D. R., COLLINS, B. K., STOY, S. J., NONNEMAN, D., JOHNSON, G. S. (1995): Two polymorphisms in the canine beta-A3/A1 crystallin gene, detectable by PCR-RFLP. *Animal Genetics* 26, s. 284–285.

STURM, R. A., O'SULLIVAN, B. J., BOX, N. F., SMITH, A. G., SMIT, S. E., PUTTICK, E. R., PARSONS, P. G., DUNN, I. S. (1995): Chromosomal structure of the human TYRP1 and TYRP2 loci and comparison of the tyrosinase-related protein gene family. *Genomics* 29(1), s. 24–34.

TANABE, Y., OTA, K., ITO, S., HASHOIMOTO, Y., SUNG, Y. Y., RYU, J. |K., FARUQUE, M. O. (1991): Biochemical-genetic relationships among Asian and European

dogs and the ancestry of the Japanese native dogs. *Journal of Animal Breeding and Genetics* 108, s. 455–478.

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

WANG-RODRIGUEZ, J., URQUIDI, V., RIVARD, A., GOODISON, S. (2003): Elevated osteopontin and thrombospondin expression identifies malignant human breast carcinoma but is not indicative of metastatic status. *Breast Cancer Research* 5(5), s. 136–43.

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

YEH, F. C., YANG, R., BOYLE, T. (1997): Popgene version 1.31, Quick User Guide, 28 s.

Přílohy

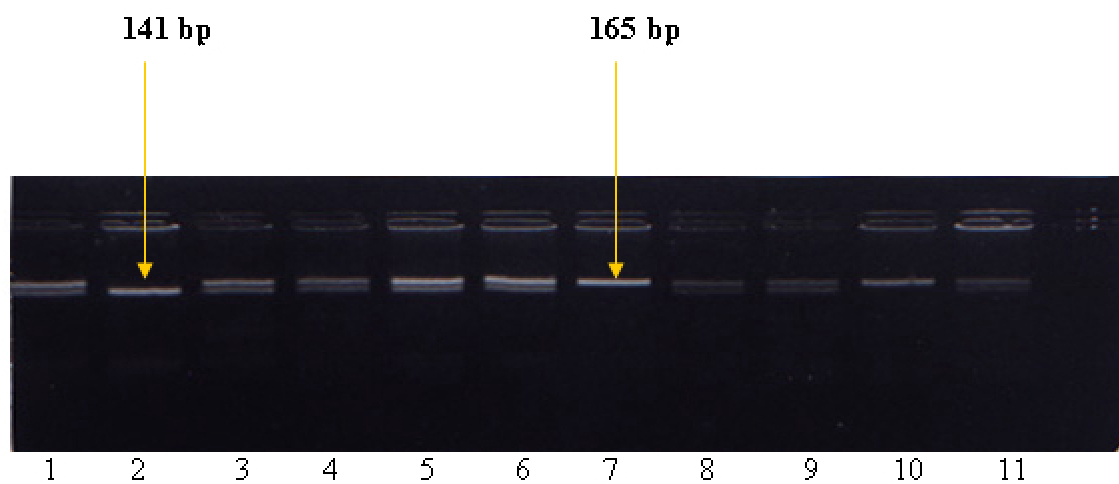
Příloha 1: Polymorfizmus délky restričních fragmentů beta-A3/A1-crystallin genu (*CRYB*)

Příloha 2: Polymorfizmus délky restričních fragmentů genu KIT ligand (*KITLG*)

Příloha 3: Polymorfizmus délky restričních fragmentů transducin-gama genu (*GNGT1*)

Příloha 4: Polymorfizmus délky restričních fragmentů tyrosinase-related protein 1 genu (*TYRP1*)

Příloha 1: Polymorfismus délky restrikčních fragmentů beta-A3/A1-crystallin genu (*CRYB*) po štěpení restrikčním enzymem *NocI*

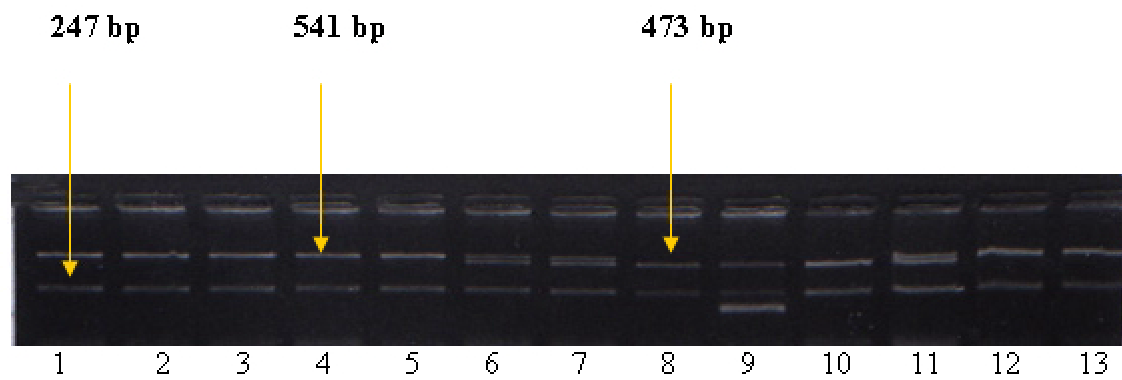


$CRYB^T / CRYB^T$ – pozice č. 7, 10

$CRYB^T / CRYB^G$ – pozice č. 1, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 11

$CRYB^G / CRYB^G$ – pozice č. 2

Příloha 2: Polymorfismus délky restrikčních fragmentů genu KIT ligand (*KITLG*) po štěpení restrikčním enzymem *TaqI*

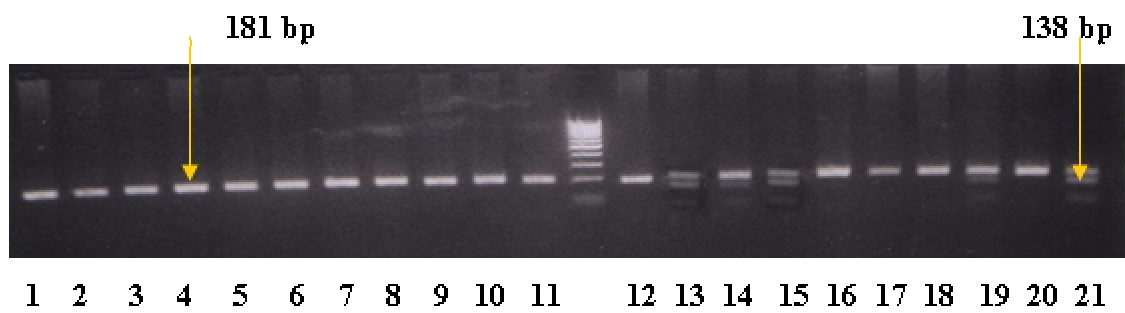


KITLG^A / KITLG^A – pozice č. 1–5, 12, 13

KITLG^A / KITLG^G – pozice č. 6, 7, 11

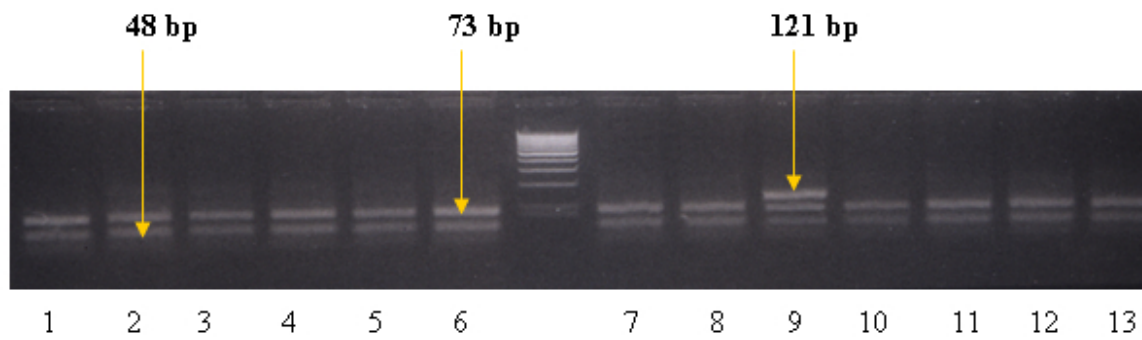
KITLG^G / KITLG^G – pozice č. 8, 9, 10

Příloha 3: Polymorfismus délky restrikčních fragmentů transducinu-gama genu (*GNGT1*) po štěpení restrikčním enzymem *XmnI*



GNGT1^A / GNGT1^A – pozice 1–12, 16–18 a 20
GNGT1^A / GNGT1^B – pozice 13–15, 21

Příloha 4: Polymorfismus délky restrikčních fragmentů tyrosinase-related protein 1 genu (*TYRPI*) po štěpení restrikčním enzymem *MnII*



TYRPI^N / *TYRPI*^N – pozice 1–8, 10–13
TYRPI^N / *TYRPI*^D – pozice 9