

**JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH**

**ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA**

**Katedra zootechnických věd**

---

Studijní program: **Zootechnika (N4103)**

Studijní obor: **Zootechnika**

# **DIPLOMOVÁ PRÁCE**

## **Analýza genů podmiňujících zbarvení velkého münsterlandského ohaře**

**Autor:** **Bc. Adéla Fryšová**

**Vedoucí práce:** **Ing. Lenka Hanusová, Ph.D.**

---

České Budějovice, 2018

**ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE**  
(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Adéla FRYŠOVÁ**  
Osobní číslo: **Z16306**  
Studijní program: **N4103 Zootechnika**  
Studijní obor: **Zootechnika**  
Název tématu: **Analýza genů podmiňujících zbarvení u velkého münsterlandského ohaře**  
Zadávací katedra: **Katedra zootechnických věd**

Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

Psi představují významnou skupinu domácích zvířat. Jsou velmi heterogenní skupinou, odlišující se vzájemně celou řadou znaků. Tyto znaky pak tvoří takzvaný standard plemene. Mezi jeden z typických znaků daného plemene patří i zbarvení srsti. To bývá podmíněno několika geny a jejich vzájemnými interakcemi.

Cílem diplomové práce je provést analýzu genů podmiňujících jednotlivé typy zbarvení u daného plemene a ověřit korelace mezi genotypy v daných genech a výsledným zbarvením jedinců v populaci.

V úvodu práce popište standard plemene se zvláštním důrazem na povolená zbarvení. Uveďte poznatky o genetickém založení jednotlivých typů zbarvení, která se u daného plemene nacházejí, a o možných interakcích mezi příslušnými geny. Zaměřte se i na principy dědičnosti jednotlivých typů zbarvení do následujících generací. V praktické části práce potom nejprve odeberte biologický materiál od jedinců daného plemene. Z biologického materiálu získajte DNA a následně proveďte genotypizaci v jednotlivých lokusech. Výsledky genotypizace použijte k výpočtu genových a alelických frekvencí v populaci. Ověřte korelace mezi genotypy v jednotlivých lokusech a výsledným zbarvením jedince. Vaše poznatky porovnejte s poznatky jiných autorů, zabývajících se podobným tématem. V závěru shrňte získané poznatky a uveďte chovatelská doporučení pro získání jedinců s doporučovaným či preferovaným zbarvením.

Rozsah grafických prací: 3 - 5 tabulek, 1 - 3 obrázky

Rozsah pracovní zprávy: 40 - 50 stran

Forma zpracování diplomové práce: tištěná/elektronická

Seznam odborné literatury:

Ostrander E., Ruvinsky A. (2012): The Genetics of the Dog. CAB International, 521 str. ISBN 978-1-84593-940-3

Schmutz S.M., Berryere T.G., Goldfinch A.D. (2002): TYRP1 and MC1R genotypes and their effects on coat color in dog. Mamm Genome, 13(7), 380-387.


Philipp U., Hamann H., Mecklenburg L., Nishino S., Mognot E., Günzel-Apel A.R., Schmutz S.M., Leeb T. (2005): Polymorphisms within the canine MLPH gene are associated with dilute coat color in dogs. BMC Genet, 16(6), 34 - 45

Vedoucí diplomové práce: Ing. Lenka Hanusová, Ph.D.


Katedra zootechnických věd

Datum zadání diplomové práce: 14. března 2017

Termín odevzdání diplomové práce: 30. dubna 2018

  
prof. Ing. Miloslav Šoch, CSc., dr. h. c.  
děkan

JIHOČESKÁ UNIVERZITA  
V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH  
ZEMĚLSKÁ FAKULTA  
studijní oddělení  
Studentská 1668, 370 05 České Budějovice

  
doc. Ing. Miroslav Maršálek, CSc.  
vedoucí katedry

V Českých Budějovicích dne 14. března 2017

**Prohlášení:**

Prohlašuji, že svoji diplomovou práci s názvem „Analýza genů podmiňujících zbarvení u velkého münsterlandského ohaře“ jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury. Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své diplomové práce, a to v nezkrácené podobě – v úpravě vzniklé vypuštěním vyznačených částí archivovaných Zemědělskou fakultou – elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

.....  
Datum

.....  
Adéla Fryšová

## **Poděkování**

Ráda bych poděkovala své vedoucí Ing. Lence Hanusové, Ph. D. za odborné vedení, cenné rady a trpělivost při tvorbě mé diplomové práce.

Dále bych chtěla poděkovat všem majitelům velkých münsterlandských ohařů za vyplnění potřebných dotazníků a poskytnutí vzorků DNA jejich svěřenců.

## **ABSTRAKT**

Cílem této diplomové práce bylo získat dostatečný počet vzorků DNA od jedinců plemene velký münsterlandský ohař a provést u nich genotypizaci nově popsané mutace c.555>G v exonu 2 genu TYRP1. V případě výskytu této mutace u námi zkoumaného plemene bylo dalším cílem práce navrhnout chovatelská opatření, která by šíření této nežádoucí mutace omezila.

V úvodu literárního přehledu je propracováno plemeno velký müsterlandský ohař, jeho historie, vznik plemene, standard s důrazem na povolená zbarvení a současný chov velkého müsterlandského ohaře v ČR. V práci jsou dále popisována jednotlivá genetická založení zbarvení a jsou zde vysvětleny principy metod, které byly ve vlastní práci použity.

Ve vlastní práci byla provedena genotypizace na mutaci v exonu 2 genu TYRP1 pomocí metod polymerázové řetězové reakce a sekvenování. Tato mutace nebyla prokázána ani u jednoho ze 113 testovaných jedinců velkého müsterlandského ohaře. Bylo také využito dostupných výsledků komerčních testů již dříve popsaných mutací v genu TYRP1, na základě kterých byly propracovány přípařovací plány jako pomůcka chovatelům, aby nedocházelo v populaci plemene ke zvyšování počtu recesivních homozygotů s nežádoucí hnědou barvou srsti nebo heterozygotů, kteří zmutovanou alelu přenášejí.

**Klíčová slova:** zbarvení, gen, TYRP1, velký münsterlandský ohař

## **SUMMARY**

The target of this thesis was to obtain a sufficient number of DNA samples from individuals Breed Large Münsterländer and they perform genotyping newly described mutation c.555> G in exon 2 of the gene TYRP1. In the case of this mutation in the breed we studied, another aim of the work was to propose breeding measures that would limit the spread of this undesirable mutation.

At the beginning of the literary overview, the breed of the great Münsterlander, his history, the breed, the standard with an emphasis on the permitted coloring and the current breeding of a large Mässlandlander in the Czech Republic. The thesis describes the individual genetic foundations of coloring and explains the principles of the methods used in their own work.

In its own work genotyping was performed on the mutation in exon 2 of the TYRP1 gene by polymerase chain reaction and sequencing methods. This mutation was not demonstrated in either of the 113 tested individuals of the Greater Münsterlander. It was also used of the available commercial tests previously described mutations in the gene TYRP1 on which were worked out plans for auxiliary mating as an aid to farmers to avoid the herd to increase the number of recessive homozygotes undesirable brown coat color or heterozygotes, who carry a mutated allele.

**Keywords:** coloring, gene, TYRP1, Great Munsterlander

# OBSAH

<b>1. ÚVOD A CÍL</b> .....	<b>10</b>
<b>2. LITERÁRNÍ PŘEHLED</b> .....	<b>12</b>
2.1 VELKÝ MÜNSTERLANDSKÝ OHAŘ .....	12
2.1.1 Historie plemene .....	12
2.1.2 Standard plemene .....	14
2.1.3 Současný chov VMO v ČR .....	17
2.2 GENETICKÉ ZALOŽENÍ JEDNOTLIVÝCH TYPŮ ZBARVENÍ .....	17
2.2.1 Agouti signální protein ( <i>agouti signal peptide; ASIP</i> ) .....	18
2.2.2 Tyrosinase related protein 1 ( <i>TYRP1</i> ) .....	19
2.2.3 Melanocortin 1 receptor ( <i>MC1R</i> ) .....	20
2.2.4 Beta – defensin 103 ( <i>CBD103</i> ) .....	21
2.2.5 Melanophilin ( <i>MLPH</i> ) .....	22
2.2.6 Progresivní šedivění .....	22
2.2.7 Merle ( <i>grošování</i> ) .....	23
2.2.8 Microphthalmia ( <i>MITF</i> ) .....	23
2.2.9 Ticking ( <i>tečkování</i> ) .....	24
2.2.10 Harlekýn .....	24
2.2.11 Albinismus .....	24
2.3 POUŽITÉ METODY .....	25
2.3.1 Izolace DNA .....	25
2.3.2 PCR ( <i>polymerase chain reaction - polymerázová řetězová reakce</i> ) .....	25
2.3.3 Sekvenování .....	27
<b>3. MATERIÁL A METODIKA</b> .....	<b>28</b>
3.1 POUŽITÝ MATERIÁL .....	28
3.2 IZOLACE DNA .....	28
3.3 PCR U EXONU 2 .....	28
3.4 SEKVENOVÁNÍ U EXONU 2 .....	29
3.5 ANALÝZA MUTACÍ V LOKUSU <i>TYRP1</i> .....	29
3.6 VÝPOČTY FREKVENCÍ .....	30
3.7 VYTVOŘENÍ PŘIPAŘOVACÍCH PLÁNŮ NA ZÁKLADĚ VÝSLEDKŮ GENOTYPIZACÍ .....	31



<b>4. VÝSLEDKY</b> .....	<b>31</b>
4.1 MUTACE V EXONU 2.....	31
4.2 MUTACE V EXONU 5 A 7.....	33
4.3 SOUHRN MUTACÍ .....	34
4.4 PŘIPAŘOVACÍ PLÁNY .....	35
<b>5. DISKUZE A ZÁVĚR</b> .....	<b>36</b>
<b><i>SEZNAM LITERATURY</i></b> .....	<b>37</b>

## 1. ÚVOD A CÍL

Zbarvení zvířat odjakživa společně s jinými znaky sloužilo jako vnější projev příslušnosti k určitému druhu, pohlaví, bojeschopnosti a v neposlední řadě jako maskování. Zbarvení je u všech zvířat velice důležité, zejména v přírodě, kde se zvířata potřebují maskovat. Maskování je důležité ať už pro predátory, tak i pro kořist. Některá zvířata, jako jsou například hadi, mají zbarvení velmi pestré, to však signalizuje pro okolí jejich jedovatost. Umělým šlechtěním vznikla rozmanitá škála zbarvení srsti psů nevhodných pro život v přírodě, ale pro potěšení lidského oka. Barva srsti psa má velký vliv na první dojem, který si na psa člověk vytvoří. Ať už si to lidé přiznají nebo ne, nakonec má při výběru nového člena rodiny velmi významný, ne-li nejdůležitější vliv právě jeho barva.

Při šlechtění psů si lidé vybírali různé barvy srsti a jejich použitím v následném chovu vznikaly různé další odstíny barev. Proto je v dnešní době jedním z hlavních plemenných znaků i barva srsti. Základní zbarvení srsti ovlivňují pigmenty eumelanin a feomelanin. Jejich zastoupení, intenzita a rozmístění je ovlivněno několika geny. V dědičnosti byla popsána hierarchie a vzájemné ovlivňování genů s podílem na zbarvení. U velkého münsterlandského ohaře (VMO) má ve zbarvení hlavní roli gen TYRP1, který u dominantních homozygotů způsobuje černé zbarvení, u heterozygotů způsobuje také černé zbarvení srsti, ale jedinec přenáší z 50 % recesivní alelu, která je u jedince zodpovědná za hnědé zbarvení srsti. Recesivní homozygot se pak projevuje hnědým zbarvením.

Protože předci německého dlouhosrstého ohaře a velkého münsterlandského ohaře byli původně jedním plemenem, tak není divu, že se v populaci VMO vyskytují v určité míře heterozygoti a mohou se tak narodit i recesivní homozygoti. Recesivní homozygoti jsou však vyřazováni z chovu, protože hnědobílé zbarvení standard nepřipouští. V budoucnu by mohl při vyšším výskytu heterozygotů pro gen TYRP1 v populaci nastat problém, že se zvýší počet narozených hnědobílých štěňat, která budou vyřazována z chovu, a populace velkého münsterlandského ohaře se bude zužovat. Genetické založení jedince v genu TYRP1 je dnes snadno komerčně testovatelné a je možné ho využít při výběru chovného páru, aby k narození nestandardních jedinců nedocházelo. Dostupné byly donedávna testy pro tři recesivní mutace vyskytující se v genu TYRP1. V roce 2017 byla však ve druhém exonu

lokusu TYRP1 popsána nová mutace způsobující hnědé zbarvení, a to u plemene australský ovčák.

Cílem této diplomové práce bylo získat dostatečný počet vzorků DNA od jedinců plemene velký münsterlandský ohař a provést u nich genotypizaci této nově popsané mutace. V případě výskytu této mutace u námi zkoumaného plemene bylo dalším cílem práce navrhnout chovatelská opatření, která by šíření této mutace omezila.

## **2. LITERÁRNÍ PŘEHLED**

### **2.1 VELKÝ MÜNSTERLANDSKÝ OHAŘ**

#### **2.1.1 Historie plemene**

Velký münsterlandský ohař (VMO) historicky pochází z „ptačích psů“, chovaných ve středověku, kteří byli cvičeni pro lov se sokolem, a z nichž se průběhem času vyvinuli slídiči a dlouhosrstí stavěči devatenáctého století. Šlo o relativně malé psy, jako dnešní španělé či křepeláci. Společně s malým münsterlandským ohařem a německým dlouhosrstým ohařem i velký münsterlandský ohař patří do rodiny německých ohařů s dlouhou srstí, s jejichž cílevědomým chovem se započalo na konci XIX. století. Německý klub dlouhosrstých ohařů v roce 1909 definitivně vyloučil z plemenitby černobíle zbarvené jedince, a tak byl v roce 1919 založen Klub pro chov čistokrevného černobílého dlouhosrstého münsterlandského ohaře, který si vzal na starost zvyšování úrovně této rasy. Po vytvoření provizorního soupisu všech zbývajících představitelů této původní dlouhosrsté rasy, pocházející z východních provincií Münsteru a Dolního Saska, započal klub s metodickým chovem velkého münsterlandského ohaře. Potomstvo, které vzešlo z páření těchto zvířat z prvotního seznamu, začalo být zapisováno do plemenné knihy velkého münsterlandského ohaře. Garantem jejího vedení je Klub velkého münsterlandského ohaře, který v současnosti tvoří osm nezávislých územních sekcí (<http://cmku.cz/>, staženo 11. 12. 2017).

Velký münsterlandský ohař je už po mnoho generací používán jako lovecký i hlídací pes na statcích a hospodářstvích ve Vestfálsku a již zmiňovaném Dolním Sasku (VORNHOLT, 1988).

V roce 1878 byl poprvé na výstavě ve Frankfurtu nad Mohanem předveden německý ohař dlouhosrstý. V květnu 1879 byla uspořádána výstava psů v Hannoveru. Při této příležitosti byly popsány plemenné atributy německého dlouhosrstého ohaře. Tím byl položen základní kámen čistokrevného systematického chovu. U hrubosrstých ohařů se tak stalo o tři roky později a u výmarských ohařů až za dvacet let (TRANKOVSKÁ, 1982).

Speciální výstava dlouhosrstých ohařů s 54 předvedenými jedinci byla uspořádána v Münsteru v roce 1890. V tomto období sdružoval chovatele a příznivce

ohařů Spolek pro chov německých ohařů založený v letech 1885 pro oblast Westfálsko-Porýní-Lippe. Předsedou spolku byl Friedrich Freiherr von Schorlemer, který se později stal spoluzakladatelem a předsedou Clubu Langhaar, prvního klubu dlouhosrstých ohařů na území Německa, založeného se sídlem ve Vestfálsku v Münsterru roku 1893. Postupem času vznikaly spolky dlouhosrstých ohařů v dalších německých zemích (SPĚVÁK, 1995).

Dlouhosrstí ohaři se vyskytovali ve dvou barevných rázech, hnědý (hnědák, hnědý bělouš nebo bílý pes s hnědými plotnami tzv. strakoš) a méně oblíbený a uznávaný černý a černobílý dlouhosrstý ohař. Černobílá varieta plemene nebyla většinou podporována. Byla důkazem křížení dlouhosrstého ohaře s anglickým setrem, gordonsetrem, ohaři typu španělů z Francie a zřejmě i novofundlandským psem. Všichni němečtí ohaři v polovině 19. století prošli křížením s anglickými ohaři (VORNHOLT, 1988).

Zpočátku byla černobílá varieta i přes sporné body tolerována v plemenné knize dlouhosrstého ohaře. Dle nového standardu plemene z roku 1908 byla však černá barva vyloučena. Tak se to praktikovalo v Clubu Langhaar. V plemenné knize Svazu chovatelů německých dlouhosrstých ohařů byla zpočátku černá a černobílá barva povolena. Dne 6. 2. 1908 vyloučil takto zbarvené jedince i tento svaz (FIALOVÁ, 2005).

Bylo to více než politováníhodné rozhodnutí. Tito psi dokonale odpovídali požadavkům soudobé lovecké praxe. Díky tomu nebylo překvapivé, že myslivečtí kynologové a chovatelé z oblasti Západního Münsteru a Dolního Saska nedopustili úplné vymýcení této vzácné krve. Našli se nadšenci, kteří dál lovíli s černobíle zbarvenými jedinci příjemného charakteru a vynikajících vlastností (VORNHOLT, 2004). Zajímavostí je, že podle Vornholta (1988) žili tito psi z převážné většiny v domě se svými pány. Pouze minimálně byli drženi striktně venku v kotci.

Psal se rok 1919 a v německém Halternu v Münsterlandu byl založen Verein für die Reinzucht des langhaarigen großen schwarz-weißen Münsterländer Vorstehhundes, v překladu Spolek pro čistokrevný chov černobílých münsterlandských ohařů. Nalezení černobílí jedinci byli zapsáni do primárního seznamu. Teprve pak mohl začít řízený chov. Dne 19. 10. 1921 byla v Halternu uspořádána výstava velkých münsterlandských ohařů, na které bylo předvedeno 22

jedinců. Původní seznam obsahoval 83 velkých münsterlandských ohařů a byl dokončen v roce 1922 otevřením plemenné knihy. Se stoupající oblibou dlouhosrstých ohařů v zahraničí byl v roce 1919 založen holandský klub Nederlandsche Verseniging Langhaar a v roce 1920 rakouský spolek Osterreichischer Klub Langhaar se sídlem v Salzburgu (TRANKOVSKÁ, 1982).

### **2.1.2 Standard plemene**

Zemí původu VMO je Německo, kde byl vyšlechtěn pro použití všestranného loveckého psa se silnou stránkou při práci po výstřelu. Datum zveřejnění oficiálního platného standardu je 13. 10. 2010. Dle klasifikace FCI se řadí do skupiny VII. – ohaři (stavěči), sekce kontinentální ohaři s pracovní zkouškou.

Celkový vzhled VMO je silné svalnaté tělo čistých linií, výraz inteligence a ušlechtilosti. Důležité proporce představuje délka těla a výška v kohoutku, které se k sobě musejí co nejvíce přibližovat. Délka těla může být zhruba o 2 centimetry větší, než kohoutková výška. Povahou a temperamentem se jedná o plemeno s výraznou předností v poslušnosti, přizpůsobivosti a v jeho osvědčených vlohách, především v práci po výstřelu. Je živý a temperamentní, aniž by však byl nervózní.

Hlava je ušlechtilá, delšího formátu, se silně vyvinutým svalstvem dolní čelisti. VMO má bystrý pohled. V obličejové části dominuje výrazná černá nosní houba. Silná a dlouhá tlama, která dobře plní svůj účel. Hřbet nosu je rovný. Pysky nejsou svěšené. Zuby jsou silné a kompletní (42 zubů) se silnými špičáky a nůžkovým skusem. Oči musí být co nejtmavší, oční víčka dobře přiléhají k oční kouli. Široké uši zavěšené dost vysoko, se zaoblenou spodní částí a dobře rámuující mozkovnu zvířete.

Krk je silný, osvalený a ušlechtilé klenutý.

Také kohoutek by měl být dobře osvalený a středně výrazný. Hřbet jedince vypadá krátce, pevně a rovně. Výrazná bedra chráněna pevným osvalením. Zád' je dlouhá a široká, svalnatá, ale také mírně spáditá. Hrud' má při pohledu zepředu široký tvar, z profilu je hrudník hluboký s výrazným předhrudím. Spodní linie se pozvolna zvedá, břicho štíhlé a napnuté, slabiny krátké a vysoké.

Ocas nesený vodorovně nebo poněkud výše. Při pohledu z boku je nasazen v prodloužené linii hřbetu, aniž by byl patrný zlom linie v místě nasazení.

Končetiny jsou správně úhlené. Přední běhy mají být rovné, silné a správně osvalené. Lopatka dobře přiléhá k žebřům. Nadprstí je pružné. Přední tlapy jsou středně dlouhé a středně klenuté s dobře sevřenými prsty, bez paspárků. Zadní běhy jsou silné, mohutně osvalené a vertikálně postavené. Koleno i hlezno správně záuhlené. Zadní tlapy bez paspárků s dobře sevřenými prsty.

Kůže má vypadat suše. Srst je typicky dlouhá, hustá a hladká, taková, jakou má mít lovecký pes. Nesmí být kudrnatá, ani otevřená. U psů i u fen musí být typická obzvlášť dlouhá hustá srst (praporce) na zadní straně předních i zadních nohou. Na ocase je rovněž dlouhá srst. Nejdelší vlajka se vyskytuje na střední části ocasu. I na uších musí být dlouhá srst (tvořící praporce), která přesahuje spodní konec uší symetricky na obou stranách. Jinak krátká srst na hlavě přiléhá. Ve zbarvení jsou tři barevné variety: bílá s černými plotnami a stříkáním, modrý bělouš nebo celočerná. Hlava musí být černá, může mít malou bílou hvězdičku nebo lysinku.

Všichni psi musí mít obě normálně vyvinutá varlata kompletně sestouplá v šourku.

Krok i klus vyjadřuje při pohledu na jedince pružnost, prostornost a pokrývá co nejvíce terénu. Cval má být pružný s razantním odrazem, vycházejícím ze zádi.

Průměrná kohoutková výška u psů má hodnotu 60 – 65 cm, u fen 58 – 63 cm. U obojího pohlaví se toleruje odchylka 2 cm přes specifikovanou výšku. Váha jedince dosahuje kolem 30 kg.

Všechny odchylky od tohoto standardu musí být považovány za vady a musí být penalizovány podle stupně jejich závažnosti a jejich vlivu na zdraví a pohodu psa a jeho schopnost vykonávat tradiční práci. Mezi takové vady patří například: příliš široká mozkovna, výrazný stop, klenutý nosní hřbet, abnormálně špičatý čenich, depigmentované skvrny, volné nebo spuštěné pysky. Dále jsou to zejména vady chrupu jako například: klešťový skus či zdvojený první třenový zub. Příliš světlé oko, viditelné červené spojivky. Uši nízko zavěšené, odstávající. Krk krátký nebo naopak dlouhý, přehnaně silný nebo slabý, viditelný lalok. Kohoutek nedostatečně vystupující či krátký. Dlouhý hřbet, pronesený nebo kapří hřbet. Bederní partie slabě osvalená, přechod v záď neharmonická, přestavěná záď. Záď krátká, úzká, sražená.

Sudovitý hrudník, úzký, mělký, chybějící předhrudí. Břicho moc vtažené nebo příliš spuštěné. Ocas nesený na stranu nebo stočený na hřbetě, ocas křivý nebo ve tvaru loveckého rohu. Strmé úhlení předních nebo zadních běhů, vybočené nebo vbočené lokty, měkké nadprstí, sbíhavé špičky, rozbíhavé špičky. Kravský nebo sudovitý postoj, úzký nebo široký postoj pánevních končetin. Tlapky kulaté (kočičí), dlouhé tlapy (zaječí), rozevřené tlapy. Krok a klus krátký, ztuhlý, skákavý, málo prostorný, těžký cval, nedostatečně razantní akce pánevních končetin.

Mezi vyřazující vady patří pes agresivní nebo bázlivý. Dále by měl být diskvalifikován každý pes jasně vykazující tělesné nebo povahové abnormality. Vyřazováni jsou i jedinci s totálně depigmentovanou nosní houbou, entropiem, ektropiem, podkusem, předkusem či chybějícím zubem. Zbarvení, které není v souladu se standardem, též vylučuje z chovu. Jelikož jde o lovecké plemeno, jsou z chovu vyřazeni i jedinci, kteří trpí strachem z výstřelu, strachem ze zvěře, kousavostí ze strachu, nedůvěřivostí vůči cizím osobám.

**Obrázek č. 1:** Velký münsterlandský ohař



foto: Bc. Adéla Fryšová



### **2.1.3 Současný chov VMO v ČR**

V České republice jsou podmínky pro uchovnění jedinců na velmi vysoké úrovni a jsou vybíráni jen velmi kvalitní jedinci. Pes musí splnit všestranné zkoušky nejméně v II. ceně nebo musí mít podzimní zkoušky v I. ceně a lesní zkoušky a zkoušky vodní práce nejméně ve II. ceně, na výstavě musí být oceněn nejhůře známkou velmi dobrá a dále musí být plnochrupý a mít vyšetření dysplazií kyčelních kloubů s nálezem maximálně C/C. Na feny jsou kladeny mírnější podmínky - musí složit nejméně podzimní zkoušky ve II. ceně. Výstavní hodnocení nejhůře známkou velmi dobrá, plnochrupost a vyšetření na dysplazii kyčelních kloubů je stejné jako u psů (<http://www.ohardlouhosrsty.cz>, staženo 2. 4. 2018).

V současné době se na seznamu chovných jedinců nachází 20 chovných psů, kteří jsou zařazeni ve 4 liniích, a 25 chovných fen. Za rok 2017 bylo vystaveno 9 doporučení ke krytí a 9 se jich i uskutečnilo. V 8 vrzích se narodilo 67 štěňat, což je 8,4 štěněte ve vrhu. Jedna fena nezabřezla. Zapsáno bylo 58 štěňat (FIALOVÁ L. 2017).

## **2.2 GENETICKÉ ZALOŽENÍ JEDNOTLIVÝCH TYPŮ ZBARVENÍ**

Dostál (2007) uvádí, že zbarvení psů je ovlivněno 10 geny, nacházející se na 10 různých lokusech. Označuje je A, B, C, D, E, G, M, P, S a T. Některé geny mají pouze dvě odlišné alely, které jsou vůči sobě dominantní nebo recesivní. Jiné geny mohou být vícealelové a vzájemně působí mezi sebou. Konečný genotyp spolu s interakcemi mezi alelami pak udává výsledné zbarvení psů.

V uvedené tabulce č. 1 je zobrazen souhrn genů dle Schmutz a Berryere (2007), kde se některé lokusy shodují s těmi, co udává Dostál (2007).

**Tabulka č. 1:** Rozdělení genů a lokusů ovlivňujících zbarvení u psů (SCHMUTZ, BERRYERE, 2007)

Gen	Lokus	Poloha	Alely	Zbarvení srsti
<b>ZÁKLADNÍ BARVY</b>				
agouti signální protein (ASIP)	A (agouti)	CFA24	$a^y$	žlutohnědá/sobolí
			$a^w$	divoký typ zbarvení
			$a^t$	black and tan, brown and tan
			a	černá
tyrosinase related protein 1 (TYRP1)	B (brown)	CFA11	B	černá
			b ( $b^s, b^d, b^c$ )	hnědá
melanocortin 1 receptor (MC1R)	E (extension)	CFA5	$E^M$	melanistická maska
			E	černá, hnědá, modrá
			e	červená, žlutá, krémová
beta-defensin 103 (CBD103)	K (black)	CFA16	$K^B$	černá, hnědá, modrá
			$k^{br}$	žíhaná
			$k^y$	exprese alely agouti, vyjadřuje možný feomelanin
<b>ŘEDÍCÍ BARVY</b>				
melanophilin (MLPH)	D (dilutes eumelanin)	CFA25	D	neředěný pigment
			d	ředěný pigment
			d2?	ředěný pigment s kožními problémy
(dominantní/recesivní)	G (progresivní šedivění)		G	postupné šednutí věkem
			g	nešedne
<b>BÍLÉ ZNAKY</b>				
(SILV) (kodominantní)	M (merle)	CFA10	M	nebarevný
			m	merle
microphthalmia asociační transkripční faktor (MITF)	S (spotting)	CFA20	S	celistvě barevný
			$s^i$	irské skvrnění
			$s^p$	strakatý
			$s^w$	bílý
(dominantní/recesivní)	T (ticking)		T	tečkování
			t	bez tečkování
	R (roan)		R	bílá
			r	barevná
(dominantní/recesivní)	H (harlekýn)		H	harlekýn, genotyp M/m nebo M/M
			h	bez harlekýn zbarvení

### 2.2.1 Agouti signální protein (agouti signal peptide; ASIP)

*Agouti signální protein* má na starosti kontrolu exprese červeného a černého pigmentu prostřednictvím interakcí s jinými geny, například s *melanocortin 1 receptorem* či *beta-defensinem 103* (DREGER, SCHMUTZ, 2011). U psů se jedná o nejkompexnější gen, který má popsán celkem 4 různé alely. Alela  $a^s$  je zodpovědná za standardní zbarvení zvířete, zatímco alela  $a^t$  je nositelem mutace pro agouti zbarvení. Mezi alelami genu *ASIP* jsou následující vztahy: alela  $a^s$  je dominantní nad všemi ostatními alelami tohoto genu. Alela  $a^y$  je recesivní k alele  $a^s$ , ale je dominantní nad alelami a,  $a^{sa}$  i  $a^t$ . Alela  $a^{sa}$  je dominantní nad alelou  $a^t$ . Alela

$a^t$  je pak recesivní ke všem ostatním alelám genu agouti. Proto se může zbarvení agouti projevit pouze homozygotů  $a^t/a^t$ . Název „agouti“ dostal tento gen od jihoamerického hlodavce zbarvením podobnému vlčímu. U psů se projevuje toto zbarvení jako vlkošedé nebo divoké (DOSTÁL, 2007).

*ASIP* byl mapováním umístěn na chromozom 24 mezi mikrosatelity *AHT 118* a *AHT 125* (KERNS *et al.*, 2004). U psů popisujeme čtyři alely v následující dominantní hierarchii  $a^v > a^w > a^t > a$ . Specifické alely *ASIP* jsou nezbytné pro různé barevné odznaky u psů, například black and tan a saddle tan (DREGER, SCHMUTZ, 2011).

### 2.2.2 Tyrosinase related protein 1 (TYRP1)

*Tyrosinase related protein 1* je protein v melanocyту, který mění barvu kůže a chlupů zvířat (JACKSON, 1988). Některé mutace uvnitř tohoto genu byly identifikovány u myši a způsobují u nich hnědé zbarvení (ZDARSKY *et al.*, 1990; BELL *et al.*, 1995; JAVERZAT a JACKSON, 1998). Tento gen byl také označován jako *B* lokus (JACKSON, 1988). Gen *TYRP1* způsobuje hnědé zbarvení. Byl mapován na 11. chromozomu mezi mikrosatelity *CO3109* a *FH2004* (SCHMUTZ *et al.*, 2002). Little (1957) tento gen označil jako lokus *B*, který zapříčiní produkci hnědého eumelaninu. Jeho projev je recesivní vůči černému zbarvení. Newton *et al.* (2000) popsali předčasný stop kodon v genu *MC1R* psa, který byl přítomen u většiny psů s červenou nebo žlutou barvou srsti, kterou zkoumali. Všichni psi s černou nebo hnědou barvou srsti postrádali tento předčasný stop kodon nebo byli pro ně heterozygotní. To potvrzují studie Little (1957) a Winge (1950) jenž popsali, že černá je dominantní nad červenou barvou u většiny psů. Schmutz *et al.* (2002) dále studovali interakci *MC1R* s *TYRP1* u mnoha dalších plemen psů.

V genu *TYRP1* jsou rozpoznány tři různé alely, které způsobují hnědé zbarvení. Detekce hnědého zbarvení vyžaduje testování všech mutací, předčasného stop kodonu na exonu 5 ( $b^s$ ), delecí prolinového zbytku na exonu 5 ( $b^d$ ) a substituci páru bází v exonu 2, která způsobuje záměnu serinu za cystein ( $b^c$ ) (SCHMUTZ *et al.*, 2002). Ukázalo se, že některá plemena s prokazatelně hnědými jedinci nemusí nést všechny tyto alely. Je možné, že se jedná o doplňkové vzácné alely genu *TYRP1* (SCHMUTZ, BERRYERE, 2007). V případě přítomnosti dvou alel *b* na různých

chromozomech jedinec produkuje hnědý eumelanin. Pokud jsou dvě alely *b* na jednom chromozomu jedinec je černého zbarvení. Alela bez přítomnosti mutace, neboli wild type *E*, zapříčiňuje produkci černého eumelaninu. Přítomnost jedné alely *B* stačí pro černé zbarvení jedince (KERNS *et al.*, 2007; CANDILLE *et al.*, 2007).

Alely *TYRPI* interagují s alelami *MC1R* a kromě srsti determinují také zbarvení kůže na čumáku a na polštářcích tlapek (SCHMUTZ *et al.*, 2002). U žlutých labradorů je takový efekt nežádoucí a hnědý čumák je u nich považován za vadu. U psů s genotypem *b/b* nebyly pozorovány žádné zdravotní problémy, přesto je u některých plemen přítomnost těchto alel záměrně potlačována. Na druhou stranu jsou alely *b* rozšířeny u mnoha jiných plemen psů a hnědá je pro ně žádoucí barvou, zvláště u loveckých plemen (SCHMUTZ *et al.*, 2002). Toto zbarvení mívá také různé názvy, od nejrozšířenějšího označení hnědá (brown), přes čokoládovou (chocolate), játrovou (liver) až po červenou (red). I když se ve skutečnosti o pravou červenou barvu nejedná, protože tu způsobuje jiný druh pigmentu - feomelanin.

V jednom z vrhů australských ovčáků se objevila dvě hnědá štěňata, zatímco matka nenesla žádnou ze tří známých mutací *TYRPI*. Sekvenování *TYRPI* odhalilo novou nesmyslnou mutaci c.555>G v exonu 2, což vedlo k předčasnému stop kodonu UAG a zkrácení o 353 z 537 aminokyselinových zbytků, které obsahovaly všechny funkční místa. S největší pravděpodobností se hnědá barva srsti u těchto jedinců vyskytla ve formě nové mutace v kombinaci s běžnou mutací *b<sup>d</sup>* nebo *b<sup>s</sup>*. Při dalším zkoumání se tato mutace objevila u čtyř sourozenců a jejich matky, ale u dalších třiceti nepříbuzných australských ovčáků nalezena nebyla (HRCKOVÁ TURNOVÁ *et al.*, 2017). Tato dosud neznámá mutace u psů je ale známá u králíků (UTZERI *et al.*, 2014) i koček (LYONS *et al.*, 2005; SCHMIDT – KUNTZEL *et al.*, 2005).

### 2.2.3 Melanocortin 1 receptor (MC1R)

Jedná se o první gen, který byl u psů studován pomocí molekulárních metod (SCHMUTZ *et al.*, 2001). Gen *MC1R* byl u psa mapován na 5. chromozomu pomocí mikrosatelitu *ZuBeCa6* v délce 6cM (BECKER-FOLLMAN *et al.*, 1997).

*MC1R* kóduje lokus *Extension* u mnoha druhů savců. Ztráta funkce genu způsobuje produkci výhradně červeného nebo žlutého feomelaninu (NEWTON *et al.*,

2000). Little (1957) tuto mutaci pojmenoval písmenem *E* nebo také jako *Extension* lokus, mutovaná alela byla označena *e* a divoký typ alely *E*.

U domestikovaných psů je zástupcem divokého typu alely *E* např. dobrman. Plemeno s alelou *e* představuje zlatý retrívr, který produkuje výhradně žlutý pigment (NEWTON *et al.*, 2000). Alela *e* neovlivňuje pigmentaci čumáku, pysků, očních víček a polštářků tlapek, působí pouze na zbarvení srsti. Díky tomu rozeznáváme žluté jedince genotypu *e/e* s tmavou pigmentací od žlutých jedinců genotypu *a<sup>y</sup>/a<sup>y</sup>* s žlutým nebo masovým zbarvením čumáku, pysků, víček a polštářků (DOSTÁL, 2007). Třetí alela *E<sup>M</sup>* způsobuje jednonukleotidovou substituci (799A>G) (SCHMUTZ *et al.*, 2003). Melanistická maska je vyjádřena jednou kopií této alely, je viditelná pouze u žlutohnědých nebo žíhaných psů. Celočerní, hnědí nebo modří psi nemají melanistickou masku. U psů, kteří šednou s věkem, se melanistická maska časem objeví. Psi s bílým čumákem neprodukují v této oblasti melanin, proto se u nich maska nenachází, dokonce ani, když tuto alelu nesou (SCHMUTZ, BERRYERE, 2007).

#### 2.2.4 Beta – defensin 103 (CBD103)

Symbol *K* označuje gen *beta – defensin 103* a byl objeven na 16. chromozomu. V tomto lokusu existují ještě další tři alely s následující hierarchií: *K<sup>B</sup>* (tzv. black - dominantní černá) > *k<sup>br</sup>* (tzv. brindle - žíhaná střídání eumelaninu a feomelaninu) > *k<sup>y</sup>* (tzv. yellow - recesivní žlutá. Jedna kopie alely *k<sup>br</sup>* za přítomnosti alely *k<sup>y</sup>* je příčinou exprese fenotypu psa známého jako žíhané zbarvení (KERNS *et al.*, 2007). Žíhání u psů sestává ze střídání pruhů feomelaninu a eumelaninu v rozmanitých odstínech. U některých psů může dojít v nadměrné produkci eumelaninu a jedinec bude černě zbarvený, naopak u jiných může být páskování eumelaninem velmi slabé. Žíhání se na ventrální straně těla psů rozloží za přítomnosti genotypu *a<sup>y</sup>/a<sup>y</sup>* (BERRYERE *et al.*, 2005). Psi s genotypem *k<sup>y</sup>/k<sup>y</sup>* mohou být žlutohnědí, vlkošedí nebo v barvě způsobené eumelaninem s tan odznaky závislé na genu *ASIP* (SCHMUTZ, BERRYERE, 2007). Lokus *agouti* (*A*) nás informuje o pevném zbarvení srsti, ale jen málo plemen nese mutaci ztráty funkce v *agouti* lokusu, která černé zbarvení přenáší jako recesivní znak (LITTLE, 1957). Proto musí být u velkého množství plemen pro pevné zbarvení srsti eumelaninem

(černá, hnědá nebo šedá) přítomna ještě nejméně jedna z alel  $E$  nebo  $E^M$  a jedna dominantní alela v lokusu  $K$  (SCHMUTZ, BERRYERE, 2007).

### 2.2.5 Melanophilin (MLPH)

Psi s ředěnou nebo šedou barvou srsti se vyskytují v řadě psích plemen. Některá plemena označujeme jako modrá, jiná mají stříbřité, fialové, hnědošedé nebo izabela zbarvení srsti (WELLE *et al.*, 2009). Tito jedinci se rodí buď jako šedí psi nebo se s věkem vybarvují z černé na šedou. Děděné vlastnosti, barva srsti při narození s následným genetickým blednutím, vyvolávají blednutí pigmentů eumelaninu a feomelaninu. Feomelanin se neředí tak dramaticky jako eumelanin. Geneticky je blednutí pigmentu podmíněno genem *MLPH*, který byl detekován na 25. chromozomu (SCHMUTZ, BERRYERE, 2007).

Ředění barvy srsti ( $d$ ) je děděno jako mendelistický autozomálně recesivní znak. Jedná se o chybný přenos melanozomů ve folikulech melanocytů, který je regulován třemi interagujícími proteiny – *MLPH*, *MYO5A* a *RAB27A* (WELLE *et al.*, 2009). Ředění barev a jejich mutace uvnitř *MLPH* se vyskytuje u různých druhů savců včetně člověka (MATESIC *et al.*, 2001).

Červení psi s genotypem  $e/e$  na *MC1R* se při ředění obtížněji detekují (NEWTON, 2000). Žihání a ředění psi (vipet, greyhound) mají šedé pruhy na světlém plavém podkladu. Jedinci s ředěným fenotypem (dobrman, bígl) kosegregují se specifickými haplotypy *MLPH* (PHILIPP, 2005).

### 2.2.6 Progresivní šedivění

Šedivění se vyskytuje na různých částech těla, v různém věku psa. Progresivní šedivění je kontrolováno lokusem  $G$  (LITTLE, 1957). Na základě reciproké chromozomové korelace byl lokus  $G$  umístěn na 11. chromozom (RIEDER *et al.*, 2000). Šedivění bylo také pozorováno u plavých psů s mendelistickou maskou (SCHMUTZ, 2003).

### 2.2.7 Merle (grošování)

Little (1957) tuto alelu označil jako lokus *M*. Tento znak byl mapován na 10. chromozomu (HEDAN *et al.*, 2006). Příčinou znaků merle jsou *SINE* element a spouštěč nukleotidů thymidin v intronu 10 na exonu 11 genu *SILV* (CLARK *et al.*, 2006). Sponenberg (1985) potvrdil schopnost jeho přenosu z rodičů na potomstvo shrnutím záznamů chovatelů o narozených merle štěňatech merle rodičům. Grošování se projevuje u jedinců s genotypem *Mm*. Recessivní homozygoti mají plášťově jednotné zbarvení. Homozygoti dominantní jsou bílé nebo téměř bílé barvy (ŠILER *et al.*, 2012).

Zbarvením merle označujeme rozprostřený tmavý eumelanin mezi světlejší zbarvením. Někteří chovatelé označují jedince, kterým se střídavě rodí merle štěňata nebo štěňata bez merle zbarvení, jako tajné merle nebo fantom merle. Heterozygoti nebo homozygoti pro merle představují riziko široké škály sluchových a očních abnormalit (ŠILER a FIEDLER, 2015). Spojení dvou merle jedinců je v rámci FCI zakázáno a potomci nejsou dále zapsáni do plemenné knihy. Rozeznáváme varianty např. tzv. merle harlekýn, hidden merle, cryptic merle.

### 2.2.8 Microphthalmia (MITF)

Výzkumy na Iowa State University kompletovaly studium genů s vlivem na skvrnitost a identifikovaly *MITF* jako kandidátní gen pro nepravidelnou skvrnitost (ROTHSCHILD, 2006). U boxerů je detekován gen *MITF* na 20. chromozomu (KARLSOON *et al.*, 2007). Mutace v *MITF* může působit na zbytek melanoblastu v řadě generací odvozených od neutrálního znaku buněk, což je nakonec příčinou pigmentace srsti (BISMUTH, 2005). Nedostatek pigmentace nebo bílých znaků můžeme předvídat. Bylo popsáno několik isoform *MITF*, za hlavní lze považovat isoformu *MITF-M* (UDONO, 2000). Některé analýzy dokázaly, že *MITF* je gen způsobující variantu celobarevnou s odznaky nebo s celým bílým pokryvem těla u boxerů a bull teriérů v souvislosti s působením dalších dvou forem mutace na pigmentaci (KARLSON *et al.*, 2007). Jednou z mutací je tzv. *SINE* (short interspersed nukleotide element) a druhou je *LP* (length polymorphism), což je řetězec opakujících se alel, které se liší v délce u různě skvrnitých psů. Jejich údaje naznačují, že *LP* je delší u plemen s bílými znaky než u psů bez bílé barvy. Bílé

skvrny u boxerů jsou kódovány monogenně a semidominantně (LEEGWATER *et al.*, 2007). Geneticky je kontrolován výskyt a velikost bílé skvrny. Ta může být i tak veliká, že bude pokrývat téměř celé tělo jedince. V takovém případě jde o jednu bílou skvrnu. Není to však albinismus, protože takový jedinec má tmavé oko, tmavý nos i pigmentované sliznice.

### 2.2.9 Ticking (tečkování)

Ticking je typ skvrnitosti, která je tvořena z velmi malých teček na bílém podkladě (LITTLE, 1957). Nevyskytuje se ihned po narození, ale objevuje se v několika týdnech. Tento případ je známý u plemene dalmatin a je u nich považován za plemenný znak. Tečkování je způsobeno dominantní alelou *T* (SCHMUTZ, BERRYERE, 2007). Uvažuje se, že geny determinující tečkování u dalmatinů mají spojitost s produkcí močoviny místo alantoinu (SAFRA *et al.*, 2006).

### 2.2.10 Harlekýn

Harlekýn je znak vyskytující se u německých dog, jsou to nezarovnané černé plochy na bílém podkladě. Tento vzor vyžaduje přítomnost jedné kopie merle mutace a jedné kopie mutace označené *H* na jiném lokusu (SPONENBERG, 1985). Clark *et al.* (2006) toto potvrzuje testováním německých dog na zbarvení harlekýn.

### 2.2.11 Albinismus

Dominantní alela *C* je pravděpodobně strukturálním genem pro tyrozinázu (enzym podílející se na syntéze melaninu z tyrozinu). U albínů tento enzym nemůže být tvořen, a proto nemůže být produkován melanin (BOWLING, 2000). Tyrozináza byla mapováním umístěna na chromozomu *CFA21* v exonu 1. V exonu 4 byly nalezeny dva polymorfismy *R408Q* a *L438F* vedoucí k záměně aminokyselin (SCHMUTZ, BERRYERE, 2007). Je známo 7 alel pro tento lokus. Dominantní alela *C* umožňuje, aby se normálně projevil pigment. Recesivní alela *c<sup>a</sup>* zcela zamezuje u homozygotů vzniku jakéhokoliv melaninu v srsti nebo duhovce očí, které jsou potom červené nebo růžové bez pigmentace na čenichu a polštářcích (BOWLING, 2000).



## **2.3 POUŽITÉ METODY**

### **2.3.1 Izolace DNA**

Většinou je izolována DNA, která je přítomna v nitrobuněčném obsahu. Pokud je ve zkoumání DNA obsažená v určité organely, je potřeba ji před samotným izolačním procesem separovat z buněčného obsahu dané organely. K uvolnění buněčného obsahu se používají detergenty, které rozrušují membrány. Detergenty mohou být iontové povahy, nejčastěji dodecylsulfát sodný nebo soli žlučových kyselin. Druhou variantou jsou neionogenní (nenabité) detergenty, jako např. Triton X100. Další možností je použití různých fyzikálních nebo fyzikálně-chemických metod, jako například rozrušení membrán ultrazvukem. Následně je potřeba oddělit izolovanou látku z roztoku buněčného obsahu, čehož lze docílit dočasnou denaturací. Použit lze teplotní denaturaci, techniku vsolování a vysolování nebo srážení organickými rozpouštědly (JANOCHOVÁ, 2009).

Během izolace DNA se musí brát v úvahu podobnost s ostatními biopolymery, a proto jsou vybírány metody s vysokou selektivitou, časově nenáročné a z ekonomického hlediska výhodné. Pro vzorky obsahující malé množství DNA, jsou sestaveny velmi citlivé metody. Je rovněž potřeba počítat s nestabilitou DNA a zachovat takové podmínky, aby co nejvíce odpovídaly fyziologickým hodnotám a nedocházelo k degradaci molekul (především pH a teploty) (ANZENBACHER a KOVÁŘ, 1986).

### **2.3.2 PCR (polymerase chain reaction - polymerázová řetězová reakce)**

Techniku PCR má patentovanou firma Cetus z 28. července 1987 a jako hlavní vynálezce byl uveden Dr. Mullis. Následující rok firma Cetus obdržela žádosti o propůjčení licence k provádění PCR pro komerční diagnostické účely. Cetus oznámil rozhodnutí 15. ledna 1989 spolupracovat s firmou Hoffmann – La Roche Incorporated na vývoji a komercializaci lidské in vitro diagnostiky a službách založených na PCR technologii. V dalších letech proběhlo několik soudních sporů o patentová práva na pracovní postupy a technologii. Všechny spory byly pro Cetus vítězné. V roce 1992 firma Roche Molecular Systems odkupuje od firmy Cetus, po letech spolupráce, patentová práva na PCR a další související technologie.

Patentová práva vlastní do dnešní doby. V roce 1993 Dr. Kary B. Mullis dostává Nobelovu cenu za chemii za objev PCR techniky (DVOŘÁKOVÁ, 2007).

Jde o enzymatický proces, kdy dochází k amplifikaci určité části DNA, kterou ohraničují primery (MULLIS *et al.*, 1986; ŘEHOUT *et al.*, 2000). Tyto úseky musí být lemovány sekvencí, která je alespoň z části známá, aby bylo možné navrhnout vhodnou dvojici primerů komplementárních k lemující sekvenci. Výhodou metody PCR je její vysoká citlivost. Stačí jen malé množství DNA, aby mohlo dojít k amplifikaci daného úseku. Pro analýzu je možno použít vzorek i velmi starý nebo degradovaný. Podmínkou je, aby obsahoval alespoň jeden zachovaný cílový úsek DNA. Základní jednotkou polymerázové řetězové reakce je jeden cyklus, který se stává ze tří fází: denaturační, anealační a syntetické (DVOŘÁKOVÁ, 2011).

Tento proces vyžaduje okolo 25 – 35 cyklů, kde dochází k zahřívání a ochlazování vzorků. Během tohoto procesu se střídají tři různé teploty. Nejdůležitější součástí jsou polymeráza (např. *Taq* polymeráza pocházející z bakterie *Thermus aquaticus*) a templát. Dále chlorid hořečnatý, KCl, pufr, deoxynukleotid trifosfát (dNTPs), sérový albumin a voda. PCR je složeno z několika kroků:

1. Denaturace - DNA je zahřívána na teplotu 94 – 98 °C, dochází k rozvolnění dvoušroubovice a vzniká tak jednovláknová DNA, na kterou poté nasedají primery.
2. Nasednutí primerů - při teplotě 50 – 65 °C nasedají primery na specifická místa DNA.
3. Prodlužování primerů - při teplotě 72 °C (pro *Taq* polymerázu) dochází k samotné syntéze DNA. Ve směru od 5' konce k 3' konci přirůstá vlákno DNA komplementární k původní molekule DNA (KUMAR a GURUSUBRAMANIAN, 2011; MULLIS *et al.* 1986).

### 2.3.3 Sekvenování

Sekvenace DNA je souhrnný termín pro biochemické metody, jimiž se zjišťuje pořadí nukleotidů (A, C, G, T) v krátkých úsecích DNA. Tyto sekvence jsou součástí dědičné informace v jádru, plazmidech, mitochondriích a plastidech. Sekvenace DNA je užitečná nejen v základním výzkumu biologických procesů, ale i v aplikovaných oborech, jimiž je diagnostika nemocí či forenzní medicína. Sekvenace se uplatnila v projektu čtení lidského genomu (Human Genome Project), ale přečteny byly genomy i mnoha jiných organismů, včetně různých rostlin, živočichů a mikrobů. Nejpoužívanější technikou je Sangerova dideoxy metoda ([www.biogen.cz](http://www.biogen.cz)).

Od konce 70. let 20. století je možné rychlé a účinné sekvenování díky dvěma, téměř současně vyvinutým technikám. Jedna byla vyvinuta ve Velké Británii týmem F. Sangera a A. R. Coulsona – metoda terminace řetězců (enzymová) a druhá v USA W. Gilbertem a A. Maxamem – metoda specifické chemické degradace. Jedná se o dvě zcela odlišné metody. V současné době se více z těchto technik užívá metoda F. Sangera (enzymová). Hlavními důvody jsou netoxicity reagentů, relativní jednoduchost a především možnost postupné automatizace (BROWN, 2007).

V posledním desetiletí, někdy označovaném jako postgenomová éra, se objevily zcela nové technologie a možnosti sekvenování. Zatím co dříve byly potřeba k osekvenování celého lidského genomu roky a byly na to potřeba stovky přístrojů, dnes je to samé možné udělat na jediném přístroji za necelé 3 týdny. NGS (next generation sequencing - sekvenování nové generace) využívá principu paralelizace procesu sekvenování, kdy dochází k sekvenci tisíců až milionů sekvencí současně. I když tyto nové technologie v mnoha případech předčí klasické metody sekvenování, jsou stále zatížené značnými náklady na přístrojové vybavení a provoz. Základní rozdíl mezi klasickým (Sangerovým) sekvenováním a NGS je ve způsobu detekce narůstajících řetězců. Klasické sekvenování používá elektroforetickou separaci, což je zároveň hlavní limitující faktor přes veškeré automatizační snahy. NGS se opírá o chemické děje při vstupu nového nukleotidu do syntetizovaného řetězce, které poskytnou signál v případě, že vložený prekurzor skutečně odpovídá požadovanému nukleotidu z hlediska komplementárního templátu. Detekce odpovědi je pochopitelně maximálně automatizována (DOLEŽAL, 2016).

### 3. MATERIÁL A METODIKA

#### 3.1 POUŽITÝ MATERIÁL

K analýze byly použity biologické vzorky od 113 jedinců plemene velký münsterlandský ohař. Studovaná populace zahrnovala obě pohlaví. Bylo zde zastoupeno 62 psů (54,9 %) a 51 fen (45,1 %). Věková struktura populace v době odběrů vzorků byla následující: nejmladší jedinec byl ve věku 5 měsíců a nejstarší ve věku 13 let. Průměrný věk jedinců ve studované populaci byl 5,3 let. Vzorky byly odebrány od 49 chovných jedinců, což je 90,7 % z celkového počtu chovných jedinců a dále od 64 jedinců využívaných v myslivecké praxi nebo jako rodinný společník. U všech jedinců byly provedeny stěry bukální sliznice. Získané vzorky byly uchovávány odděleně v laboratorních podmínkách.

#### 3.2 IZOLACE DNA

Ze získaných biologických vzorků byla vyizolována DNA. K izolaci bylo využito komerčně vyráběného kitu MagCore Genomic DNA Tissue kit od firmy RBS Bioscience. Izolace proběhla podle protokolu výrobce.

#### 3.3 PCR U EXONU 2

Z izolované DNA byla provedena PCR pro exon 2 lokusu TYRP1 dle metodiky Hrcková Turnová *et al.* (2017). K PCR byly použity primery o následujících sekvencích:

TYRP1 2F 5' - TGTAACGACGGCCAGAAATCCTAGAGTACGGGGGCA – 3'

TYRP1 2R 5' - CAGGAAACAGCTATGACCATTTCAGGTTGTTCCGAACCCA – 3'

Reakční směs pro PCR o celkovém objemu 15  $\mu$ l se skládala z následujících položek: 1  $\mu$ l DNA (50 – 100 ng), 1,5  $\mu$ l PCR pufru (10 $\times$ ), 0,45  $\mu$ l 50 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,3  $\mu$ l 10 mM dNTP's, 0,1  $\mu$ l *Taq* polymerázy (5 U), 1  $\mu$ l od každého primeru (10 pM/ml).

Prvním krokem PCR reakce byla denaturace po dobu 4 minut při 94 °C. Následovalo 30 cyklů, skládajících se z denaturace při 94 °C po dobu 50 s, annealingu při 62 °C po dobu 50 s a elongace při 72 °C po dobu 50 s. Na závěr PCR reakce proběhla elongace při 72 °C po dobu 4 minut. Správné proběhnutí PCR reakce a přítomnost PCR fragmentů byla potvrzena elektroforeticky na 2,5% agarózovém gelu, barveném ethidium bromidem. Elektroforéza probíhala při napětí 120 V po dobu 45 minut.

### **3.4 SEKVENOVÁNÍ U EXONU 2**

Sekvenování proběhlo pomocí Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit na přístroji ABI 3130xI Genetic Analyzer. Při sekvenování byla zjišťována přítomnost mutace c.555T>G (p.Tyr185Ter, g.33319349T>G). V případě přítomnosti nukleotidu G na dané pozici byla zaznamenána mutovaná alela G, v opačném případě (tj. v přítomnosti nukleotidu T na dané pozici), byla zaznamenána alela T.

### **3.5 ANALÝZA MUTACÍ V LOKUSU TYRP1**

Pro analýzu populace byly kromě testování mutace v exonu 2 v lokusu pro TYRP1 využity také výsledky komerční genotypizace mutace v exonu 5 a 7 v témže lokusu. Chovatelé provedli u několika zvířat genotypizaci mutace lokusu TYRP1 v exonech 5 a 7 v komerční laboratoři, kde byl zjištěn genotyp pro danou mutaci. Tato genotypizace vycházela z práce Schmutz *et al.* (2002) a chovatelé poskytli k dispozici výsledky celkem 7 jedinců pro další využití v rámci předkládané práce. Tito jedinci byli v zastoupení 5 dominantních homozygotů, 1 heterozygot a 1 recesivní homozygot. Všichni jedinci, mimo hnědě zbarveného recesivního homozygota, byli zařazeni do plemenitby.

### 3.6 VÝPOČTY FREKVENCÍ

Na základě zjištěných genotypů byly vypočteny alelické a genotypové frekvence u obou mutací podle následujících vzorců:

Relativní frekvence genotypů

$$P^R = (N_{AA} / N) * 100$$

$$H^R = (N_{Aa} / N) * 100$$

$$Q^R = (N_{aa} / N) * 100$$

Absolutní frekvence alel

$$p^A = 2 * N_{AA} + N_{Aa}$$

$$q^A = 2 * N_{aa} + N_{Aa}$$

Relativní frekvence alel

$$p^R = \frac{2 * N_{AA} + N_{Aa}}{2 * N} * 100$$

$$q^R = \frac{2 * N_{aa} + N_{Aa}}{2 * N} * 100$$

Použitý horní index R vyjadřoval relativní frekvenci a horní index A vyjadřoval absolutní frekvenci. Písmeno P označovalo dominantní homozygoty v populaci, písmeno H heterozygoty a písmeno Q recesivní homozygoty. Písmenem N byl označen počet jedinců v dané populaci.

### 3.7 VYTVOŘENÍ PŘIPAŘOVACÍCH PLÁNŮ NA ZÁKLADĚ VÝSLEDKŮ GENOTYPIZACÍ

Na základě výsledků genotypizací v jednotlivých lokusech byly vytvořeny potenciální přípařovací plány při zohlednění jednotlivých genotypů za účelem vyloučení možného potomstva s hnědým zbarvením.

**Tabulka č. 2:** Varianty genotypů v lokusu TYRP1 a jejich fenotypový projev

	BB	Bb	bb
BB	černé zbarvení (100 %)	černé zbarvení (100 %)	černé zbarvení (100 %)
Bb	černé zbarvení (100 %)	černé (75 %) nebo hnědé (25 %) zbarvení	černé (50 %) nebo hnědé (50 %) zbarvení
bb	černé zbarvení (100 %)	černé (50 %) nebo hnědé (50 %) zbarvení	hnědé zbarvení (100 %)

## 4. VÝSLEDKY

V práci byla provedena genotypizace 113 vzorků DNA od jedinců velkého müsterlandského ohaře. V rámci genotypizace na exonu 2 byl zjištěn u všech jedinců pouze genotyp bez mutace. Celkem bylo tedy 113 jedinců dominantními homozygoty. Z tohoto výsledku vyplývají i zjištěné frekvence alelické a genotypové. Ty se rovnají 100 % v obou typech frekvencí.

### 4.1 MUTACE V EXONU 2

Relativní frekvence genotypů

$$P^R = (N_{AA} / N) * 100$$

$$P^R = (113 / 113) * 100$$

$$P^R = 100 \%$$

$$H^R = (N_{Aa} / N) * 100$$

$$H^R = (0 / 113) * 100$$

$$H^R = 0 \%$$

$$Q^R = (N_{aa} / N) * 100$$

$$Q^R = (0 / 113) * 100$$

$$Q^R = 0 \%$$

Absolutní frekvence alel

$$p^A = 2 * N_{AA} + N_{Aa}$$

$$p^A = 2 * 113 + 0$$

$$p^A = 226$$

$$q^A = 2 * N_{aa} + N_{Aa}$$

$$q^A = 2 * 0 + 0$$

$$q^A = 0$$

Relativní frekvence alel

$$p^R = \frac{2 * N_{AA} + N_{Aa}}{2 * N} * 100$$

$$p^R = \frac{2 * 113 + 0}{2 * 113} * 100$$

$$p^R = 100 \%$$

$$q^R = \frac{2 * N_{aa} + N_{Aa}}{2 * N} * 100$$

$$q^R = \frac{2 * 0 + 0}{2 * 113} * 100$$

$$q^R = 0 \%$$



## 4.2 MUTACE V EXONU 5 A 7

Relativní frekvence genotypů

$$P^R = (N_{AA} / N) * 100$$

$$P^R = (5 / 7) * 100$$

$$P^R = 71,4 \%$$

$$H^R = (N_{Aa} / N) * 100$$

$$H^R = (1 / 7) * 100$$

$$H^R = 14,3 \%$$

$$Q^R = (N_{aa} / N) * 100$$

$$Q^R = (1 / 7) * 100$$

$$Q^R = 14,3 \%$$

Absolutní frekvence alel

$$p^A = 2 * N_{AA} + N_{Aa}$$

$$p^A = 2 * 5 + 1$$

$$p^A = 11$$

$$q^A = 2 * N_{aa} + N_{Aa}$$

$$q^A = 2 * 1 + 1$$

$$q^A = 3$$

Relativní frekvence alel

$$p^R = \frac{2 * NAA + NAa}{2 * N} * 100$$

$$p^R = \frac{2 * 5 + 1}{2 * 7} * 100$$

$$p^R = 78,6 \%$$

$$q^R = \frac{2 * Naa + NAa}{2 * N} * 100$$

$$q^R = \frac{2 * 1 + 1}{2 * 7} * 100$$

$$q^R = 21,4 \%$$

### 4.3 SOUHRN MUTACÍ

**Tabulka č. 3:** Souhrn mutací

		c.555>G v exonu 2	b v exonu 5 a 7
Relativní frekvence genotypů	P <sup>R</sup>	100 %	71,4 %
	H <sup>R</sup>	0 %	14,3 %
	Q <sup>R</sup>	0 %	14,3 %
Absolutní frekvence alel	p <sup>A</sup>	226	11
	q <sup>A</sup>	0	3
Relativní frekvence alel	p <sup>R</sup>	100 %	78,6 %
	q <sup>R</sup>	0 %	21,4 %

#### **4.4 PŘIPAŘOVACÍ PLÁNY**

Aby se zabránilo šíření hnědé barvy v rámci chovu, je nutné zabezpečit připárování jedinců s vhodnými genotypy. Jenom tak lze zamezit narození jedinců s nežádoucím zbarvením.

Podíváme-li se na výsledky genotypizace v exonu 2, není potřeba žádné speciální připárovací plány dodržovat. V případě mutace v exonu 5 a 7 je pak nutné zamezit spojování jedinců, kteří nesou zmutovanou alelu.

## 5. DISKUZE A ZÁVĚR

Tato práce byla zaměřena na výskyt nově objevené mutace genu *TYRP1* v exonu 2 u velkého müsterlandského ohaře. Tato mutace byla objevena Hrckovou Turnovou *et al.* v roce 2017 u australského ovčáka. V jednom z vrhů australských ovčáků se objevila dvě hnědá štěňata, přestože matka nenesla žádnou ze tří známých mutací *TYRP1*. Sekvenování *TYRP1* odhalilo novou nesmyslnou mutaci c.555>G v exonu 2, což vedlo k předčasnému stop kodonu UAG a zkrácení o 353 z 537 aminokyselinových zbytků, které obsahovaly všechny funkční místa. S největší pravděpodobností se hnědá barva srsti u těchto jedinců vyskytla ve formě nové mutace v kombinaci s běžnou mutací *b<sup>d</sup>* nebo *b<sup>s</sup>*. Při dalším zkoumání se tato mutace objevila u čtyř sourozenců a jejich matky, ale u dalších třiceti nepříbuzných australských ovčáků nalezena nebyla.

U VMO se tato mutace ani v jenom ze 113 vzorků neprokázala. Lze tedy říci, že se mutace v exonu 2 v české populaci VMO nevyskytuje a vyskytující se heterozygoti či recesivní homozygoti v populaci nesou některou ze tří již dříve známých mutací. Dokazují to i výsledky analýz některých jedinců, kde byly provedeny komerční testy na tyto mutace. Proto by bylo vhodné testovat nasbírané vzorky i na ostatní mutace genu *TYRP1*.

V chovu VMO bych doporučovala chovatelům, aby své jedince nechali testovat na tyto mutace a výsledky testů využívali při sestavování chovného páru tak, aby nedocházelo k výskytu recesivních homozygotů s hnědou barvou srsti. Ideální by bylo, aby nedocházelo ani ke zvyšování výskytu skrytých přenašečů, tedy heterozygotů. Jednou z možností jak tomu předcházet by bylo zavedení povinnosti testování lokusu *TYRP1* pro zařazení jedince do chovu. Chovná základna VMO v České republice však není příliš široká a plemeno je chováno zejména pro pracovní účely. A na tyto dvě okolnosti je třeba brát zřetel především!

## ***SEZNAM LITERATURY***

ANZENBACHER P., KOVÁŘ J. (1986): Metody chemického výzkumu pro biochemiky. 1. vyd. Praha: Ministerstvo školství ČSR, 1986. 199 s.

BECKER-FOLLMANN J., GAA A., BAÚSCH E., NATT E., SCHERER G., DEIMLING O. (1997): High-resolution mapping of a linkage group on mouse chromosome 8 conserved on human chromosome 16Q, *Mammalian Genome*. 1997, roč. 8, č.3, s. 172 – 177. ISSN 09388990.

BERRYERE T. G., KERNS J. A., BARSH G. S., SCHMUTZ S. M. (2005): Association of an Agouti allele with fawn or sable coat color in domestic dogs. *Mammalian Genome*. 2005, roč. 16, č. 4, s. 262 – 272. ISSN 09388990.

BISMUTH K., MARIC D., ARHEITER H. (2005): MITF and cell proliferation: the role of alternative splice forms. *Pigment Cell Res.*, October 2005, vol. 18, no. 5, s. 349 – 359.

BOWLING S. A. (2000): Genetika psí barvy, 2000-1-3.

BROWN T. (2007): Klonování genů a analýza DNA: úvod. 1. české vyd. V Olomouci: Univerzita Palackého, 2007. ISBN 9788024417196.

CANDILLE S. I., KAELIN C. B., CATTANACH B. M., YU B., THOMPSON D. A., NIX M. A., KERNS J. A., SCHMUTZ S. M., MILLAHAUSER G. L. BARSH G. S. (2007): A  $\beta$ -Defensin Mutation Causes Black Coat Color in Domestic Dog. *Science*. 2007, roč. 318, č. 5855, s. 1418 – 1423. ISSN 00368075.

CLARK L., WAHL J. M., REES CH. A., MURPHY K. E. (2006): Retrotransposon insertion in SILV is responsible for merle patterning of the domestic dog. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2006, roč. 103, č. 5, s. 1376 – 1381. ISSN 00278424.

DOLEŽAL T. (2016): Základy moderní biologie, sekvenování, přečtení genetické informace, éra genomiky.

DOSTÁL J. (2007): Genetika a šlechtění plemen psů. České Budějovice: Dona. ISBN 9788073221041.

DREGER D. L. and SCHMUTZ S. M. (2010): A New Mutation in MC1R Explains a Coat Color Phenotype in 2 "Old" Breeds: Saluki and Afghan Hound. *Journal of Heredity* 2010; doi: 10.1093/jhered/esq061.

DREGER D. L. and SCHMUTZ S. M. (2011): Proposed evolution of the agouti locus alleles in domestic dogs. *Advances in Canine and Feline Genomics and Inherited Disease* in Baltimore, MD from Sept. 23-25, 2011.

DVOŘÁKOVÁ L. (2011): *Využití metod PCR ve forenzní genetické analýze*, Praha, 2011, Bakalářská práce. Univerzita Karlova v Praze.

DVOŘÁKOVÁ M. (2007): *Základní principy a využití kvantitativní PCR s ohledem na onkologickou diagnostiku*, Brno, 2007. Bakalářská práce. Masarykova univerzita v Brně.

FIALOVÁ L. (2005): 70 let Klubu chovatelů dlouhosrstých ohařů. *Myslivost; Stráž myslivosti*; příloha *Lovecký pes*. 53 (83). 4 – 7s.

FIALOVÁ L. (2017): Klub dlouhosrstých ohařů; *Zpravodaj* č. 95/2017. 64s.

HEDAN B., CORRE S., HITTE CH., CRÉANO S., VILBOUX T., DERRIEN T., DENIS B., GALIBERT F., GALIBERT M. D., ANDRÉ C. (2006): Coat colour in dogs: Identification of the Merle locus in the Australian shepherd breed. *BMC Veterinary Research*. 2006, roč. 2, č. 9, s 1 – 10. ISSN 17466148.

HRCKOVÁ TURNOVÁ E., MAJCHRAKOVÁ Z., BIELIKOVÁ M., SOLTYS K., TURNA J., DUDAS A. (2017): A novel mutation in the TYRP1 gene associated with brown coat colour in the Australian Shepherd Dog Breed. Department of Molecular Biology, Faculty of Natural Sciences, Comenius University, Slovak Republic, Publication 14 March 2017.

JACKSON I. J. (1988): A cDNA encoding tyrosinase-related protein maps to the brown locus in mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1988, č. 85, s. 4392 - 4396.

JANOCHOVÁ J. (2009): *Izolace DNA: Výťažnost a kvalita*. Brno, 2009. Bakalářská práce. Masarykova univerzita.

JAVERZAT S. and JACKSON I. J. (1998): White-based brown (Tyrpl B-w) is a dominant mutation causing reduced hair pigmentation owing to a chromosomal

inversion. *Mammalian Genome*. 1998, 6, 1, roč. 9, č. 6, s. 469 - 471. ISSN 09388990.

KARLSON E. K., BARANOWSKA I., WADE C. M., SALMON HILLBERTZ N. H., ZODY M. C., ANDERSON N., BIAGI T. M., PATTERSON N., PIELBERG G. R., KULBOKAS E. J. 3rd, COMSTOCK K. E., KELLER E. T., MESIROV J. P., VON EULER H., KÄMPE O., HEDHAMMAR A., LANDER E. S., ANDERSON G., ANDERSON L., LINDBLAD. TOH K. (2007): Efficient mapping of mendelian traits in dogs through genome-wide association. *National Genetic*, November 2007, vol. 39, no. 11, s. 1321 – 1328.

KERNS J. A., CARGILL E. J., CLARK L. A., CANDILLE S. I., BERRYERE T. G., OLIVER M., LUST G., TODHUNTER R. J., SCHMUTZ S. M., MURPHY K., BARSH G. S. (2007): *Linkage and segregation analysis of black and brindle coat color in domestic dogs*. *Genetics* 176, 2007. 1679-1689.

KERNS J. A., NEWTON J., BERRYERE T. G., RUBIN E. M., CHENG J. F., SCHMUTZ S. M. and BARSH G. S. (2004): Characterization of the dog Agouti gene and a nonagouti mutation in German Shepherd Dogs. *Mammalian Genome*, October 2004, vol. 15, no.10, s 798-808.

KUMAR N. S., GURUSUBRAMANIAN G. (2011): Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers and its applications. *Science Vision* 11. 3, s. 116 – 124.

LEEGWATER P. A., VAN HAGEN M. A., VAN OOST B.A. (2007): Localization of White Spotting Locus in Boxer Dogs on CFA20 by Genome-Wide Linkage Analysis with 1500 SNPs. *Journal of Heredity*, 2007, vol. 98, no. 5, s. 549 – 552.

LITTLE C. C. (1957): *The Inheritance of Coat Color in Dogs*, Howell Book House.

LYONS L. A., FOE I. T., RAH H. C., GRAHN R. A. (2005): Chocolate coated cats: TYRP1 mutations for brown color in domestic cats, *Mamm Genome*, August 2004, 16 (5): 356 - 366.

LYONS L. A., IMES D. L., RAH H. C., GRAHN R. A. (2005): Tyrosinase mutations associated with Siamese and Burmese patterns in the domestic cat (*Felis catus*), *Anim Genet*, April 2005, 36 (2): 119 - 126.

MATESIC L. E., YIP R., REUSS A. E., SWING D. A., O'SULLIVAN T. N., FLETCHER C. F., COPELAND N. G., JENKINS N. A. (2001): mutation in MLPH, encoding a member of the Rab effector family, cause the melanosome transport defects observed in leaden mice. *Proceedings of the national Academy of Sciences*. 2001, č. 18, s. 10238 – 102243. ISSN 00278424.

MULLIS K., FALOONA F., SCHARF S., SAIKI R., HORN G., ERLICH H. (1986): Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: The polymerase chain reaction, *Cold Spring Harbor Symposia of Quantitative Biology*, s. 263–273.

NEWTON J. M., WIKIE A. L., HE L., JORDAN S. A., METTALLIONOS D. L., HOLMES N. G., JACKSON I. J., BARSH G. S. (2000): Melanocortin 1 receptor variation in the domestic dog. *Mammalian Genome*, January 2000, vol. 11, no. 1, s. 24 – 30.

PHILIPP U., HAMANN H., MECKLENBURG L., NISHINO S., MIGNOT E., GÜNZEL.APEL A. R., SCHMUTZ S. M., LEEB T. (2005): Polymorphisms within the canine MLPH gene are associated with dilute coat color in dogs. *BMC Genetics*. 2005, roč. 6, č. 1, s. 34 – 49. ISSN 14712156.

RIEDER S., STRICKER C., JOERG H., DUMMER R, STRANZINGER G. (2000): A comparative genetic approach for the investigation of ageing grey horse melanosoma. *Journal of Animal breeding and Genetics*. 2000, roč. 117, č. 2, s. 73 – 82. ISSN 09312668.

ROTHSCHILD M. F., CLEAVE VAN P. S., GLENN K. L., CARLSTROM L. P., ELLINWOOD N. M. (2006): Association of MITF with white spotting in Beagle crosses and Newfoundland dogs. *Animal Genetic*, October 2006, vol. 37, no. 6, s. 606 – 607.

ŘEHOUT V., ČÍTEK J. a SÁKOVÁ L. (2000): *Genetika I: (úvod do studia genetiky)*. České Budějovice: Jihočeská univerzita. ISBN 8070404051.

SAFRA N., SCHAIBLE R. H., BANNASCH D. L. (2006): Linkage analysis with an intedbreed backcross maps Dalmatian hyperuricosuria to CFA03. *Mammalian Genome*. 2006, roč. 17, č. 4, s. 340 – 345. ISSN 09388990.



SCHMIDT-KÜNTZEL A., EIZIRIK E., O'BRIEN S. J., MENOTTI-RAYMOND M. (2005): Tyrosinase and tyrosinase related protein 1 alleles specify domestic cat coat color phenotypes of the albino and brown loci, *J Hered*, August 2005, 96 (4): 289 - 301.

SCHMUTZ S. M. (2003): MC1R Studies in Dogs With Melanistic Mask or Brindle Patterns. *Journal of Heredity*. 2003, roč. 94, č. 1, s. 69 – 73. ISSN 14718505.

SCHMUTZ S. M. and BERRYERE T. G. (2007): Genes affecting chat colour and pattern in domestic dogs: review. *Animal Genetics*, 2007 December. 38 (6): 539-49.

SCHMUTZ S. M., BERRYERE T. G., BARTA J. L., REDDICK K. D., SCHMUTZ J. K. (2007): Agouti sequence polymorphisms in coyotes, wolwes and dogs suggest hybridization. *J. Hered.* 98(4): 351-5. (E-pub 2007 Jul 1).

SCHMUTZ S. M., BERRYERE T. G., GOLDFINCH A. D. (2002): TYRP1 and MC1R genotypes and their eggect on coat color in dogs. *Mammalian Genome*. July 200, vol. 13, no. 7, s. 380 – 387.

SCHMUTZ S. M., MOKER J. S., BERRYERE T. G., CHRISTISON K. M. (2001): A SNP is used to map MC1R on dog chromosome 5. *Animal Genetics*, 2001. 32:43 - 44.

SPĚVÁK M. (1995): 60 let Klubu chovatelů dlouhosrstých ohařů. *Klub dlouhosrstých ohařů; Zpravodaj č. 50/1995*. 6 – 8s.

SPONENBERG D. P. (1985): Inheritance of the harlequin color in Great Dane dogs. *The Journal of Heredity*. 1985, č. 76, s. 224 – 225.

ŠILER R. a FIEDLER J. (2015): ABC genetiky drobných zvířat. Vydání třetí, přepracované. Praha: Brázda, 2015. ISBN 9788020904133.

ŠILER R., FIEDLER J. a SUCHÁNEK P. (2012): Genetika drobných zvířat: kniha vysvětluje genetiku - králíků, drůbeže, holubů, exotického ptactva, psů, koček a nutrií. Zlín: Tigris, s. 220. ISBN 9788086062518.

TRANKOVSKÁ Z. (1982): Německý dlouhosrstý ohař, velký a malý münsterlandský ohař. *Pes přítel člověka*. 27 (6). 6 – 7s.

UDONO T., YASUMOTO K., TAKEDA K., AMAE S., WATANABE K., SAITO N., FUSE N., TACHIBANA M., TAKAHASHI K., TAMAI M. (2000): Structural organization of the human microphthalmia-associated transcription factor gene containing four alternative promoters. *Biochemica et Biophysica Acta (BBA) – Gene Structure and Expression*. 2000, č. 1491, s. 205 – 219.

UTZERI V. J., RIBANI A., FONTANESI L. (2014): A premature stop codon in the TYRP1 gene is associated with brown coat colour in the European rabbit (*Oryctolagus cuniculus*), *Anim Genet*, August 2014, 45 (4): 600 - 603.

VORNHOLT E. (1988): *Grosse Münsterländer praktische Ratschläge für Haltung, Pflege und Erziehung*. 7. - 8. Tsd. Hamburg: Parey, 100s.; ISBN 3490352122.

VORNHOLT E. (2004): *Der Grosse Münsterländer: Haltung - Pflege - Erziehung und Ausbildung für die Jagd*. 5., erw. und aktualisierte Aufl. Melsungen: Neumann-Neudamm, 144s.; ISBN 3788808918.

WELLE M., PHILIPP U., RUFENACHT S., ROOSJE P., SCHARFENSTEIN M., SCHMUTZ E., BRENIG B., LINEK M., MECKLENBURG L., GREEST P., DROGEMULLER M., HAASE B., LEEB T., DROGEMULLER C. (2009): MLPH Genotype-Melanin Phenotype Correlation in Dilute Dogs. *Journal of Heredity*. 2009, roč. 100, Supplement 1, s. 75 – 79. ISSN 00221503.

WINGE O. (1950): *Inheritance in Dogs with Special Reference to Hunting Breeds*. New York: Comstock Pub. Associates. ISBN 0801404584.

ZDARSKY E., FAVOR J., JACKSON J. (1990): The Molecular Basis of brown, an Old Mouse Mutation, and of an Induced Revertant to Wild type. *Genetics*. 1990, č. 126, s. 443 – 449.

<http://cmku.cz>, staženo dne: 11. 12. 2017

<http://www.ohardlouhosrsty.cz>, staženo dne: 2. 4. 2018

<http://www.biogen.cz>, staženo dne: 12. 4. 2018