

Název projektu:

**VYUŽITÍ MIKROSATELITNÍCH ANALÝZ
PŘI ŠLECHTĚNÍ POPULACE BÍLÝCH JELENŮ
U LČR, s.p.**

Řešitel:



Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně

Lesnická a dřevařská fakulta
Ústav ochrany lesů a myslivosti

Doba řešení:

2004 – 2006

Řešitelský kolektiv:

Ing. Martin Ernst, Ph.D.

Ing. Jaroslav Kliment

Bc. Eduard Levý

Mgr. Lenka Putnová, Ph.D.

Martin Stejskal

1. ÚVOD

Chov bílé jelení zvěře představuje v České republice unikátní chovatelskou problematiku. Cílem chovatelského úsilí je získání maximálního zastoupení standardně bílých jedinců při zachování jejich dobrého zdravotního stavu a reprodukce. V průběhu historie jejího chovu v našich zemích však několikrát kriticky poklesly její početní stavy. Nevole (1992) uvádí, že se z těchto důvodů začaly v populaci projevovat některé negativní důsledky příbuzenské plemenitby - inbreedingové deprese (např. tělesné anomálie, zkrácení spodní čelisti, relativně nízký věk, slabá konstituce a snížená natalita). Proto bylo v historii chovu několikrát přistoupeno k osvěžení krve divoce zbarvenou jelení zvěří a v roce 1973 došlo k založení druhého oborního chovu u nás.

Systematická práce s cílem objasnit podstatu genetického vedení bílého zbarvení jelení zvěře byla vedena v žehušickém a žlebském chovu Bartošem et al. v 70. – 80. letech minulého století. Do současnosti jsou tyto poznatky využívány v chovech LČR, s.p., nevyjímaje oboru Žleby. Přes velké chovatelské úsilí se ve žlebské oboře, pravděpodobně vlivem využívání omezené chovatelské základny (inbreedingu), nadále vyskytují některé negativní zdravotní jevy (např. tělesné anomálie). Z těchto důvodů zde bylo započato řešení výše jmenovaného projektu, kde bylo využito molekulárně-genetických metod k diagnostice příbuzenské plemenitby. Práce se skládala jednotlivých kroků: odebírání vzorků krve (barvy) z jedinců a uskladnění těchto vzorků v tzv. DNA bance; vytvoření a evidence údajů o jednotlivých kusech jelení zvěře v databance; molekulárně-genetické analýzy, na jejichž základě byla založena tzv. identifikační karta jedince; výpočet koeficientu inbreedingu u studovaného souboru zvěře. Na základě získaných výsledků pak bylo možné navrhnout nová doporučení k chovu.

2. GENETICKÉ VLIVY V CHOVU BÍLÉ JELENÍ ZVĚŘE

2.1. Základní genetické pojmy

Genetika je nauka o dědičnosti a proměnlivosti znaků. **Znakem** se v genetice označují vlastnosti organismů nebo buněk. Rozdělujeme je na znaky **morfologické** (tvar a rozměry těla i jeho jednotlivých orgánů), **funkční** (vykonávání určitých životních funkcí) a **psychické** (temperament, inteligence, nadání). Východiskem kteréhokoli znaku je určitá biochemická reakce, která je podmíněna specifickým enzymem.

Některé znaky potomka jsou shodné se znaky rodičů a jsou dány dědičnou informací, přenášenou rozmnožováním. Dědičná informace je uložena v **chromozómech**, což jsou pentlicovité útvary v buněčném jádře, tvořené komplexem bílkovin a nukleových kyselin. Každý živočišný druh má většinou určitý počet chromozómů v každé buňce, což nazýváme **karyotypem**. Počet chromozómů v diploidních tělních buňkách je dán součtem chromozómů haploidních pohlavních buněk, jejichž splynutím jedinec vznikl. Na řetězcích nukleových kyselin je kódována genetická informace na základě kombinací čtyř dusíkatých bází (adenin a thymin, cytosin a guanin). Znaky se nepřenášejí z rodičů na potomky jako takové, ale přenášejí se jen **vlohy**, dědičné předpoklady, informace pro jejich vytvoření. Jednotkou genetické informace je tedy **gen** (vloha), který je materiálním nosičem znaků. Znaky rozdělujeme na **kvalitativní**, které podstatně neovlivňuje prostředí, jsou určeny **geny velkého účinku** a dědičně bývají většinou určeny jedním genem (např. zbarvení, krevní skupina). **Kvantitativní**, které jsou ovlivněny prostředím, je možné je měřit, vyjadřovat je ve vhodných jednotkách a jsou podmíněny skupinou genů – **geny malého účinku** (např. tělesné rozměry, parožení). Geny pak určují znaky v jejich konkrétních kvalitách i kvantitách, proto každý gen existuje ve dvou až v mnoha konkrétních podobách, jež se nazývají alely. **Alela** je tedy alternativní variantou určitého genu a nachází se u všech jedinců stejného druhu na stejném místě v **genomu**, což je soubor genů. Soubor všech genů o konkrétních alelách se označuje jako **genotyp**. Tedy v užším slova smyslu je genotyp soubor alel jedince pro určitý znak. Genotyp souhrnně určuje rozsah fenotypových možností jedince a jeho konkrétní fenotyp pak na jeho základě modeluje svými vlivy prostředí, ve kterém se vyvíjí a žije. **Fenotyp** jedince je tedy určen projevem genotypu, na který působí prostředí. Soubor všech alel a genů v populaci pak nazýváme **genofond**. Genetická variabilita populace je dána počtem polymorfních genů a počtem alel každého polymorfního genu. Je důležité si uvědomit, že každý potomek získává pro určitý gen, který je tvořen dvěma alelami, vždy jednu alelu od matky a jednu alelu otce. Potomek tedy nemůže mít více vloh od některého z rodičů, pokud se nejedná o geny, které jsou umístěny na pohlavních chromozómech. Každý jedinec má tedy přibližně stejný počet vloh od každého z rodičů. Polymorfismus genu pak umožňuje, že se v populaci vyskytují jedinci **heterozygotní**, tzn., že od každého z rodičů obdrželi jinou alelu tohoto genu. Dále pak jedinci **homozygotní**, kteří získali od každého z rodičů shodnou alelu. Dvě alely jedince, které určují daný gen, mohou být ve vzájemném vztahu **úplné** či **neúplné dominance** a **úplné** či **neúplné recesivity** nebo také **kodominance**. Jestliže se heterozygot (např. s alelami *Aa*) v daném znaku fenotypově neliší od dominantního homozygota *AA*, jde o úplnou dominanci. Alela *a* je v tomto případě úplně recesivní vůči alele *A*. U heterozygota

se tedy recesivní alela ve fenotypu neprojevuje. Jestliže se však heterozygot v daném znaku od homozygotů odlišuje a jeví v daném znaku kvalitu, která je někde mezi kvalitou homozygota dominantního a recesivního, podílejí se na vytvoření formy znaku u heterozygota obě alely nestejnou měrou. Jedna více, pak je neúplně dominantní a druhá méně, pak je neúplně recesivní. Pokud se podílejí obě stejnou měrou, hovoříme o **intermediaritě**. Kodominantní jsou pak obě alely páru, které jsou plně exprimovány v heterozygotním genotypu, tzn., že se obě párové dominantní alely projevují v obraze daného monogenního znaku obě vedle sebe (takovým příkladem je dědičnost krevní skupiny). Obecně pak platí, čím je vyšší genetická variabilita a heterozygotnost v populaci, tím je populace životaschopnější a adaptabilnější na změny podmínek prostředí.

Selekce (výběr) je nejvýznamnějším činitelem ovlivňujícím změnu v genovém složení populace a může značně přispět k jejímu zušlechťování. Opačně pak může nesprávná selekce vést k degradaci populace. Je nutné si uvědomit, že selekce na nějaký znak (např. bílé zbarvení, vyšší přírůstky), může vést ke snížení projevu znaku jiného (např. plodnost, imunita). Proto je při selekci zvěře (zejména v oborách nebo farmových chovech) důležité, abychom se nesoustředili pouze na efekt jednoho znaku, ale sledovali znaky několik. Při dodržení této zásady je pak možné zvýšit selekční efekt při zachování životaschopnosti a kvality populace. U hospodářských zvířat lze provádět selekci razantněji, jelikož můžeme těmto zvířatům dokonaleji přizpůsobit prostředí, ve kterém žijí a lépe udržovat jejich imunitu. Na úspěšnost selekce má vliv tzv. koeficient heritability (dědivosti) – h^2 , což je podíl genotypu z celkové fenotypové proměnlivosti. Pohybuje se v rozmezí od 0 do 1. Čím je jeho hodnota vyšší, tím vyšší je podíl genotypu a jednodušší selekce na daný znak. Například koeficient dědivosti pro hmotnost paroží udává Martínková (Encyklopedie myslivosti, 2003) 0,30 – 0,35, což znamená, že se na hmotnosti paroží podílejí minimálně z 65% vlivy prostředí (výživa, klimatické podmínky, zdravotní stav aj.). Účinnost selekce vyjadřuje **selekční efekt**, což je rozdíl mezi průměrným výskytem sledovaného znaku v generaci potomků a průměrným výskytem téhož znaku v rodičovské generaci. Při selekci dále hraje roli **heterózní efekt**, což je projev křížení co nejméně podobných rodičů, při němž dochází ke zlepšování celkové kondice v populaci a **inbreedingová deprese**, což je projev příbuzenského křížení, při němž naopak dochází ke snižování celkové kondice v populaci.

Molekulární genetika se zabývá zkoumáním vztahů mezi fyzikálně-chemickou a biologickou rovinou, které svými interakcemi určují veškeré živé soustavy. Velmi zjednodušeně lze říci, že zkoumá vliv jednotlivých genů na určité fyziologické

a morfologické vlastnosti jedince a co vše jejich projev způsobuje (nejpoužívanější metodou je PCR-RFLP). Molekulární genetika je schopna pomocí dalších metod identifikovat jedince, ověřovat příbuzenské vztahy mezi nimi a rodičovství. Metody založené na molekulárně – genetických postupech se tedy jeví jako nejspolehlivější ke vzájemnému rozlišování živočišných druhů či poddruhů, identifikaci jedince, ověřování příbuzenských vztahů, původu a k charakteristice některých ekologicky a ekonomicky významných vlastností. Znalosti z této oblasti jsou v současné době postupně uplatňovány ve většině činností spojených s biologickými procesy a logicky nemohou opomenout ani myslivost – chov bílé jelení zvěře.

Ačkoli se zdá, že je molekulární genetika úzce specializovaným oborem, opak je pravdou. Využíváním a kombinováním poznatků z jiných vědních oborů, jež dává do souvislostí, rozšiřuje nové náhledy na principy a příčiny fungování živých soustav. Jako příklad propojení této disciplíny s jinými obory lze uvést zoologii a botaniku, kde se těchto poznatků používá především k zařazování do systému. V ekologii a ochraně přírody je využívána možnost identifikace jedince, což umožňuje snadnější kontrolu především u nezákonného obchodování s chráněnými a zvláště chráněnými živočichy. Patří sem také porovnávání populací a určování genetického původu. Z hlediska veterinárního lékařství se řeší otázky odolnosti vůči některým chorobám nebo příčiny snížení reprodukční schopnosti. V zootechnice se využívá především možností testování původu zvířat a jejich produkčních a hospodářsky významných vlastností. Monitorování zdravotního stavu a rychlé určení příčin infekce rostlin se používá ve fytopatologii.

2.2. Molekulárně-genetické metody v chovu bílé jelení zvěře

Molekulární genetika v chovu bílé jelení zvěře umožňuje monitorovat genotypy jednotlivých geograficky oddělených populací, na jejichž základě mohou být cíleně sestavovány chovné skupiny. Tímto způsobem můžeme pozitivně ovlivnit inbreeding a snížit rizika s ním spojená (např. natalita, vitalita kolouchů po narození, morfologické anomálie aj.). Lze tedy udržovat, kontrolovat a působit na genetickou variabilitu a diverzitu. Tímto způsobem můžeme kladně ovlivnit kondici, zdravotní stav a reprodukci, při zachování specifických, chovatelsky významných a jedinečných vlastností izolovaných populací bílé jelení zvěře. Do budoucna se také nabízí možnost vyčlenit z běžného chovu část jedinců, kteří by byli chováni jako tzv. genová rezerva nebo využití poznatků při kontrole a sestavování genealogických linií kvalitní trofejové zvěře. Z uvedeného vyplývá, že v budoucnu bude možné cíleně doplňovat určité "chybějící" genotypy do oddělených populací, které

požadovaným genotypem nedisponují, což zamezí její postupné degradaci na daném území. V současnosti jsou již také známy některé geny, které ovlivňují zbarvení. Tato problematika však není doposud podrobně prozkoumána.

První využití molekulárně-genetických metod v chovu bílé jelení zvěře u nás bylo při řešení projektu v oboře Žleby. Hlavním cílem bylo zavedení tzv. mikrosatelitních analýz, pomocí kterých lze identifikovat jednotlivé kusy a ověřovat příbuzenské vztahy mezi nimi. Mikrosatelit je určité místo na DNA a je tvořen několikrát se po sobě opakujícími úseky, jejichž celková délka je různá. Jeden mikrosatelit je tvořen dvěma alelami, z nichž potomek dědí vždy jednu od otce a druhou od matky, pokud se ovšem nenachází na pohlavním chromozomu. Celkově se ovšem v rámci jednoho mikrosatelitu většinou vyskytuje více alel v populaci. U jedince je však stejný mikrosatelit tvořen dvěma alelami a různorodost alel v rámci populace, tzv. polymorfismus mikrosatelitu, nám umožňuje identifikovat jedince a ověřovat příbuzenské vztahy. Když totiž využijeme větší a dostatečný počet mikrosatelitů (tzv. mikrosatelitní panel), které budeme analyzovat u jedince, nenalezneme v populaci stejného jedince s maximální možnou přesností 99,99%. Pomocí této metody lze, mimo jiné, kontrolovat inbreeding (příbuzenskou plemenitbu) a omezovat jeho negativní dopady na chov bílé jelení zvěře.

Abychom mohli takové rozborů provést, bylo nejprve nutné založit tzv. DNA banku, do které byly přemístěny a uskladněny vzorky krve (barvy) z jelení zvěře. Tyto byly dříve umístěny na Veterinární a farmaceutické univerzitě v Brně. V hlubokomrazícím boxu (DNA bance) na Ústavu ochrany lesů a myslivosti LDF MZLU v Brně je k dnešnímu dni umístěno 99 vzorků krve (barvy) jelení zvěře z obory Žleby, Kopidlno a Janovice. Ze zvěře, která zůstávala nadále v chovu, byly odebírány vzorky krve (barvy) z jugulární žíly do zkumavek s látkou zabraňující srážení krve (antikoagulant) po její imobilizaci Doc. Lamkou. Imobilizace (uspání) zvěře bylo prováděno nastřelováním narkotizační střelou pomocí plynové pušky, a to především do oblasti plecí. Ze zvěře vyřazené z chovu odlovem byly vzorky odebírány Ing. Nevolem do stejných zkumavek po proříznutí krční žíly zhaslé zvěře. Takto odebrané vzorky byly nejprve důkladně protřepány, zchlazeny na teplotu min. 4°C a nižší. Poté byly přepraveny do DNA banky na ÚOLM LDF MZLU v Brně, kde jsou uskladněny při -56°C.

Obr. 1: *U imobilizovaného jelena byly zjištěny údaje pro zápis do terénní evidenční karty a proveden odběr krve a trusu*



Obr. 2: *Injekční podání antiséra k probuzení*



Obr. 3: Odbourání reziduí imobilizační dávky trvá několik hodin



Při odběrech vzorků byla současně provedena veterinární vyšetření a každému jedinci oborníkem vypsána evidenční karta, jejíž obsah je pro ilustraci uveden v příloze č. 1. Údaje z těchto terénních karet byly dále ukládány do databanky (databáze) chovu bílé jelení zvěře ve Žlebech, přičemž jsou zde také údaje o zvěři transportované do Kopidlna a Janovic. K dnešnímu dni zde je umístěno 100 popisů jelení zvěře. Z toho 39 ks převážně bílé zbarvení, 16 ks kombinované zbarvení, 15 ks bílé zbarvení, 9 ks strakaté zbarvení, 20 ks červené zbarvení (z nich není u 1 ks vzorek krve) a poslední je zaevidovaný jeden kus, u kterého schází údaj o zbarvení. Celková struktura databanky je uvedena na příkladu vybraného jedince – viz příloha č. 1.

Mimo záznamů z terénních evidenčních karet obsahuje databanka tzv. identifikační karty jedince. V této kartě jsou zaznamenány výsledky rozborů jednotlivých mikrosatelitů, jsou zde tedy identifikovány vždy dvě alely pro jeden mikrosatelit. Jelikož je využito více mikrosatelitů (tzv. mikrosatelitní panel), lze touto kartou identifikovat jedince a ověřovat jeho příbuzenské vztahy s dalšími, kteří disponují identifikační kartou. V současnosti má v databance kompletní kartu založeno 13 jedinců (ukázka IK viz obr. č. 4) a u dalších 10-ti je karta nekompletní, jelikož se k dnešnímu dni nepodařilo analyzovat všechny alely

u některých mikrosatelitů z důvodu neoptimální kvality vzorků. V průběhu sestavování mikrosatelitního panelu pro jelení zvěř a následných analýz jsme se s největšími problémy setkávali zejména při izolaci DNA. Metodika izolace byla dokonce řešena ve spolupráci s Kriminalistickým ústavem PČR v Praze, přičemž jsme společně dospěli k názoru, že je problém v náročnosti nalézt kvalitní buňky vhodné pro získání DNA ze vzorků krve.

Obr. 4: Ukázka identifikační karty založené v databance (výřez)

Evid. číslo	Alela 1	Alela 2
0arFCB5	87	93
T156	154	162
T26	340	358
BM888	192	194
RM188		137
RT1	262	276
T501	245	259
RT13		301
T193	192	192

2.2.1. Metodika molekulárně-genetických analýz

Izolace DNA

Genomová DNA byla izolována z krve především pomocí upravené metodiky izolace QIAamp® Blood Kit. U vzorků, kde se nepodařila tímto kitem izolovat DNA, bylo dále využito standardních metodik pomocí kitů CHEMAGEN a JETQUICK (*metodiky jsou k dispozici u řešitele*).

PCR a MS analýza na sekvenátoru

Podmínky cyklování

Název cykléru: GeneAmp PCR System 9700 cycler

Cykly: 95°C 10min; 30 opakujících se cyklů po 95°C 30s, 59°C 90s, 72°C 90 s; 72°C 60min; 4°C ∞.

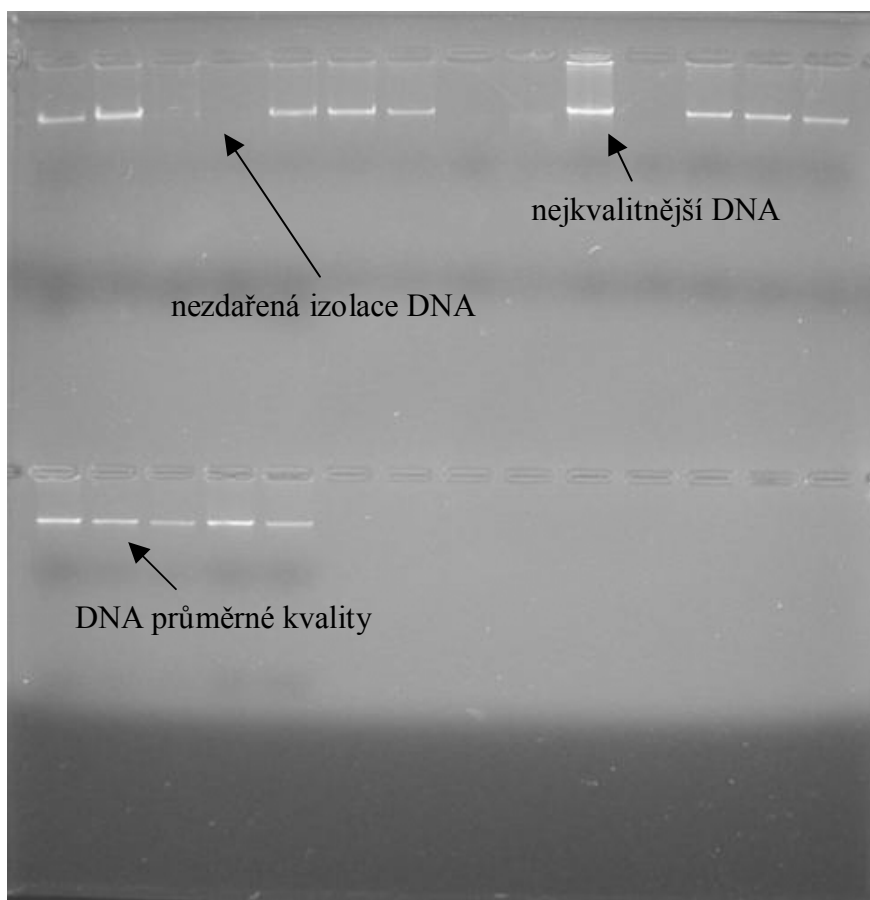
Multiplex PCR reakce

Celkový objem reakční směsi 6,25μl (5,75μl master mix + 0,5μl DNA/ředění 10× na 10-100ng/μl).

Master mix – 336 μ M dNTP, 1.8mM MgCl₂, koncentrace jednotlivých primerů 100 – 600nM, 0.9U *Taq* Gold polymerázy, 1.2 x PCR pufr a 3% DMSO. Použity byly mikrosatelity (primery): *BM888*, *OarFCB5*, *RM188*, *RT1*, *RT13*, *T26*, *T156*, *T193*, později byl také úspěšně odzkoušen *T501*, který bude v budoucnu zařazen do mikrosatelitního panelu a pro jeho rozšíření byl dále navržen lokus *CelJP27* (viz tab. č.1).

Kontrola kvality izolované DNA a vyrobených PCR produktů uvedenými metodami byla provedena elektroforetickým dělením v 1xTAE pufru (40mM Tris-acetát; 1mM EDTA, pH 8, BIO-RAD) na agarózovém gelu obarveném ethidium bromidem (0,5 μ g/ml, BIO-RAD) a vizualizovaná v UV světle při napětí max. 5V/cm (viz obr. č. 5). Elektroforetická separace probíhala při elektrickém napětí 100-150V po dobu 30–90 minut. Množství nanášené genomové DNA a PCR produktů bylo 5 μ l na 1% a 4% agarózový gel a jako nanášecí pufr byl použit 6 $\times$ Loading Dye Solution (MBI Fermentas). K přípravě gelů bylo použito agaróz firmy Serva a k určování velikosti PCR produktů hmotnostní markery (MBI Fermentas).

Obr. 5: Vizualizace kvality lyzátů (DNA) na agarózovém gelu



Příprava vzorků na fragmentační analýzu:

1 μ l PCR produktu + 0,5 μ l DNA markeru LIZ500 + 11,5 μ l formamidu

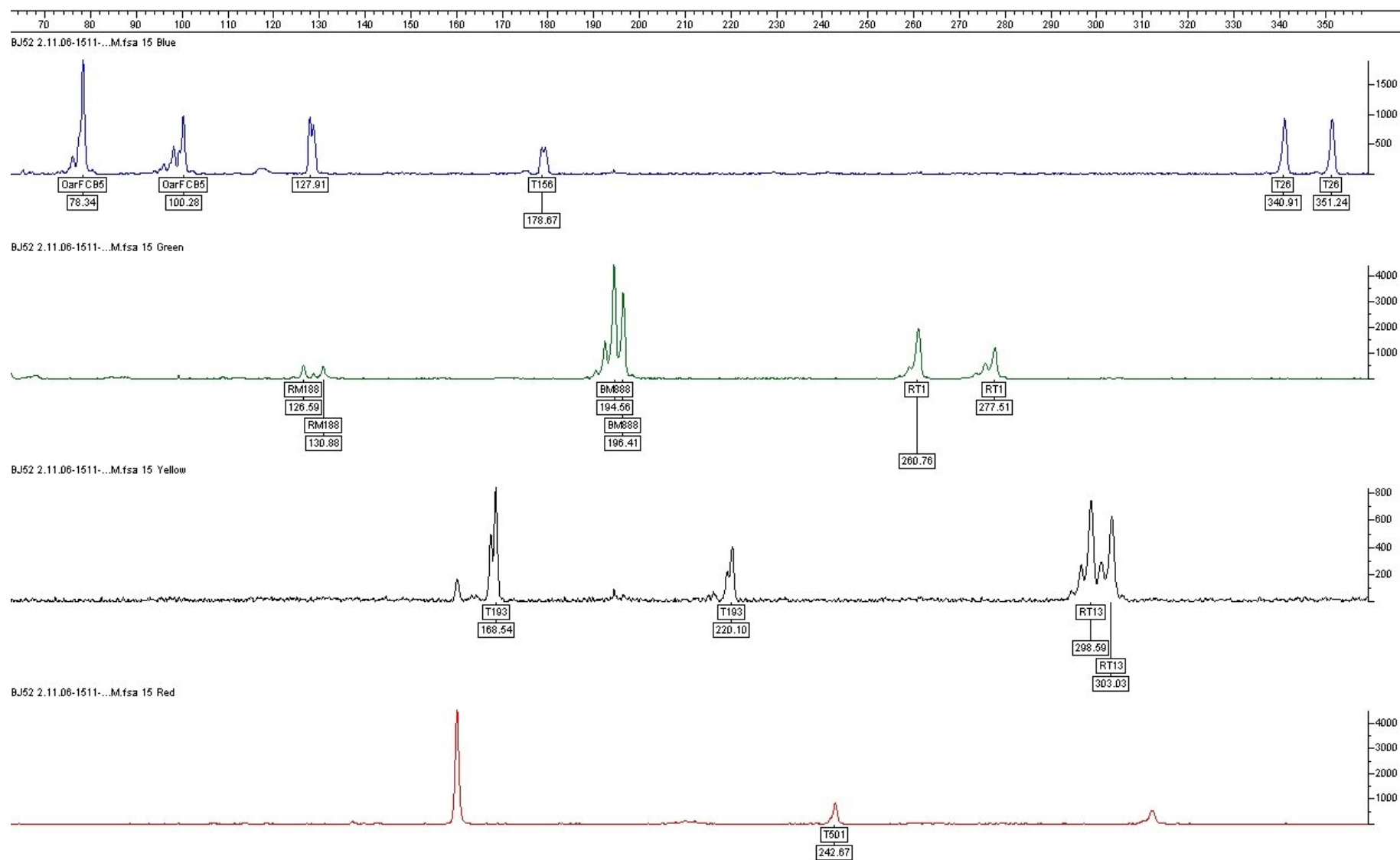
Denaturace probíhala při 95°C 5min, poté byl vzorek vložen na led. PCR fragmenty byly po denaturaci separovány pomocí ABI 310 Genetického Analyzátoru a vyhodnoceny počítačovým programem Genescan a Genotyper (viz obr. č. 6).

Tab. 1: *Sekvence vybraných a použitých barevně značených primerů (mikrosatelitů)*

Název mikrosatelitu	Značený primer	Reference
	Neznačený primer	
BM888	VIC-ACTAGGAGGCCATATAGGAGGC	
	AGCTCAAAACGAGGGACAGGG	
OarFCB5	6FAM-AAGTTAATTTTCTGGCTGGAAAACCCAG	
	ACCTGACCCTTACTCTCTTCACTC	
RM188	VIC-GCACTATTGGGCTGGTGATT	
	GGTTCACAAAGAGCTGGAC	
RT1	VIC-CATATGGCTAACTACCTAGCTTGCC	
	GAGTCCCAAAGATTTTCAGCCCTAC	
RT13	NED-GCCCAGTGTTAGGAAAGAAGA	
	CATCCCAGAACAGGAGTGAG	
T26	6FAM-TGCCATAGTTTTTCCTACCTTC	
	GAAGTTCCAATAGACACGCTC	
T156	6FAM-ATGAATACCCAGTCTTGTCTG	
	TCTTCCTGACCTGTGTCTTG	
T193	NED-CTGCTGTTGTCATCATTACCA	
	CAGTCCAAGCCTGCTAAATAA	
T501	PET-CTCCTCATTATTACCCTGTGA	
	ACATGCTTTGACCAAGACCC	
CelJP27	PET-GCAAATCAGAAATAGACCCACAGAC	
	GATCCCCCTCCTTGTGCCAC	

Pozn.: V názvu mikrosatelitu je zvýrazněno použité barevné značení primeru.

Obr. 6: Grafický výstup fragmentační analýzy pro jelení zvěř analyzovanou panelem o 8-mi mikrosatelitech (vzorek č. BJ75)



2.2.2. Variabilita mikrosatelitů a další ukazatele pro hodnocení genetické diverzity

Ke zpracování získaných dat bylo využito softwaru Cervus 2.0 (Marshall et al., 1998), PopGen32 a PowerMarker V3.25 (Liu, 2006). Vstupní vzorek k výpočtům byl složen z 13-ti jedinců (č. BJ2, BJ3, BJ11, BJ16, BJ29, BJ32, BJ34, BJ36, BJ52, BJ64, BJ66, BJ68 a BJ75), u kterých byly zjištěny všechny alely na 8-mi lokusech (viz tabulka č. 6).

Jak je uvedeno níže v tabulce č. 2, pohybovaly se frekvence hlavních alel od 0,39 do 0,50, počet genotypů od 5 (lokus *T26*) do 9 (lokus *BM888*, *RM188* a *RT13*) a počet alel byl nejnižší v lokusu *T26* (3 alely) a nejvyšší u *T156* (7 alel). Pro porovnání jsou v tabulce uvedeny také počty alel ze studie Pérez-Espona (2005), která u volně žijící skotské jelení zvěře ($n = 871$) studovala, mimo jiné, stejné mikrosatelitní lokusy. Počet alel v její práci značně převyšuje zde zjištěné počty v jednotlivých lokusech i celkově. Určitý podíl na tomto rozdílu je zajisté zapříčiněn nízkým počtem námi testovaného vzorku populace ($n = 13$), ale může být také ovlivněn izolovaností populace.

Tab. 2: *Frekvence hlavní alely, počet genotypů a alel ve sledovaných lokusech 13-ti jedinců v porovnání s počtem alel ze studie Pérez-Espona (2005) u skotské divoce žijící populace jelena lesního ($n = 871$)*

Lokus	Frekvence hlavní alely	Počet genotypů	Počet alel	Počet alel (Pérez-Espona)
<i>OarFCB5</i>	0,5	7	5	13
<i>T156</i>	0,423077	8	7	20
<i>T26</i>	0,461538	5	3	14
<i>BM888</i>	0,461538	9	5	30
<i>RM188</i>	0,384615	9	6	11
<i>RT1</i>	0,423077	7	4	15
<i>RT13</i>	0,5	9	6	17
<i>T193</i>	0,461538	7	5	17
Průměr	0,451923	7,625	5,125	17,125

Z tabulky č. 3 je patrné, že nejnižší genetická diverzita, která je předpokladem prosperity populace, byla v lokusu *T26* (0,64) a nejvyšší u *T156* (0,75), přičemž její průměrná hodnota u testovaného vzorku populace je 0,69.

Dalším ukazatelem genetické variance je heterozygotnost. Obecně lze konstatovat, že čím je její hodnota vyšší, tím je populace životaschopnější, neboť disponuje větším počtem alel – tedy vyšší variabilitou možných genotypů. Relichová (1997) uvádí, že spolehlivý odhad heterozygotnosti musí být založen na studiu více než čtyř lokusů (míst na chromozomu, kde se nachází požadovaná informace). U vzorku žlebské jelení zvěře byla zjištěna nejnižší

pro lokusy *RT13* (0,54) a *BM888* (0,62) a nejvyšší pro *T156* (0,92). Hodnota průměrné heterozygotnosti je 0,72, což znamená, že je podíl heterozygotů 72%. Vzhledem k vysokému polymorfismu mikrosatelitů se může zdát tato hodnota uspokojivou. Nevíme však, je-li optimální, neboť schází prokazatelné údaje o volně žijící jelení zvěři v ČR. Hodnotu lze porovnat například s výsledky Pérez-Espona (2005), kde byla průměrná heterozygotnost u volně žijící jelení zvěře 0,75. Ve srovnání s našimi výsledky se současném stadiu výzkumu zjištěná heterozygotnost studovaného vzorku žlebské populace nejvíe jako alarmující. Zjištěná hodnota tedy může nasvědčovat, že se nynější zvolený postup s řízenou reprodukcí v oboře Žleby zdá být kvalitním. Nesmíme však opomenout, že v této chvíli jde o statisticky neprokazatelné výsledky, neboť rozborů byly provedeny pouze u malé části populace a oproti skotské volně žijící populaci je hodnota heterozygotnosti stále o 3% nižší. Pro zajímavost lze uvést studii Ernsta (2005), který u volně žijícího prasete divokého ($n = 50$) na našem území zjistil hodnotu průměrné heterozygotnosti kolem 0,63 při analýzách 10-ti mikrosatelitních lokusů.

Nejnižší hodnota polymorfního informačního obsahu (PIC) byla zjištěna pro lokus *T26* (0,57), nejvyšší pro *T156* (0,73) a jeho průměrná hodnota je 0,65. Tato hodnota vyjadřuje pravděpodobnost projevu mateřského a otcovského genu na genotypu potomka. Ve studii Pérez-Espona (2005) je pro tyto lokusy průměrná hodnota PIC 0,81. Zde zjištěná hodnota je tedy nižší o 0,16.

Tab. 3: *Genetická diverzita, heterozygotnost, polymorfní informační obsah (PIC) a koeficient inbreedingu (f) ve sledovaných lokusech 13-ti jedinců*

Lokus	Gen. diverzita	Heterozygotnost	PIC	f
<i>OarFCB5</i>	0,66568	0,769231	0,619844	-0,11628
<i>T156</i>	0,754438	0,923077	0,727404	-0,18519
<i>T26</i>	0,639053	0,769231	0,565947	-0,16505
<i>BM888</i>	0,710059	0,615385	0,673086	0,172414
<i>RM188</i>	0,733728	0,769231	0,691371	-0,0084
<i>RT1</i>	0,674556	0,692308	0,611192	0,013699
<i>RT13</i>	0,692308	0,538462	0,661085	0,259912
<i>T193</i>	0,683432	0,692308	0,634445	0,027027
<i>Průměr</i>	0,694157	0,721154	0,648047	0,00111

U vzorku jelení zvěře z obory Žleby byla dále zjišťována příbuzenská plemenitba (inbreeding), a to pomocí sestaveného mikrosatelitního panelu, kdy bylo použito multilokusové heterozygotnosti k výpočtu průměrného koeficientu inbreedingu, jehož hodnota je po zaokrouhlení 0,0011. Nejvyšší inbreeding je u lokusu *RT13* (0,26) a *T156*

(0,19), což odpovídá nízkému podílu heterozygotních jedinců v těchto lokusech. Objevují se zde také záporné hodnoty koeficientu inbreedingu (u 4-ti lokusů), což znamená, že se u testovaného vzorku populace vyskytuje v daném lokusu více heterozygotů, než se předpokládá za Hardy-Weinbergovy rovnováhy.

Fiedler et al. (2004) uvádějí, že inbreeding může být právě v důsledku spojování nežádoucích faktorů recesivního charakteru hlavní příčinou podstatného snížení plodnosti v důsledku zvýšené embryonální mortality i snížení životnosti plodu. Dále konstatují, že procesem inbredizace ztrácí populace své adaptační možnosti, citlivě reaguje na výkyvy vnějších podmínek prostředí a jedinci jsou většinou i méně odolní, podléhající snadno nákazám. Bartoš et al. (1985) předpokládají u jelení zvěře 7-mi letý generační interval a na základě stanovení efektivní velikosti žehušické populace vypočítali hodnotu průměrného nárůstu inbreedingu (ΔF) za jednu generaci o 3,15%. Celkově Bartoš et al. (1985) a Fiedler et al. (2004) dospěli k závěru, že v žehušické populaci bílé jelení zvěře dochází k poměrně intenzivní příbuzenské plemenitbě a ve srovnání s početně malými populacemi některých druhů hospodářských zvířat jde u této zvěře o hodnoty skutečně vysoké. U žlebské zvěře prozatím nelze zodpovědně konstatovat, že se chov nenachází v inbreedingové depresi, přestože se zdá být populace kvalitní (průměrná heterozygotnost je 72,12% a průměrný koeficient inbreedingu testované skupiny je 0,11%). Pochybnosti by mohly být vyvráceny pouze dalším testováním zvěře z obory Žleby a alespoň částečnou analýzou jelení zvěře ze Žehušic, kde je vysoký inbreeding.

Pro výpočty pravděpodobnosti vyloučení rodičovství byly použity vzorce pro výpočet kombinované pravděpodobnosti vyloučení nesprávného rodiče, je-li znám genotyp potomka a obou rodičů (CEP1); kombinované pravděpodobnosti vyloučení nesprávného rodiče, je-li genotyp jednoho z rodičů neznámý (CEP2) a kombinované pravděpodobnosti vyloučení obou rodičů, je-li znám genotyp potomka a obou rodičů (CEP3). U testovaného vzorku populace byla vypočítána hodnota CEP1 = 0,992749; CEP2 = 0,93261489 a CEP3 = 0,99975736. Z uvedeného vyplývá, že při využití námi sestaveného mikrosatelitního panelu o 8-mi markerech lze vyloučit nesprávného „otce“ s přesností 99,27% a 93,26%. Toto procento může být zčásti ovlivněno nízkým počtem testovaných jedinců. Příčinou může být také uzavřenost populace, jak je patrné ze zjištěného nižšího počtu alel na jednotlivých lokusech. U volně žijící jelení zvěře je tento počet podstatně vyšší (viz tabulka č. 2). Především však výsledky poukazují na nutnost rozšířit navrhovaný MS panel o další jeden až dva lokusy, aby došlo ke zvýšení jeho přesnosti na maximální hodnotu 99,99%. Po tomto kroku by mohl být

mikrosatelitní panel přesnější a spolehlivější pro testování malých nebo izolovaných populací jelení zvěře, tedy i pro bílou jelení zvěř v oboře Žleby, ale také v ostatních oborách.

2.3. Příklad aplikace molekulárně-genetických metod v praxi

Při obdržení karet s chovatelsky významnými údaji od oborníka Ing. Nevoletého byl u červeně zbarveného jedince s evidenčním číslem Z64 (zde veden jako BJ64) označen za pravděpodobného otce jelen strakatého zbarvení se jménem Slávista – č. Z33 (zde BJ34). U těchto jedinců byly identifikovány všechny alely na jednotlivých lokusech sestaveného mikrosatelitního panelu (8 lokusů), ale také se podařilo provést analýzu dalšího mikrosatelitu (*T501*), čímž byla zvýšena přesnost při ověřování příbuzenských vztahů mezi nimi. Musíme zde připomenout, že potomek vždy dědí jednu alelu od otce a jednu od matky. Výjimku tvoří pouze lokusy umístěné na pohlavních chromozomech výsledky.

Tab. 4: *Identifikační karta jedinců BJ64 a BJ34 (červeně zvýrazněny alely vyskytující se u obou jedinců – děděné alely; v kulatých závorkách je uveden rok narození)*

Lokus	BJ64 /Z64/ ♂ (2005)	BJ34 /Z33/ ♂ (2000)
<i>OarFCB5</i>	<i>A/C</i>	<i>A/C</i>
<i>T156</i>	<i>E/F</i>	<i>F/H</i>
<i>T26</i>	<i>B/C</i>	<i>B/C</i>
<i>BM888</i>	<i>C/C</i>	<i>C/E</i>
<i>RM188</i>	<i>E/F</i>	<i>C/F</i>
<i>RT1</i>	<i>A/C</i>	<i>A/A</i>
<i>RT13</i>	<i>D/E</i>	<i>C/D</i>
<i>T193</i>	<i>C/E</i>	<i>A/E</i>
<i>T501</i>	<i>B/E</i>	<i>B/F</i>

Z výsledků je tedy patrné (viz tabulka č. 4), že jedinec BJ64 je synem BJ34, jelikož se na všech lokusech vyskytuje v genotypu vždy alespoň jedna alela, kterou nalezneme také u Slávisty. Jelikož byl pro testování těchto dvou kusů mikrosatelitní panel rozšířen o jeden lokus, je navíc snížena možná chyba pro ověření otcovství (v MS panelu o 8-mi lokusech = chyba v tomto případě 6,74%). V době psaní této publikace však nejsou k dispozici analýzy lokusu *T501* u více jedinců, proto nebyla vypočítána přesnost mikrosatelitního panelu o 9-ti lokusech. Logicky se však s rozšířením panelu chyba snižuje.

Z dalších výsledků je patrné (viz tabulka č. 5), že laň kombinovaného zbarvení s označením BJ11 je matkou bílého jelena BJ3. Tento jelen (BJ3), se jménem Skokan, je

v terénní evidenční kartě udáván za otce strakatě zbarveného jelena BJ2. Naše šetření pomocí mikrosatelitních analýz potvrdily Skokana jako otce BJ2. Přesnost pro ověření příbuzenských vztahů je opět vyšší než 93,26%, jelikož byly analýzy prováděny pro 9 lokusů.

Tab. 5: *Identifikační karta jedinců BJ11, BJ3 a BJ2 (barevně zvýrazněny děděné alely, přičemž modré jsou zděděné od BJ11 a dále předány BJ2; v kulatých závorkách je uveden rok narození)*

Lokus	BJ11 /Z9/ ♀ (1987)	BJ3 /Z1/ ♂ (1993)	BJ2 /J2/ ♂ (2002)
OarFCB5	A/D	A/B	A/B
T156	A/H	A/H	A/H
T26	B/C	C/C	C/C
BM888	A/B	A/D	B/D
RM188	E/E	B/E	B/F
RT1	C/C	B/C	A/B
RT13	D/D	D/F	D/F
T193	C/C	C/C	C/C
T501	A/F	A/B	A/B

Z molekulárně-genetických analýz mikrosatelitů je dále patrné (viz tabulka č. 6), že kombinovaně zbarvená laň Z31 (zde BJ32) je buď matkou převážně bílé laně Z75 (zde BJ75) nebo mají tito jedinci stejného otce.

Stejný vztah platí mezi strakatou laní Z35 (zde BJ36) a převážně bílým jelenem K10 (BJ52). Pokud by šlo v tomto případě o matku a syna, je to její první potomek. Jestliže však tento vztah neplatí, mají tito jedinci stejného otce.

Zajímavé výsledky jsou také u bílé laně Z14 (zde BJ16). Při pohledu do tabulky č. 6 zjistíme výskyt heterozygotnosti pouze v lokusech *OarFCB5*, *T156* a *T26*. Ostatních pět lokusů je homozygotních. V nynějším stadiu výzkumu však nelze tvrdit, že současný selekční tlak pro zvýšení počtu bíle zbarvených jedinců při zachování dobrého zdravotního stavu a reprodukce je příčinou jejich zvýšené homozygotnosti. Výsledky však poukazují na hrozbu možných problémů plynoucích z inbreedingu, což bude nutné ověřit pouze dalším testováním bíle zbarvené jelení zvěře v oboře Žleby, popř. ostatních oborách. Další zajímavostí u tohoto jedince je výskyt vzácné alely v lokusu *T156*, která se u ostatní testované zvěře nevyskytovala. Zjištění této alely, jako vzácné, může být z větší části zapříčiněno malým počtem testovaných jedinců a v budoucnu je možné, že nebude vzácnou po rozšíření počtu zvěře v analyzovaném souboru.

Tab. 6: *Identifikační karta jedinců (13ks kompletních)*

Jedinec (narozen)	Pohlaví	Zbarvení	<i>OarFCB5</i>	<i>T156</i>	<i>T26</i>	<i>BM888</i>	<i>RM188</i>	<i>RT1</i>	<i>RT13</i>	<i>T193</i>
BJ2(2002)	jelen	strakaté	<i>A/B</i>	<i>A/H</i>	<i>C/C</i>	<i>B/D</i>	<i>B/F</i>	<i>A/B</i>	<i>D/F</i>	<i>C/C</i>
BJ3 (1993)	jelen	bílé	<i>A/B</i>	<i>A/H</i>	<i>C/C</i>	<i>A/D</i>	<i>B/E</i>	<i>B/C</i>	<i>D/F</i>	<i>C/C</i>
BJ11(1987)	laň	kombinované	<i>A/D</i>	<i>A/H</i>	<i>B/C</i>	<i>A/B</i>	<i>E/E</i>	<i>C/C</i>	<i>D/D</i>	<i>C/C</i>
BJ16(1999)	laň	bílé	<i>A/D</i>	<i>C/G</i>	<i>A/C</i>	<i>C/C</i>	<i>E/E</i>	<i>B/B</i>	<i>B/B</i>	<i>C/C</i>
BJ29(1998)	laň	kombinované	<i>A/C</i>	<i>B/H</i>	<i>A/B</i>	<i>C/C</i>	<i>D/F</i>	<i>A/B</i>	<i>D/D</i>	<i>A/D</i>
BJ32(1995)	laň	kombinované	<i>A/A</i>	<i>F/H</i>	<i>A/C</i>	<i>B/E</i>	<i>C/E</i>	<i>A/C</i>	<i>C/C</i>	<i>A/C</i>
BJ34(2000)	jelen	strakaté	<i>A/C</i>	<i>F/H</i>	<i>B/C</i>	<i>C/E</i>	<i>C/F</i>	<i>A/A</i>	<i>C/D</i>	<i>A/E</i>
BJ36(1995)	laň	strakaté	<i>A/A</i>	<i>H/H</i>	<i>A/C</i>	<i>C/D</i>	<i>C/C</i>	<i>B/C</i>	<i>D/D</i>	<i>A/C</i>
BJ52(1997)	jelen	převážně bílé	<i>A/E</i>	<i>A/H</i>	<i>A/B</i>	<i>C/D</i>	<i>A/C</i>	<i>A/C</i>	<i>B/D</i>	<i>A/F</i>
BJ64(2005)	jelen	červené	<i>A/C</i>	<i>E/F</i>	<i>B/C</i>	<i>C/C</i>	<i>E/F</i>	<i>A/C</i>	<i>D/E</i>	<i>C/E</i>
BJ66(2004)	laň	převážně bílé	<i>C/D</i>	<i>B/H</i>	<i>B/C</i>	<i>C/C</i>	<i>C/E</i>	<i>A/D</i>	<i>A/E</i>	<i>D/E</i>
BJ68(1998)	jelen	převážně bílé	<i>D/D</i>	<i>E/H</i>	<i>A/A</i>	<i>B/C</i>	<i>E/F</i>	<i>A/B</i>	<i>D/D</i>	<i>A/C</i>
BJ75(2003)	laň	převážně bílé	<i>A/D</i>	<i>C/F</i>	<i>A/C</i>	<i>E/E</i>	<i>C/E</i>	<i>A/A</i>	<i>C/E</i>	<i>A/E</i>

3. NÁVRH CHOVATELSKÝCH OPATŘENÍ

V této fázi výzkumu navrhujeme pro oboru Žleby zachování současného chovatelského přístupu s aplikací údajů mikrosatelitních analýz do chovu. V současné době lze ověřovat jedince s přesností 99,27% a 93,26% pomocí sestaveného MS panelu (nyní 8 lokusů). Bylo by vhodné toto procento zvýšit na 99,99% rozšířením panelu o další mikrosatelity. Za využití kombinace údajů z terénní evidenční karty o chovatelsky významných znacích (vyplňovaná oborníkem Ing. Nevolem) a identifikační karty jedince lze sestavovat chovné skupiny, které mohou plnit požadovaný chovatelský záměr (zvyšování podílu bíle zbarvených jedinců při zachování nebo zvýšení genetické diverzity a heterozygotnosti a při eliminaci negativních důsledků inbreedingu). Chovné skupiny lze sestavovat z jedinců již žijících nebo budoucího potomstva, které doporučujeme dále testovat MS panelem.

Na základě získaných výsledků lze nyní aktuálně doporučit do malé chovné skupiny jelena s převážně bílým zbarvením K10 (zde BJ52), laní Z14 s bílým zbarvením (zde BJ16) a Z31 s kombinovaným zbarvením (zde BJ32). Tito jedinci mají dobré genetické předpoklady pro zvýšení podílu genetické diverzity a heterozygotnosti při eliminaci inbreedingu a možnosti zvýšení počtu bíle zbarvených jedinců. Z genetického hlediska by do této skupiny byla vhodná (vhodnější než-li BJ32) také převážně bílá laň Z66 (zde BJ66), která však bohužel od prosince 2005 nežije.

Na závěr lze konstatovat, že dosavadní výsledky jsou prakticky použitelné pro řízenou reprodukci bílé jelení zvěře v oboře Žleby, ale i v ostatních oborách. Situaci v chovu žlebské populace by proto mohlo prospět další pokračování výzkumu. Z hlediska problematiky chovu této zvěře bude dále velmi přínosné, pokud se podaří navázat spolupráci s oborou Žehušice, kde proběhnou mikrosatelitní analýzy alespoň u vzorku populace. V neposlední řadě by bylo vhodné rozšířit testování bílé jelení zvěře v chovech Kopidlno a Janovice.

Touto cestou bychom rádi poděkovali Grantové službě LČR, s.p. za finanční podporu uzavřeného projektu a všem zúčastněným za spolupráci a cenné připomínky.

Projekt Grantové služby LČR

Využití mikrosatelitních analýz při šlechtění populace bílých jelenů u LČR, s.p.

Příloha č. 1: Ukázka vyplněné terénní evidenční karty

Registrační číslo	Jméno	Pohlaví		Datum narození	Datum úhynu
		samec	samice		
66			X	2004	XII/2005

Ušní známka			Zbarvení				Otec		Matka	
číslo	barva	pravá	levá	B	PB	S	K	Č	číslo	jméno
					X					

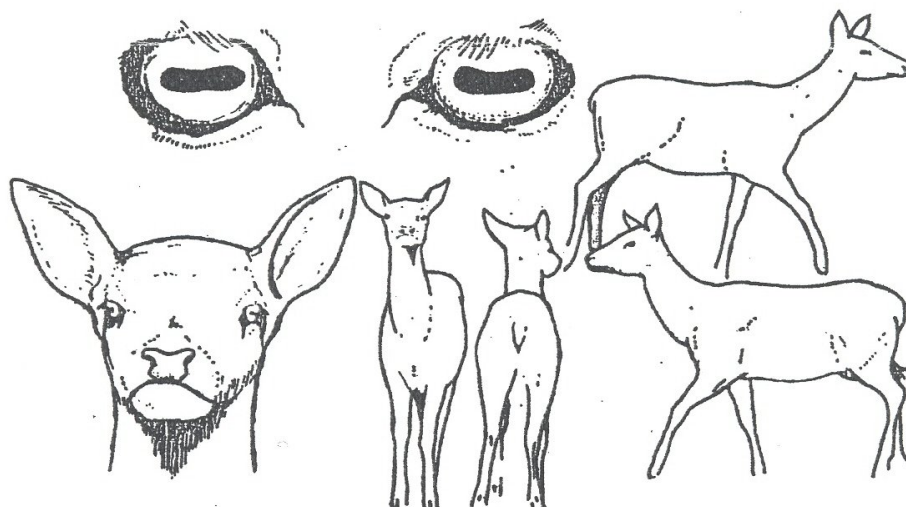
Vysvětlivky: B- bílá, PB- převážně bílá, S- strakatá, K- kombinovaná, Č- červená

Oční duhovka						Větník			Dolní ret		
pravá			levá			světlý	tmavý	kombinace	světlý	tmavý	kombinace
modrá	hnědá	kombinace	modrá	hnědá	kombinace			X			X

Maska			Hřívá			Krk			Úhoří pruh			Obřitek	
výrazná	nevýrazná	chybí	výrazná	nevýr	chybí	bílý	rezavý	červený	po celé délce	ke kořeni krku	chybí	orámo vaný	neorámo vaný
X					X		X			X		X	

Spárky přední						Spárky zadní						Paspárky přední						Paspárky zadní					
pravý			levý			pravý			levý			pravý			levý			pravý			levý		
s	t	k	s	t	k	s	t	k	s	t	k	s	t	k	s	t	k	s	t	k	s	t	k
X			X			X			X			X			X			X			X		

Vysvětlivky : s - světlý, t - tmavý, k - kombinace



Poznámka : Páma 12.12.05

Příloha č. 2: Základní členění databanky na příkladu vybraného jedince (výběr z obsahu databanky)

Evidence jelenů - [Kartoteka]				
Program Evidence Okna Nápořěda				
Reg. číslo	Jméno	Dat. narození	Pohlaví	Zbarvení srsti
BJ1		1.1.2002	Samec	Převážně bílá
BJ10		1.6.1998	Samec	Převážně bílá
BJ11		1.1.1987	Samice	Kombinovaná
BJ12		1.6.1998	Samec	Převážně bílá
BJ13		1.1.1997	Samice	Kombinovaná
BJ14		1.1.1988	Samice	Bílá
BJ15		1.1.1989	Samice	Bílá
BJ16		1.6.1999	Samice	Bílá
BJ17	Bakule	1.1.1995	Samec	Bílá
BJ18		1.1.1992	Samice	Bílá
BJ19	Běloušek	1.9.1994	Samec	Bílá
BJ2		1.1.2002	Samec	Strakatá
BJ20		1.1.1999	Samice	Kombinovaná
BJ21		1.1.1997	Samice	Převážně bílá
BJ22		1.1.2000	Samice	Strakatá
BJ23		1.1.2000	Samec	Převážně bílá
BJ24		1.1.1998	Samec	Převážně bílá
BJ25		1.1.1994	Samice	Kombinovaná
BJ26		1.1.1995	Samice	Bílá
BJ27		1.1.1998	Samice	Kombinovaná
BJ28		1.1.1998	Samice	Kombinovaná
BJ29		1.1.1998	Samice	Kombinovaná
BJ3	Skokan	1.6.1993	Samec	Bílá
BJ30		1.1.1998	Samice	Převážně bílá
BJ31		1.1.1993	Samice	Převážně bílá
BJ32		1.1.1995	Samice	Kombinovaná
BJ33		1.1.1998	Samice	Kombinovaná
BJ34		1.1.2000	Samec	Strakatá
BJ35		1.1.1998	Samec	Bílá
BJ36		1.1.1995	Samice	Strakatá
BJ37		1.1.2003	Samice	Červená
BJ38		1.1.2003	Samice	Červená
BJ39		1.1.2003	Samec	Červená
BJ4	Flek	1.6.1995	Samec	Kombinovaná
BJ40		1.1.2004	Samice	Převážně bílá

Projekt Grantové služby LČR
Využití mikrosatelitních analýz při šlechtění populace bílých jelenů u LČR, s.p.

Evidence jelenů - [Identifikační karta (BJ19 - Běloušek)]

Program Evidence Okna Nápověda

Základní identifikace | Evidence dalších znaků | Potomstvo | Vzhled | Poznámky | Mikrosatelity | Paroží | Genealogická linie

Základní informace

Registrační číslo: BJ19 Pohlaví: Samec
Označení: Z17 Jméno: Běloušek
Ušní cejch: Místo:

Zbarvení

Srst: Bílá Větník: Kombinovaná
Oční duhovka L: Hnědomodrá Pravá: Hnědomodrá
Spárky přední L: Světlá Pravý: Světlá
Spárky zadní L: Světlá Pravý: Světlá

Datum narození: 01.09.1994 15 Odlovu: 15 Úhynu: 15
Zařaz. do chovu:

Rodiče

Otec: Matka:

Tisk Uložit Zavřít

Start Total Comma... 2 Microsoft... 2 Microsoft... Jelev 2 Internet ... CS 11:40