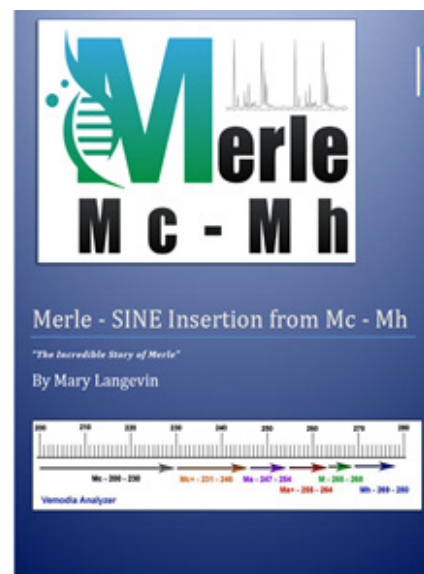


Louisiana Catahoula – není merle jako merle

Během roku 2018 došlo v oblasti výzkumu merle genu k velkému posunu našich znalostí. Po letech mlčení se téměř ve stejnou dobu objevily na toto téma tři zásadní články ve vědeckých časopisech, aby se pokusily přinést dlouho očekávané odpovědi na některé otázky, co stále trápí chovatele plemen, nesoucích merle gen. Autoři těchto článků pocházejí z různých laboratoří; nezávisle na sobě se však více či méně vědomě pokusili reagovat na iniciativu Mary Langevin, která od r. 2015 obnovila široké testování merle genu (a také genů pro další barvy či lokusy ovlivňující barvy) u louisianského leopardího psa. Výsledky svého výzkumu zveřejnila ve své e-knize „Genetika barev catahouly – Malujeme portrét“, která vyšla v r. 2016 (nyní se pracuje na její nové verzi). Výsledky, zpracované v této knize, navázaly na naši pionýrskou práci z r. 2011 s laboratorio Biofocus, jejíž výsledky jsou shrnuty v mém předchozím článku „Louisiana Catahoula – skutečné merle plemeno“, který vyšel ve Světě psů (1/2012) nebo je na <http://www.catahoulaclub.eu/clanky/louisiana-catahoula-skutecne-merle-plemeno/>.



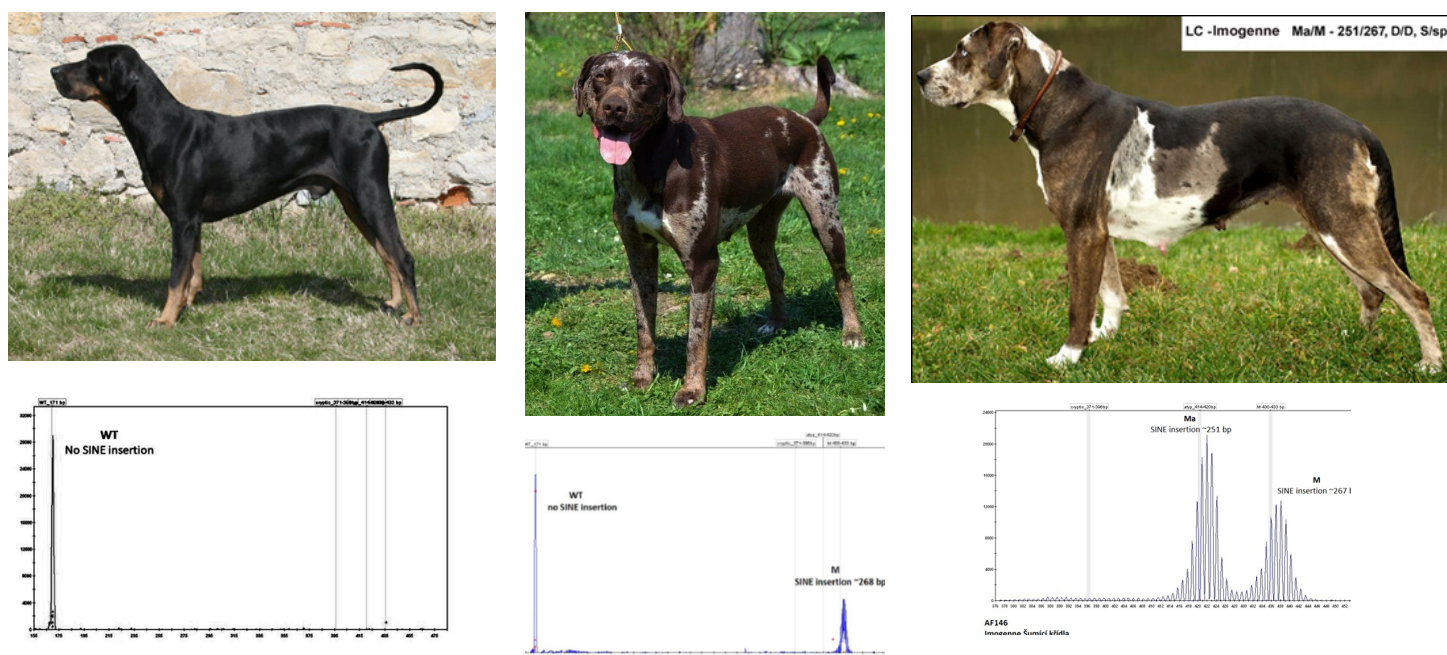
Mary Langevin se pustila, s vervou jí vlastní, do dalšího výzkumu a podnítila tak nový zájem o tuto problematiku u těch, kdo se tomu z nějakého důvodu přestali na čas věnovat, tj. mimo jiné také u A. L. Clark, která *SILV* (nebo *PMEL*) gen a jeho souvislost s merle zbarvením objevila v r. 2006. Tentokrát však testování zahrnuje různá plemena, která merle nesou, což umožnilo najít zákonitosti, platné pro všechny. Výsledky, získané během r. 2018, shrnula Mary Langevin v našem společném vědeckém článku ve spolupráci s laboratorio Vemodia (Langevin *et al.* 2018) a pak také ve své nové e-knize: „Merle SINE inserce od Mc do Mh. – Úžasný příběh merle“, která právě vychází i v českém překladu. V této publikaci se kromě jiného můžete také dozvědět podrobnosti, proč nelze brát tak úplně vážně některé závěry článků, které pocházejí od skupiny Clark (Murphy *et al.* 2018) a laboratoře Paw Print Genetics (PPG, Ballint *et al.* 2008).

Všichni se však shodneme na tom, že existuje merle alela, **M^h – harlekýn merle**, která má delší poly-A konec v SINE inserci než normální M a přináší obecně do chovu více bílé a s tím související zdravotní problémy. Další shoda panuje v tom, že merle gen se poměrně často projevuje **mozaicismem**, tj. že se u daného jedince vyskytují více než normálně jen dvě alely, z nichž každá by měla být po jednom z rodičů. Všechny tyto laboratoře dospěly také k závěru, že existuje více merle alel, které se liší délkou poly-A konce SINE, nicméně tady nepanuje shoda v tom, kolik jich lze odlišit, ani v jakém rozmezí párů bází se která alela pohybuje. Oběma výše zmíněným článkům (tj. Murphy *et al.* 2018, Ballint *et al.* 2018) se **nepodařilo** prokázat bez pochybností, že existuje **prodlužování** či **zkracování** poly-A konce v SINE mezi generacemi, a také nedokázaly určit a přiřadit bezpečně některé fenotypy k příslušným genotypům, což byl asi jejich původní záměr. Jedním z hlavních důvodů tohoto neúspěchu bylo to, že se obě tyto laboratoře soustředily výhradně na heterozygoty merle (m/M), což jim zcela znemožnilo určit další merle alely, které lze od sebe odlišit zejména díky jejich projevům v kombinaci s jinou merle alelou (homozygotní merle). Protože merle je „neúplně dominantní“, jedna alela nedominuje úplně té druhé a záleží na tom, které dvě alely každý pes zdědí; to vytvoří středně silnou expresi nebo také zcela odlišný vzor, což můžeme vidět na řadě příkladů uvedených v Langevin *et al.* i e-knize Mary Langevin. Závěry výše zmíněných laboratoří, týkající se jednotlivých merle alel a možnosti

jejich prodlužování či zkracování, jsou nepřesvědčivé. U mnoha příkladů, které uvedli, se již mezitím podařilo objasnit skutečný stav s pomocí výsledků dalšího testování ve Vemodii. Většinou byl problém v tom, že u některých rodičů nebyly během původního testování detekovány minoritní alely, které pak potomek zdědil. Nicméně další popularizační materiály, které např. laboratoř PPG od té doby vydala, pokračují v uvádění zavádějících vysvětlení, což ponechává dveře otevřené dalším nepodloženým spekulacím, zejména ohledně možnosti velkých změn délek poly-A konce u jednotlivých alel a projevů např. M^c alely. To je bohužel případ i řady dalších laboratoř, které merle gen testují. Lze tak i dnes získat informace nepřesné a již překonané současnými výsledky testování ve Vemodii. Zatím se nepodařilo prokázat, že by se jakýkoliv poly-A konec, který obsahují všechny merle alely, mohl zkrátit až na m, tj. ne-merle. A už vůbec to neplatí v opačném směru, tj. že by se z ne-merle, m, stalo merle, jakékoliv M. Většina změn probíhá v jednotkách párů bází a směřuje spíše ke zkracování této části SINE inserce. Ale další testování, zejména u některých sporných případů, nám může v budoucnosti tuto otázku zodpovědět bez dalších pochybností.

Nám se s Mary Langevin, ve spolupráci s laboratoří Vemodia, podařilo zatím nejlépe objasnit některé zákonitosti, týkající se merle a jeho projevů (Langevin *et al.* 2018). Rozlišení na jednotlivé alely na M lokusu a k nim přiřazený rozsah počtu párů bází bylo provedeno zejména s ohledem na chovatele, aby mohli lépe předvídat výsledné fenotypy ve svém chovu. Ostatně celý náš článek a e-kniha od Mary Langevin byla vedena snahou objasnit tuto problematiku zejména chovatelům, kteří jsou ti první, kdo jsou konfrontováni s výsledky jejich vlastního chovu. Nechci obecně zpochybňovat výsledky jiných laboratoř, ale bez úzké spolupráce s chovatelem nelze žádný zásadní výzkum v této oblasti provádět. To teď také dokazují závěry, ke kterým dospěly obě výše zmíněné laboratoře, když ze svého uvažování předem vytrídily jedince, kteří by jim, podle jejich mínění, mohli výsledky zkomplikovat (viz výše).

Obr. 1. Příklad ne-merle (m/m), klasického merle (m/M) a patchwork (M^a /M) leoparda



M lokus a jeho alely

Poznatky, které dále uvádím, vycházejí z výsledků našeho společného článku, Langevin *et al.* 2018, a knihy Mary Langevin, která vyšla v říjnu 2018.

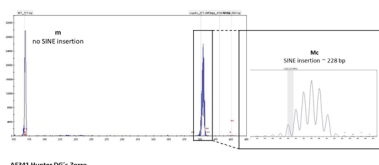
V této chvíli můžeme rozeznat na M lokusu 7 alel. Kromě **m** alely (ne-merle), která neobsahuje SINE inzerci v *SILV* genu, ji všechny další mají, ale liší se od sebe délkou poly-A konce, udávanou počtem párů bází. Čím delší je tato část (tj. poly-A konec), tím více se projevuje merle vzor ve fenotypu daného jedince, zejména v kombinacích s jinou merle alelou. Podle zvyšujícího se počtu párů bází (dále jen bp) a příslušných projevů ve fenotypu můžeme celé zjištěné kontinuum délek poly-A konce od 200–280 bp rozdělit do několika následujících alel: M^c – **kryptické merle** (200–230 bp), M^{c+} – **kryptické merle +** (231–246 bp), M^a – **atypické merle** (247–254 bp), M^{a+} – **atypické merle +** (255–264 bp), **M** – **merle** (265–268 bp) a M^h – **harlekýn merle** (269–280 bp). M^{c+} a M^{a+} jsou kromě M^h nejnovějším příspěvkem našeho výzkumu. Aktuální délka poly-A konce SINE

určuje, zda bude výsledný fenotyp daného jedince podobnější tomu, co je typické pro předchozí či následující alelu. Obecně lze říci, že heterozygoti m s M^c , M^{c+} , M^a i M^{a+} (m/M^c , ...) vypadají jako celobarevní a nemají patrný žádný merle vzor. Ale kromě M^c , které se **neprojevuje jako merle** ani v kombinacích s jinými alelami, se ostatní projevují typickými merle fenotypy tak, jak je popisuje výše zmíněná publikace. Přítomnost M^{c+} nebo M^{a+} se typicky projevuje málo výrazným merle vzorem, matnými barvami a často bronzovým či hnědavým nádechem srsti. Projevy se ale trochu liší u dlouhosrstých plemen.

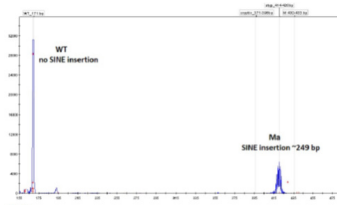
Obr. 2. Příklady leopardů, kteří mají M^c , M^{c+} , M^a , M^{a+} alely a jejich kombinace



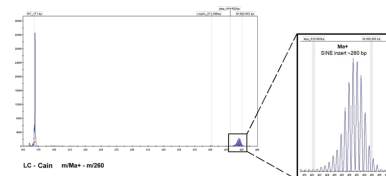
m/M^c – m/228



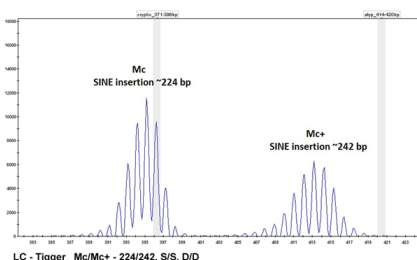
m/M^a – m/249



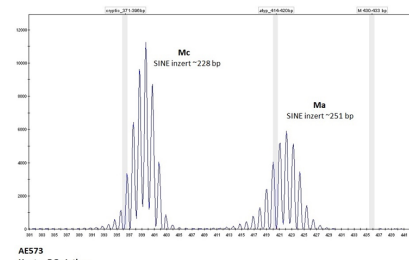
m/M^{a+} – m/260



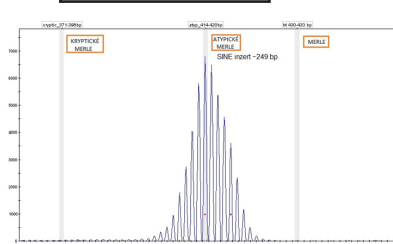
M^c/M^{c+} – 224/242



M^c/M^a – 228/251



M^a/M^a – 245/245

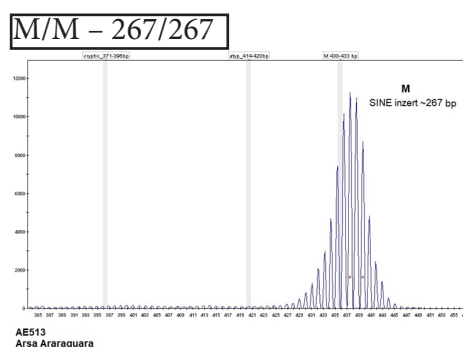
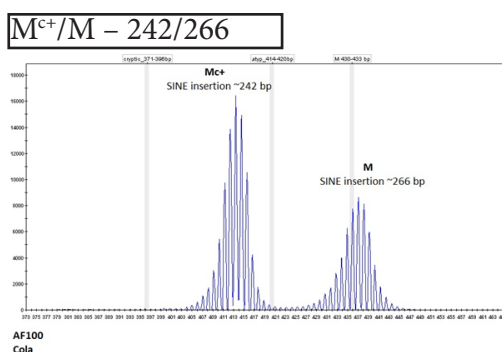
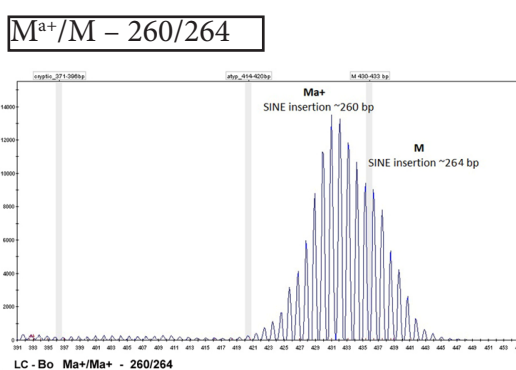
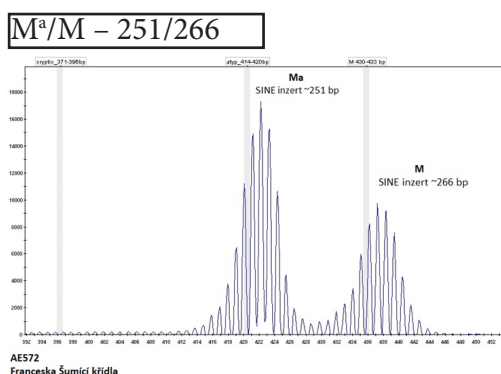


Alely se velmi často dědí přesně se stejnou délkou poly-A konce i přes několik generací, takže se jeví jako poměrně stabilní, na rozdíl od dřívějších představ o tom, že merle SINE inserce je stabilní málo. Pokud rozdíl mezi generacemi není větší než 2 bp, tak to lze pokládat za rozumnou odchylku. V případě, že se liší o více než 3 bp, tak to lze již považovat za novou mutaci, anebo je třeba u rodičů hledat nějakou minoritní alelu (viz dále), kterou potomek zdědil po některém z nich.

Pro chovatele je asi nejdůležitější vědět, které kombinace merle alel přináší bílou barvu (*de facto* nedostatek pigmentu), což je často spojeno s rizikem vad sluchu i zraku. Tyto kombinace se projevují nárůstem bílých

ploch v srsti: M^{c+}/M^{a+} , M^{a+}/M^{a+} , M^{c+}/M , M^a/M , M^{a+}/M , M/M , m/M^h , M^c/M^h , M^{c+}/M^h , M^a/M^h , M^{a+}/M^h , M/M^h , M^h/M^h . Obecně lze říci, že se to týká téměř všech kombinací, kde se nachází M^h .

Obr. 3. Příklady leopardů s kombinacemi alel, které přináší více bílé



M^h – harlekýn merle

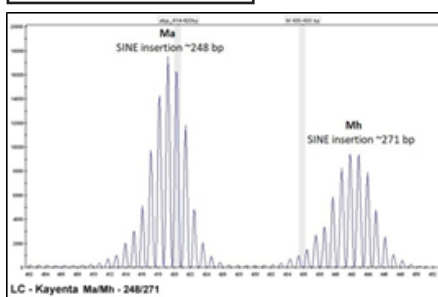
Nejdělsí poly-A konec SINE inserce se vyskytuje u alely, která obecně přináší do chovu ještě více bílé než normální M. Nicméně ne u všech psů je na první pohled jasné, že ji nesou. Lze odlišit tři základní projevy: a) minimální merle (více či méně jednobarevný s menším podílem bílých ploch), b) klasický merle fenotyp

s větším podílem bílé a c) normální merle jedinci bez větších ploch bílé, kteří však produkují potomky s fenotypy popsány pro předchozí dva případy s podílem bílé. Catahoula není plemeno, kde jsou nosiči M^h velmi rozšíření, alespoň podle současných výsledků. Zdá se, že M^h se mnohem častěji vyskytuje u australského ovčáka či australské koolie, ale teprve další testy nám to mohou potvrdit. Zatím je však jasné, že nosiči tohoto genu trpí častěji vadami, uváděnými ve spojitosti s merle genem či obecně s bílou barvou, tj. vadami sluchu a zraku. M^h alela je zřejmě také nejméně stabilní a častěji podléhá mutacím, které se většinou projevují spíše zkracováním poly-A konce a vznikem alel s menším počtem bází v této části SINE inserce. To je také příčinou vzniku mozaicismu, dalšího převratného objevu na poli merle genu.

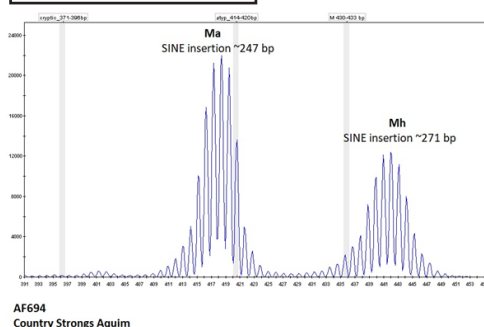
Obr. 4. Příklady leopardů, kteří mají harlekýn merle – M^h



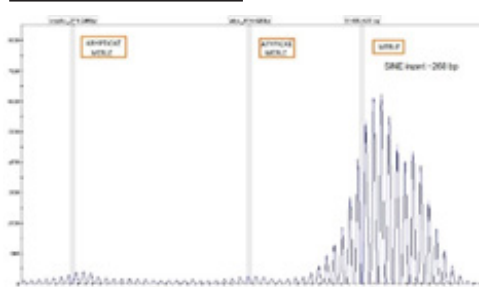
$M^a/M^h - 248/271$



$M^a/M^h - 247/271$



$M/M^h - 268/270$

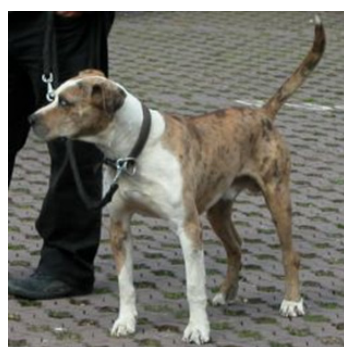


Mozaicismus merle

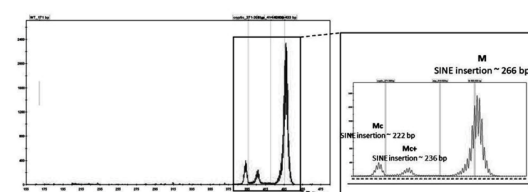
Tento jev nám potvrdilo až testování s Vemodií. Výsledky předchozích testů v Biofocusu či Laboklinu nám o tom bohužel nepřinesly žádné informace, i když tam na tento jev pravděpodobně také narazili, protože se nám řada vzorků vracela s tím, že došlo ke jejich kontaminaci či znehodnocení.

Mozaicismus merle genu je poměrně častý, podařilo se nám ho potvrdit v ca. 17% všech testovaných vzorků. Ve výsledcích merle testů je důkazem tohoto jevu větší počet merle alel než jsou normálně dvě, každá z nich by měla pocházet od jednoho z rodičů. K mozaicismu dochází během embryonálního vývoje, kdy v některé z buněk dojde během dělení k mutaci (většinou to je zkrácení poly-A konce), která se v části množících se buněk dále namnoží, zatímco ostatní buňky mohou nést kombinaci původních alel, zděděných po obou rodičích. Celý organismus tak může obsahovat jak buňky mutované, tak ty s původní kombinací alel po rodičích. Pokud

Obr. 5. Příklady leopardů, kteří mají mozaiku. V tomto případě jde o tři po sobě jdoucí generace. První pes, zakladatel této linie, má výrazný tvídový vzor na uchu. Tvíd je jedním z možných projevů mozaiky.



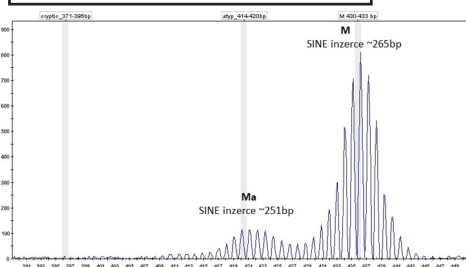
$$[M^c]/[M^{c+}]/M/M - [228]/[236]/266/266$$



1. generace



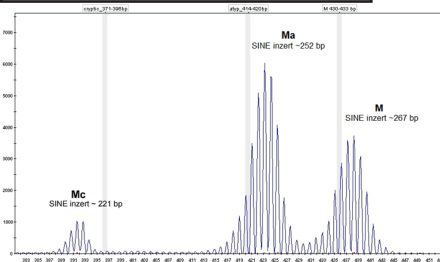
$$[M^a]/M/M - [251]/265/265$$



2. generace



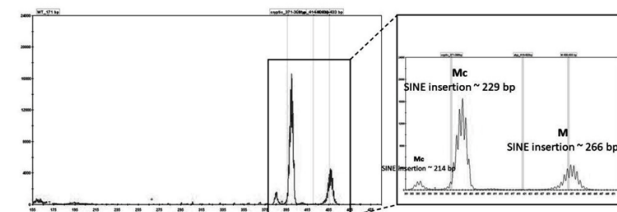
$$[M^c]/M^a/M - [221]/252/267$$



3. generace



$$[M^c]/M^c/M - [214]/229/266$$



3. generace

dojde k mutaci ve velmi raném stádiu embryogeneze, může to postihnout nejen buňky somatické, ale i buňky pohlavní (spermie a vajíčka). To lze u psů ověřit jen v případě samců, kdy můžeme použít vzorek semene jako testovaný materiál. U fen to však použít nelze, takže to nám pak dost komplikuje situaci, když se objeví u potomků nějaká nevysvětlitelná alela.

Z hlediska jednotlivých psů se somatická mozaika může projevit zejména na jejich fenotypu, který to může i dost ovlivnit. Projevy merle genu jsou tkáňově specifické, takže různé kombinace merle alel lze objevit především na srsti a vzoru, který na něm tvoří. Zastoupení jednotlivých alel může být u psů s mozaikou různé. Většinou se mutovaná alela objevuje ve výsledcích jako „minoritní“ (a je uvedena v hranaté závorce, např. $m/[M^c]/M$), ale někdy se může namnožit natolik, že se z ní stane „majoritní alela“, která je ve vzorku zastoupena více než ta původní alela zděděná po rodičích. Pro lepší pochopení této problematiky rozhodně doporučuji e-knihu od Mary Langevin, kde je této záležitosti věnována velká pozornost a je tam uvedena řada příkladů.

V této chvíli nás trápí ještě otázka, jak je tendence tvořit mozaiku dědičná. To musíme ještě vyřešit. Zatím se to jeví tak, že v liniích a rodinách, kde se tento jev objeví, existuje asi větší pravděpodobnost, že ji budou

vykazovat i někteří potomci. Možná ne všichni, ale někteří určitě, to už teď víme. Tuto hypotézu však bude třeba potvrdit dalším testováním, zejména v těch liniích, kde již byla zjištěna.

Mozaika merle nemá na využití psa či feny v chovu žádný vliv, ale je dobré tuto informaci mít dříve, než objevíme v porodnici štěně, které vypadá, že tam po daných rodičích nepatří. Pokud toto již nastane, je dobré udělat nejen merle testy obou rodičů i potomků, ale i testy parentity, které vyloučí další možnosti, např. jiného otce.

Jaké vzorky na testování merle odebírat a kde a proč testovat

Na to neexistuje jednoznačná odpověď. Pro testování jsme odebírali nejen bukální stěry a krev, ale také chlupy a od samců semeno. Pro chov je asi nejdůležitější vědět, co jedinec do chovu přináší, což lze zcela jednoznačně zjistit ze vzorků semene od samců. Nicméně tuto možnost u fen nemáme, takže tam lze volit jen některou z výše zmíněných možností. Problém ovšem je, že ani v jednom z těchto materiálů se mozaika prokázat nemusí, i když poměrně často ji lze identifikovat zejména z chlupů, vytržených i s kořínky.

Testovat lze v každé specializované laboratoři, která dokáže přesně stanovit a uvést ve výsledcích počet párů bází v poly-A konci SINE v *SILV* genu, má zkušenost s rozlišením merle alel, které mají velmi blízký počet bp, uvádí i výsledky s mozaikou a je schopná zpracovat různé typy vzorků. Pro nás to v ČR rozhodně splňuje **Vemodia**, kde lze také vyjednat rozumné podmínky a ceny pro chovatelské kluby. Výhodou je také, že v rámci výsledků dodávají nejen certifikáty, ale i chromatogramy, ze kterých lze odhadnout, jak je velká frakce např. minoritních alel. To je někdy důležité např. pro vysvětlení odchylek od očekávaného fenotypu.

Proč testovat, to je otázka, kterou si jistě řada majitelů položí. Pro chovatele je odpověď asi jednodušší a zmínila jsem ji už výše, je to jedna ze znalostí, kterou by chovatel měl mít, než pustí daného jedince do chovu. Nicméně i majitelé, kteří se chovat nechystají, mohou mít jedince z linie, která mozaiku nese, nebo se u jeho sourozenců či rodičů objevují výsledky, které je třeba vysvětlit. Pak je spolupráce s ostatními nezbytná. Financování testů je v současné době klubem částečně dotováno a také se podařilo vyjednat u Vemodie slevu pro členy klubu, takže to by mělo povzbudit ty, kteří nám chtějí pomoci vyřešit otázky, na které zatím jednoznačnou odpověď neznáme.

RNDr. Helena Synková, CSc.

Děkujeme všem majitelům, kteří nám poskytli výsledky a fotografie svých psů.

Literatura:

Ballif BC, Ramirez CJ, Carl CR, Sundin K, Zahand A, Shaffer LG, Flores-Smith H.: The PMEL Gene and Merle in the Domestic Dog: A Continuum of Insertion Lengths Leads to a Spectrum of Coat Color Variations in Australian Shepherds and Related Breeds. – Genetic Veterinary Sciences, 2018.
Paw Print Genetics <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30071510> PMID: 30071510 DOI: 10.1159/000491408.

Mary Langevin, Helena Synkova, Sona Pekova and Tereza Jancuskova: Merle phenotypes in dogs - SILV SINE insertions from Mc to Mh. – PLoS ONE 13(9): e0198536, 2018.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0198536>.

Sarah C. Murphy, Jacquelyn M. Evans, Kate L. Tsai and Leigh Anne Clark: Length variations within the Merle retrotransposon of canine PMEL: correlating genotype with phenotype. – Mobile DNA (2018) 9: 26
<https://doi.org/10.1186/s13100-018-0131-6>.