



Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego

w Warszawie

Instytut Nauk o Zwierzętach

Paulina Karylla Jundziłł-Bogusiewicz

Analiza zmienności fenotypowej i genetycznej polskiego spaniela myśliwskiego

Analysis of phenotypic and genetic variation
in Polish Hunting Spaniel

Rozprawa doktorska

Doctoral thesis

Rozprawa doktorska wykonana pod kierunkiem

dr hab. Joanny Gruszczyńskiej, prof. SGGW

Katedra Genetyki i Ochrony Zwierząt

Instytut Nauk o Zwierzętach

Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

Promotor pomocniczy

dr inż. Beata Grzegorzółka

Katedra Genetyki i Ochrony Zwierząt

Instytut Nauk o Zwierzętach

Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

Warszawa, 2025

Oświadczenie promotora rozprawy doktorskiej

Oświadczam, że niniejsza rozprawa została przygotowana pod moim kierunkiem i stwierdzam, że spełnia warunki do przedstawienia jej w postępowaniu o nadanie stopnia naukowego doktora.

Data 29.10.2025

Czytelny podpis promotora



Oświadczenie autora rozprawy doktorskiej

Świadom/a odpowiedzialności prawnej, w tym odpowiedzialności karnej za złożenie fałszywego oświadczenia, oświadczam, że niniejsza rozprawa doktorska została napisana przez mnie samodzielnie i nie zawiera treści uzyskanych w sposób niezgodny z obowiązującymi przepisami prawa, w szczególności z ustawą z dnia 4 lutego 1994 r. o prawie autorskim i prawach pokrewnych (tj. z dnia 28 października 2022 r., Dz.U. z 2022 r. poz. 2509 ze zm.)

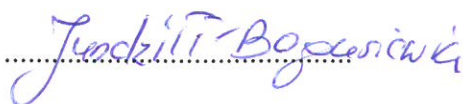
Oświadczam, że przedstawiona rozprawa nie była wcześniej podstawą żadnej procedury związanej z uzyskaniem stopnia naukowego doktora.

Oświadczam ponadto, że niniejsza wersja rozprawy jest identyczna z załączoną wersją elektroniczną.

Przyjmuję do wiadomości, że rozprawa doktorska poddana zostanie procedurze antyplagiatowej.

Data 29.10.2025

Czytelny podpis autora rozprawy



Podziękowania

Pragnę złożyć serdeczne podziękowania Pani dr hab. Joannie Gruszczyńskiej, prof. SGGW za nieocenioną pomoc, nieustające wsparcie, nie tylko naukowe, wyrozumiałość i motywację, które bardzo mi pomogły. Dziękuję za możliwość rozwoju pod Pani skrzydłami.

Dziękuję także dr inż. Beacie Grzegorzólcze za pomoc w przeprowadzeniu analiz, słowa wsparcie i cenne wskazówki.

Dziękuję Marlenie, Marcie i Asi za pomoc zawsze wtedy, gdy jej potrzebowałam, liczne konsultacje i dobre słowo. Dziękuję, że mogłam na Was liczyć.

Pragnę podziękować także mojej rodzinie, bez której nie byłoby mnie w tym miejscu. Mojemu Mężowi, że zawsze wspierał mnie w tym co robię i dbał, żebym mogła realizować marzenia. Moim dzieciom: Damianowi, Szymonowi i Wiktorii, którzy z pokładem ogromnej cierpliwości, dzielnie towarzyszyli i pomagali mi podczas realizacji pracy doktorskiej. Oraz moim Rodzicom, którzy zawsze wspierają mnie w moich decyzjach i którzy mocno kibicowali mi na drodze naukowej.

Podziękowania kieruję, także do hodowców i właścicieli psów rasy polski spaniel myśliwski, którzy zgodzili się na udział ich psa w badaniach. To dzięki Państwa zaangażowaniu mogła powstać ta praca. W szczególności Pani Alicji Kruszewicz i Dorocie Barskiej-Baranowskiej za wsparcie, cenne wskazówki i liczne rozmowy oraz możliwość poznania polskich spanieli myśliwskich.

Spis treści

Summary	9
1. Wstęp	13
2. Przegląd piśmiennictwa	
2.1. Polski spaniel myśliwski – rys historyczny	15
2.1.1. Procedura uznania rasy przez FCI	17
2.1.2. Polski spaniel myśliwski – stan obecny populacji	20
2.2. Zmienność fenotypowa u zwierząt, ze szczególnym uwzględnieniem psów	22
2.3. Wskaźniki i parametry opisujące zmienność genetyczną na podstawie analizę rodowodowej	23
2.4. Charakterystyka wybranych chorób genetycznych	27
2.4.1. Gen <i>PRCD</i> i postępujące zwyrodnienie czopków i pręcików - komórek siatkówki	28
2.4.2. Gen <i>RPGRIP1</i> - dystrofia czopkowo-pręcikowa typu 1	32
2.4.3. Gen <i>PFKM</i> i enzym fosfofruktokinaza	34
2.4.4. Gen T-box	36
3. Cel pracy	39
4. Zakres pracy	40
5. Hipotezy badawcze	41
6. Materiał:	
6.1. Analiza fenotypowa	42
6.2. Analiza rodowodowa	43
6.3. Anlizy laboratoryjne	44
7. Metodyka badań	
7.1. Analiza zmienności fenotypowej	45
7.2. Analiza rodowodowa- tworzenie „mapy kojarzeń”	48
7.3. Analiza molekularne	
7.3.1. Izolacja DNA	49
7.3.1.1. Protokół izolacji DNA z cebulek włosów	49
7.3.1.2. Protokół izolacji DNA z krwi obwodowej	51
7.3.2. Sprawdzenie czystości i stężenia DNA za pomocą NanoDrop ND-2000	51
7.3.3. Rozdział elektroforetyczny DNA w 1% żelu agarozowym	52

7.3.4. Warunki termiczne i komponenty łańcuchowej reakcji polimerazy (ang. <i>Polymerase Chain Reaction</i> – PCR)	
7.3.4.1. PCR – sekwencje mikrosatelitarne	52
7.3.4.2. PCR – badania zmienności regionu kontrolnego mitochondrialnego DNA oraz nosicieli wybranych 5 mutacji w 4 badanych genach (<i>PRCD</i> , <i>RPGRIP1</i> , <i>PFKM</i> , <i>T-BOX</i>)	57
7.3.5. Rozdział elektroforetyczny DNA w 1,5% żelu agarozowym	61
7.3.6. Oczyszczanie produktów PCR	61
7.3.7. Sekwencjonowanie metodą Sangera	62
7.3.8. Trawienie produktów PCR wybranymi enzymami Restrykcyjnymi	63
7.3.9. Testy genetyczne identyfikujące mutację w genach <i>PFKM</i> i <i>T-BOX</i>	63
7.3.10. Rozdział elektroforetyczny produktu PCR trawionego enzymem restrykcyjnym w 10% żel poliakrylamidowy	65
7.3.11. Barwienie srebrem fragmentów DNA w żelu Poliakrylamidowym	65
7.4. Analizy statystyczne i bioinformatyczne	
7.4.1. Analizy statystyczne wykorzystane w badaniach zmienności fenotypowej.	66
7.4.2. Analizy statystyczne wykorzystane w badaniach zmienności genetycznej na podstawie informacji rodowodowej	66
7.4.3. Analiza statystyczna zmienności genetycznej z wykorzystaniem sekwencji mikrosatelitarnych	68
7.4.4. Analizy bioinformatyczne otrzymanych sekwencji po sekwencjonowaniu metodą Sangera	70
8. Omówienie i dyskusja wyników	
8.1. Analiza fenotypowa	72
8.2. Analiza rodowodowa	
8.2.1. „Mapa kojarzeń” – przedstawienie schematu kojarzeń oraz linii męskich i żeńskich polskiego spaniela myśliwskiego	87
8.2.2. Zmienność genetyczna populacji polskiego spaniela myśliwskiego na podstawie analizy rodowodowej	91

8.3. Analiza zmienności genetycznej badanej populacji polskiego spaniela myśliwskiego z wykorzystaniem markerów mikrosatelitarnych	
8.3.1. Liczba i frekwencja alleli sekwencji mikrosatelitarnych	99
8.3.2. Liczba i frekwencja genotypów pod względem sekwencji mikrosatelitarnych	107
8.4. Analiza zmienności sekwencji pętli D-loop mitochondrialnego DNA	115
9. Identyfikacja mutacji	
9.1. Mutacja c.5G>A w genie <i>PRCD</i>	123
9.2. Mutacja insercji 44pz w genie <i>RPGRIP1</i>	127
9.3. Mutacja c.550 C>T w genie <i>PFKM</i>	129
9.4. Mutacja c.2228 G>A w genie <i>PFKM</i>	130
9.5. Mutacja c.189 C>G w genie <i>T-BO</i>	132
10. Wnioski	135
11. Bibliografia	137
12. Aneks	154

Summary

Analysis of phenotypic and genetic variation in Polish Hunting Spaniel

The Polish Hunting Spaniel (PHS) is a relatively young breed. While its history dates back to the 19th century, the breed was recreated in the 1980s thanks to the efforts and breeding work of Dr. Andrzej Krzywiński. Documents that have outlasted into the early 21st century provide information about the individuals selected for the initial matings, their ancestors, offspring, and subsequent breeding history. The breed's history includes information about the use of other spaniel breeds, such as the Brittany Spaniel and English Springer Spaniel, to recreate the PHS.

The main assumptions of this study are based on existing documents, published articles, oral histories, and the requirements set by the FCI (French: *Federation Cynologique Internationale*) for breed recognition. Three hypotheses were formulated: 1. Phenotypic variability within the Polish Hunting Spaniel breed is significant. 2. Genetic variability within the breed population is low. 3. During the creation of the PHS breed, individuals from the founding breeds carried mutant alleles that cause genetic diseases.

Phenotypic analysis involved taking zoometric measurements of 85 individuals (29 dogs and 56 bitches) over 1 year of age. Based on the scientific literature and consultations with breeders, 14 body parts were selected for measurement. Six of the 14 measurements concerned the head, six concerned the trunk, and the remaining two concerned other body regions: wrist circumference and neck length. Measurements were taken using a zoometric cane (2 of 14), a bow caliper (3 of 14), and a tape measure (9 of 14). The collected data on phenotypic traits were analyzed using Excel 2007 (Microsoft Office) and Statistica v.13 (StatSoft, 2013). The mean and parameters describing variability (standard deviation, median, quartile deviation) were estimated and statistical tests (Shapiro–Wilk, Levene, Mann–Whitney U, Welsh, ANOVA and Kruskal–Wallis) were performed to help assess the significance of the obtained results.

Using the Cervus 3.0.3 program (Marshall, 1998-2007; Kalinowski et al., 2007), the following were estimated in the studied breed: allele frequencies, coefficients: observed heterozygosity (H_O) and expected heterozygosity (H_E) (Ott, 1992), polymorphic information content (PIC) (Botstein et al., 1980); Test of the conformity of the genotype frequency distribution with the expected one (compliance with the Hardy–Weinberg Law). Using the ALFREQ program (Tereba and Tereba, 2005), the genotype frequency was calculated. Using the GENETIX 4.05 program (Belkhir i wsp., 1996-

2004), graphs (3D) were created based on the factorial correspondence analysis (FAA) (Benzècri, 1973). The molecular analyses performed allowed for the assessment of the genetic variability of the studied Polish Hunting Spaniel population. Using the STRUCTURE 2.3.4 program (Pritchard et al. 2000; Falush et al. 2003), a model for correlated allele frequencies was applied, 10000 burn-in steps and 100000 Markov-chain Monte Carlo (MCMC) repetitions were performed for different numbers of clusters (K=2-5). The analysis was performed in 10 iterations for each K value, which enabled analysis of the genetic structure of the population. The most probable number of clusters in the population was determined using the ΔK method (Evanno et al. 2005). The results were visualized using the CLUMPAK program (Kopelman et al. 2015).

Analysis of the variability of the hypervariable control region (D-loop) fragment of mtDNA was performed by amplifying the fragment and then Sanger sequencing the resulting PCR product. Sequence similarity analysis of mtDNA was performed using the following programs: BioEdit Sequence Alignment Editor 7.26 (Hall, 1999), Chromas 2.6.6 (Technelysium; 2018), Basic Local Alignment Search Tool (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), and Molecular Evolutionary Genetic Analysis MEGA 11.0.10 (Tamura et al., 2021). The isolated DNA will also be used to identify mutation carriers for selected genetic diseases. Due to the probable use of individuals from the following breeds in the development of the Polish Hunting Spaniel: Brittany Spaniel, Springer Spaniel, and Cocker Spaniel, it was likely that individuals with mutated alleles of certain genes causing genetic diseases were introduced into the Polish Hunting Spaniel breed. Genetic diseases that may occur in the Polish Hunting Spaniel were determined based on the scientific literature and included diseases known in other spaniel breeds. In total, four genes (*PFKM*, *RPGRIPI*, *PRCD*, and *T-box*) causing five genetic diseases (myopathy associated with anaemia, diseases associated with visual impairment, and diseases associated with a shortened caudal spine) were selected for analysis. Designed diagnostic tests, including polymerase chain reaction, PCR-RFLP, and sequencing, were used to identify carriers of mutated alleles causing a given genetic disease.

The entire study required significant awareness, involvement, and cooperation from PHS breeders.

The obtained results were divided into five parts:

I. Analysis of phenotypic variability - most of the selected measurements had higher mean and/or median values in males than in females, and significant inter-gender

correlations were observed for most parameters. However, the standard/quartile deviation indicates significant variability in height, length, and mass (chest circumference) of individual individuals of both sexes. Furthermore, when dogs and bitches were further divided into age groups, no significant statistical differences were found for most of the analysed measurements.

II, Pedigree analysis – estimated average relatedness in the studied PHS population was 23%, and the average inbreeding coefficient was 7%. The estimated inbreeding was relatively low, but the average relatedness indicates that most individuals in the population are closely related.

III. Microsatellite marker analysis – the average number of alleles per locus was 7.18. The observed (H_O) and expected (H_E) heterozygosity values were similar ($H_O = 0.646$, $H_E = 0.641$), indicating a lack of significant genetic imbalance. Most markers were highly polymorphic and suitable for genetic analysis. FCA analysis confirmed genetic similarity between males and females. However, STRUCTURE analysis revealed variation within the population, with the possibility of distinguishing 3-4 subpopulations.

IV. mtDNA analysis – 2 haplotypes were identified. Analysis of microsatellite sequences on the Y chromosome – 4 haplotypes were identified.

V. Analysis of mutation carriers: no individuals with the mutated allele(s) were found for 4 of the 5 diseases tested. The only heterozygotes and a homozygous recessive individual were found for the *PRCD* gene mutation.

The Polish Hunting Spaniel population is characterized by moderate phenotypic diversity and a high level of genetic variation with preserved genetic balance. Pedigree analysis revealed low inbreeding and moderate relatedness, and microsatellite markers testing confirmed high polymorphism and a stable genetic structure. Two mtDNA haplotypes, 4 haplotypes for microsatellite sequences located on the Y chromosome, and the presence of a mutated allele of the *PRCD* gene were detected in the studied Polish Hunting Spaniel population. The estimated effective population size of N_e was 296.87. Maintaining genetic variability at an appropriate level requires a well-designed breeding plan. This requires ongoing cooperation between breeders and supervision/care from the Polish Kennel Club.

To maintain appropriate genetic variability within the PHS population and the health of individual individuals, it is recommended to avoid close matings and to implement genetic testing within the breed to reduce the risk of genetic diseases in subsequent

generations. Furthermore, the PSM population should be continuously monitored to enable prompt corrective action.

The level of genetic variability in the Polish Hunting Spaniel population indicates the possibility for The Polish Kennel Club to seek 'provisional breed recognition' from the FCI.

Keywords: Polish Hunting Spaniel, mtDNA, microsatellite sequences, *PRCD*

1. Wstęp

Polski spaniel myśliwski (PSM) jest rasą, która w XX wieku była dość popularna głównie w kręgach polskiej arystokracji. Psy tej rasy często towarzyszyły myśliwym podczas polowań. Niestety okres wojenny mocno ograniczył liczbę osobników tej rasy. Po latach zapomnienia, dzięki pracy dr Andrzeja Krzywińskiego, polski spaniel myśliwski ponownie został wprowadzony do świata kynologii w Polsce. Obecnie psy tej rasy, uważane są za doskonałego psa aportującego i tropiącego. Oddane właścicielowi i nieustępliwe podczas polowań, znakomicie sprawdzają się także w roli domownika, ale z dużą potrzebą aktywności (Łakomik-Kaszuba, 2019).

PSM jest rasą jeszcze nieuznaną przez FCI (fr. *Fédération Cynologique Internationale*). Związek Kynologiczny w Polsce (ZKwP), będący członkiem FCI, odpowiada za postępowanie prowadzące do oficjalnego uznania nowych ras psa domowego. Procedura ta przebiega w trzech etapach i rozpoczyna się w chwili, gdy dana rasa zostaje zarejestrowana w ZKwP. W ciągu minimum piętnastu lat należy opracować i wdrożyć program hodowlany, który umożliwi wyodrębnienie ośmiu niezależnych linii hodowlanych, zwanych grupami rodzinnymi. Każda grupa powinna obejmować dwie samice i sześć samców pochodzących z dwóch odrębnych miotów, urodzonych w ciągu ostatnich pięciu lat. Pomiedzy grupami nie może występować pokrewieństwo do trzeciego pokolenia wstecz, co ma zapewnić odpowiednią zmienność genetyczną. Zamiast tworzenia takich grup istnieje również możliwość oszacowania efektywnej wielkości populacji, której wartości powinny zawierać się w zakresie od 50 do 100 lub więcej, aby rasa mogła zostać uznana za stabilną pod względem genetycznym.

Należy przedstawić FCI także wyniki badań związane ze statusem zdrowotnym oraz oceną zachowania i charakteru osobników w populacji, a także przygotować tymczasowy standard rasy. Dopiero wtedy można starać się o status „wstępnego uznania rasy”. W ciągu dziesięcioletniego okresu ZKwP i hodowcy muszą wspólnie dbać o rozwój rasy, począwszy od zwiększenia liczebności populacji, przez wyrównanie fenotypu, po udział w wystawach i innych wydarzeniach kynologicznych. Po spełnieniu wyżej wymienionych warunków i na wniosek ZKwP, specjalna komisja FCI przeprowadzi analizę fenotypu (wielkość i umaszczenie) co najmniej 60 osobników obu płci (załącznik nr 5 regulamin wewnętrzny FCI). Na mocy uchwały ZKwP od 1.01.2017 r. otwarta została Księga Wstępna (KW) dla polskiego spaniela myśliwskiego, co

zapoczątkowało długą drogę do ostatecznego jej uznania przez FCI.

Osobniki należące do rasy polski spaniel myśliwski muszą mieć wyrównany fenotyp, populacja powinna odznaczać się dużą zmiennością genetyczną, a należące do niej osobniki powinny zostać przebadane pod kątem możliwości występowania chorób, w tym chorób genetycznych, w celu określenia kondycji zdrowotnej populacji.

2. Przegląd piśmiennictwa

2.1. Polski spaniel myśliwski – historia rasy

Polski spaniel myśliwski (PSM) to stosunkowo młoda rasa psa domowego, której początki sięgają aż XIX wieku. Dzięki członkom znaczących polskich rodów, którzy pasjonowali się myślistwem i podróżowali po Europie, zostały importowane na tereny ówczesnych ziem polskich (będących pod zaborami) psy gończe, wyżły i charty, głównie angielskie rasy psów, a w mniejszym stopniu rasy francuskie. Często towarzyszyły im użytkowe teriery i spaniele. Importowane teriery wykorzystywano do tępienia gryzoni w stajniach i gospodarstwach dworskich oraz do polowań na lisy i borsuki. Z kolei spaniele spełniały różnorakie role: odaportowanie na lądzie i w wodzie, po płoszenie zwierzyny, a nawet użytkowane były jako psy do towarzystwa (Łakomik-Kaszuba, 2016, 2021, 2022). August Sztolcman na początku XX wieku pisał o różnych rasach spanieli użytkowanych a terytorium Polski. Zasugerował on, że rasy te ze względu na wszechstronne użytkowanie mogłyby zostać przekrzyżowane i mogłaby powstać jedna, wiodąca rasa (Łakomik-Kaszuba, 2016, 2021, 2022). Niewątpliwie propozycja Sztolcmana mogłaby się ziścić, gdyż z powodu małej liczby psów danej rasy utrudniane było prowadzenie hodowli w czystości rasy. Należy zauważyć, że ówczesnie ceniono psy głównie za walory użytkowe i właśnie wartość cech użytkowych odgrywała największą rolę przy doborze osobników do kojarzeń. Brat Augusta Sztolcmana, Jan, był właścicielem pierwszego w Polsce psa rasy norfolk spaniel (rasy włączonej po 1903 r. przez The Kennel Club -Wielka Brytania, do nowo tworzonej rasy angielski springer spaniel), zdobywcy złotego medalu na Wystawie Psów Rasowych w Warszawie w 1903r. Na kolejnych warszawskich wystawach psów pojawiały się także psy ras cocker i sussex spaniel (Łakomik-Kaszuba, 2016, 2021, 2022). Spaniele utrzymywane były również na odległej Syberii przez ród Koziell-Poklewskich. Inną słynną hodowlą była hodowla psów rasy springer spaniel z przydomkiem „Lwa” prowadzona na Polesiu przez księżną Izabellę Radziwiłłową. Do swojej hodowli księżna prowadziła wiele wartościowych psów tej rasy, m.in. championa Anglii i zwycięzcę Field Trials z 1930r. Rollicka of Harting oraz inne wybitne psy z angielskiej hodowli cockerów „Of Ware”. Hodowla przetrwała do 1939 r. Po wybuchu II wojny światowej spaniele te, podobnie jak psy z innych rejonów Polski zarekwirowano i wywieziono w głąb Rosji. Część z nich zginęła również w wyniku działań wojennych, a te, „które ocalały, wtopiły się w inne populacje psów

myśliwskich” – los ocalałych psów nie jest znany, jedynie domniemywa się, że zostały przygarnięte przez właścicieli lub hodowców innych, prawdopodobnie podobnych ras myśliwskich (Łakomik-Kaszuba, 2016, 2021, 2022).

Warto też wspomnieć o psach - spanielach, które mieszkały i polowały wraz z Prezydentem Rzeczypospolitej Polskiej, Ignacym Mościckim w Spale. Były to psy rasy cocker spaniel: o umaszczeniu czekoladowo-białym Tymek oraz czarna z przesianiem Nana i sussex spaniel – Rebus oraz Joy – sprawdzone prosto ze Stanów Zjednoczonych Ameryki. Symbolicznie, po ok. 80-latach, w 2015 to właśnie w Spale na festiwalu psów myśliwskich zadebiutowały psy rasy polski spaniel myśliwski. Kilkanaście osobników po raz pierwszy zaprezentowano szerszej publiczności (Łakomik-Kaszuba, 2016, 2021, 2022).

W latach 80. XX wieku dr Andrzej Krzywiński – przyrodnik, naukowiec, myśliwy i sędzia prób pracy - odwiedzał często w sprawach naukowych byłe Kresy Wschodnie, także uczestniczył w polowaniach. To właśnie na jednym z nich miał okazję zobaczyć psa w typie spaniela, podobnego do tych psów myśliwskich z dawnych ziem polskich, o jakich opowiadali myśliwi. Widział jak tepsy pracują, ich zrównoważenie i posłuszeństwo w pracy, zamykanie do wody oraz oddanie właścicielowi. Doktor Krzywiński zainteresował się tematem polskich spanieli, a ponieważ miał doświadczenie jako hodowca (prowadził hodowlę psów rasy: jamnik, łajka syberyjska i jagdterier z przydomkiem „z Szerokiego Boru”) zaczął poszukiwać do hodowli odpowiednich psów w typie polskiego spaniela.

Początki hodowli zaczęły się od suki Pestki - pochodzącej z linii użytkowej, brązowej z przesianiem suki (Łakomik-Kaszuba, 2016). Pierwszy miot Pestki i Feniksa (pies rasy springer spaniel) przyszedł na świat w 1993r. w Parku Dzikich Zwierząt w Kadzidłowie. Urodziło się pięć szczeniąt (2 psy i 3 suki). W hodowli pozostały tylko 2 suki (Łakomik-Kaszuba, 2016). W kolejnych latach do programu hodowlanego zostały włączone kolejne psy, w tym między innymi Bestien (pies rasy – spaniel bretoński). Po Bastienie, nowe pokolenia zyskały tzw. niepełną stójkę, czyli zachowanie, kiedy pies „zastyga” na widok zwierzyny łownej i czeka na sygnał myśliwego, po czym wyskakuje lekko w górę i uderzając łapami w ziemię, płoszy ptaki (Łakomik-Kaszuba, 2016).

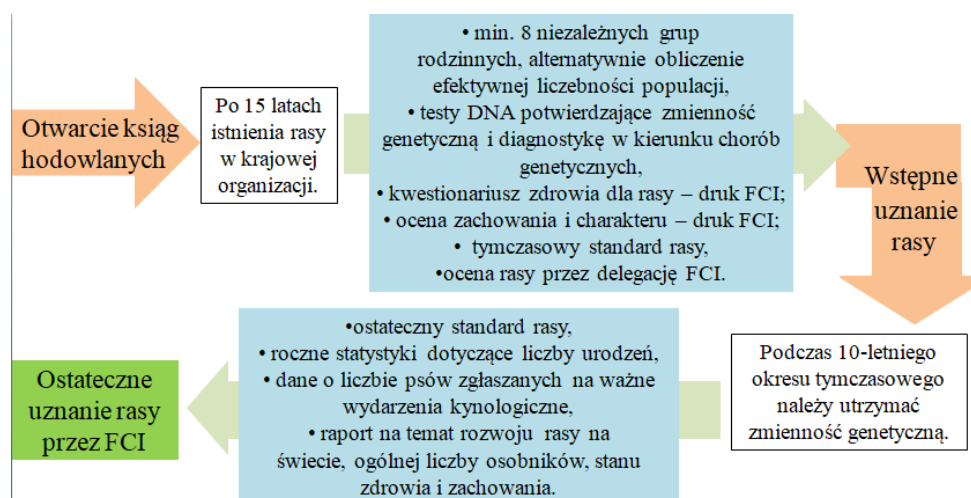
Obecny kierunek użytkowy polskich spanieli myśliwskich to głównie płoszenie i aportowanie ptaków, choć zdarza się, że towarzyszą w polowaniu na dziki (https://www.zkwp.pl/wzorcowe/1002_PL.pdf; <https://www.klubspaniela.pl/polski-spaniel-mysliwski>).

2.1.1. Procedury uznania rasy przez FCI

Polski spaniel myśliwski jest rasą jeszcze nieuznaną przez FCI (fr. *Fédération Cynologique Internationale*). Wszystkie procedury wstępnego i ostatecznego uznania rasy zostały opisane w regulaminie wewnętrznym FCI (załącznik nr 5 regulamin wewnętrzny FCI). Krajowa organizacja kynologiczna zrzeszona w FCI czyli Związek Kynologiczny w Polsce (ZKwP) odpowiada za działania mające przyczynić się do wpisania tej rasy do oficjalnego rejestru ras psa domowego (Rycina 1). Na podstawie przytoczonego dokumentu ustalono, że procedura uznania jest trzyetapowa i rozpoczyna się od chwili zarejestrowania danej rasy przez ZKwP. Następnie, w ciągu minimum 15 lat, powinien zostać utworzony plan hodowlany, na podstawie, którego będzie można wyodrębnić 8 tzw. grup rodzinnych. Grupę rodzinną tworzą 2 suki i 6 psów, pochodzące z dwóch różnych miotów urodzonych w ciągu ostatnich 5 lat. Pomiędzy grupami nie może być wspólnych przodków aż do 3 pokoleń wstecz. Alternatywnie można oszacować efektywną wielkość populacji, której wielkość powinna przekraczać wartość 50-100 (Frankham i wsp., 2002). Efektywna wielkość populacji powinna być obliczona na podstawie danych rodowodowych (wszystkie szczenięta urodzone w ciągu ostatnich pięciu lat i ich przodkowie do 3 pokoleń wstecz). Dopiero wtedy ZKwP może wystąpić do FCI o status „wstępnego (prowizorycznego) uznania rasy”. Do wniosku muszą być dołączone zdjęcia (ich liczba nie została określona w wytycznych) przedstawicieli rasy obu płci oraz dokumenty potwierdzające przeprowadzenie testów DNA potwierdzających rasę, wypełniony kwestionariusz zdrowia dla rasy (Aneks, Załącznik I) oraz ocenę zachowania i charakteru (Aneks, Załącznik II), a także należy przedstawić tymczasowy standard rasy w jednym z czterech urzędowych języków FCI: angielskim, francuskim, niemieckim lub hiszpańskim (Aneks, Załącznik III). Po spełnieniu wyżej wymienionych warunków, delegacja FCI (po jednym członku z Komisji do spraw Standardów i do spraw Komisji Naukowej FCI) przeprowadza analizę fenotypu (wielkość i umaszczenie) co najmniej 60 osobników obu płci (regulamin wewnętrzny FCI, załącznik nr 5). Następnie delegacja ta przedkłada Komitetowi Generalnemu FCI decyzję o możliwości „wstępnego uznania rasy”. Uzyskanie statusu „wstępnego uznania rasy” powoduje wpisanie danej rasy do odpowiednich ksiąg stadnych wszystkich członków FCI oraz umożliwia udział w wystawach międzynarodowych i ubieganie się o wniosek na chempiona krajowego CAC (fr. *Certificat d'Aptitude au Championnat*), ale nie międzynarodowego (CACiB).

W ciągu dziesięcioletniego okresu tymczasowego członek FCI (w Polsce ZKwP) powinien podjąć działania w celu utrzymania zmienności genetycznej danej rasy. Działania te nie są sprecyzowane przez FCI, co daje dużą swobodę w podejmowaniu decyzji każdemu z członków FCI. Do wniosku o „ostateczne uznanie rasy” należy dołączyć ostateczny standard rasy, roczne statystyki dotyczące liczby urodzeń z kraju pochodzenia danej rasy od czasu uzyskania statusu tymczasowego, statystyki dotyczące liczby urodzeń z ostatnich pięciu lat w innych krajach członkowskich FCI, dane o liczbie psów danej rasy zgłaszanych na wystawy krajowe i wystawy zagraniczne, w tym Wystawy Europejskie i Światowe z ostatnich 3 lat, raport na temat rozwoju rasy na świecie, ogólnej liczby osobników, stanu zdrowia i zachowania (regulamin wewnętrzny FCI, załącznik nr 5). Następnie ponownie przedstawiciele Komisji do spraw Standardów i Naukowej FCI oceniają przedstawicieli danej rasy, ich zgodność ze standardem rasy oraz potwierdzają zgłoszoną obecność poszczególnych osobników na ważnych wydarzeniach kynologicznych. Ostateczne uznanie nowej rasy jest zatwierdzane przez Zgromadzenie Ogólne FCI. Natomiast, jeśli w okresie 15 lat od daty wstępnego uznania rasy nie zostaną zgłoszone przez ZKwP żadne działania wymagane w kierunku spełnienia wyżej opisanych wymogów dotyczących uznania rasy przez FCI, a także nie zostanie złożony wniosek o jej ostateczne uznanie, to rasa zostaje skreślona z listy FCI (regulamin wewnętrzny FCI, załącznik nr 5).

Na mocy uchwały ZKwP od 1.01.2017 r. otwarta została Księga Wstępna (KW) dla polskiego spaniela myśliwskiego (Uchwała ZG ZKwP z dn. 14.09.2016), co zapoczątkowało długą drogę, którą hodowcy muszą pokonać, aż do ostatecznego uznania rasy przez FCI w przyszłości.



Rycina1. Schemat przedstawiający wymagania FCI dotyczące międzynarodowego, ostatecznego uznania nowej rasy psa domowego (schemat własny).

Związek Kynologiczny w Polsce podjął następujące działania w celu promocji rasy PSM i umożliwienia oficjalnego jej uznania przez FCI, zarówno w obszarach spraw hodowlanych, organizacyjnych, a także spraw związanych z Komisją Kynologii Łowieckiej:

- Od 1.01.2017 r. otwarcie Księgi Wstępnej (KW) dla polskiego spaniela myśliwskiego z jednoczesnym dopuszczeniem do udziału w wystawach jako rasa nieuznana (Uchwała Zarządu Głównego (ZG) ZKwP z dn. 14 września 2016 r.),
- Od 1.01. 2017 r. powierzenie oddziałowi Płock prowadzenie bazy KW dla polskiego spaniela myśliwskiego, dla wszystkich psów tej rasy zarejestrowanych w oddziałach ZKwP (Uchwała ZG ZKwP z dn. 1 grudnia 2016 r.),
- powołanie Klubu – Komisji Polskiego Spaniela Myśliwskiego przy ZG ZKwP a drodzona Uchwały ZG ZKwP z dn.22.05.2020r. (Biuletyn newsletter poświęcony rasie polski spaniel myśliwski, 2021a)
- dopuszczenie psów rasy polski spaniel myśliwski do udziału w wystawach psów ras myśliwskich jako rasy nieuznanej przez FCI (Uchwała ZG ZKwP z dn. 9 sierpnia 2022r.),
- podjęcie decyzji o wydawaniu drukiem biuletynu dedykowanemu rasie polski spaniel myśliwski (Uchwała ZG ZKwP z dn.18 lutego 2023 r.),
- zatwierdzenie zmian do wzorca rasy polski spaniel myśliwski oraz dodatkowo na wniosek Prezydium Komisji Kynologii Łowieckiej podjęto uchwałę o zatwierdzeniu „Regulaminu prób pracy” dla rasy polski spaniel myśliwski (Uchwała ZG ZKwP z dn. 2 lipca 2024r.),
- zniesienie górnej granicy wieku dla psów rasy polski spaniel myśliwski na próbach pracy i testach (Uchwała ZG ZKwP z dn. 31 października 2024r.),
- powierzenie Pani Małgorzacie Supronowicz (przewodniczącej Klubu PSM) przygotowania wniosku do FCI o wpis rasy polski spaniel myśliwski na listę ras wstępnie uznanych przez FCI oraz podniesienie rangi sędziego krajowego pracy psów myśliwskich do sędziego międzynarodowego dr Andrzejowi Krzywińskiemu, z jednoczesnym nadaniem międzynarodowego uprawnienia do sędziowania rasy polski spaniel myśliwski (Uchwała ZG ZKwP z dn. 4 kwietnia 2025 r.).

Inne działania podjęte w celu promocji rasy i umożliwienia oficjalnego uznania rasy przez FCI:

- Nawiązanie kontaktu w 2017r. przez jednego z wiodących hodowców rasy polski spaniel myśliwski z Katedrą Genetyki i Ochroną Zwierząt, Instytutu Nauk o Zwierzętach, w tym m.in. z kynologiem i genetykiem dr Katarzyną Fiszdón i ze specjalistą od zarządzania populacjami i diagnostyki chorób genetycznych dr hab. Joanną Gruszczyńską, prof. SGGW, co zapoczątkowało rozpoczęciem współpracy na linii naukowiec - hodowca i objęcie badaniami zmienności fenotypowej i genetycznej populacji polskiego spaniela myśliwskiego.
- Współpraca z hodowcami i właścicielami psów pracowników naukowych SGGW w Warszawie polegała na: pobieraniu materiału biologicznego od przedstawicieli rasy PSM, dokonywaniu pomiarów zoometrycznych psów, kolekcji informacji rodowodowych.
- Powstanie Klubu Polskiego Spaniela Myśliwskiego Polskiego Związku Łowieckiego (PZŁ) na mocy uchwały Zarządu Głównego PZŁ z dnia 15.09.2020 r.
- Zaprezentowanie rasy polski spaniel myśliwski na corocznej konferencji Komisji do spraw hodowlanych FCI (ang. *FCI Breeding Commission*) w Paryżu (ZKwP, 2025).

2.1.2. Polski spaniel myśliwski – stan obecny populacji

Podejmowane wysiłki ze strony hodowców i właścicieli polskiego spaniela myśliwskiego i Zarządu ZKwP, który sprzyjał rozwojowi populacji rasy polski spaniel myśliwski i wspierał starania Klubu PSM w kierunku zarejestrowania rasy do FCI, zaowocowały znacznym wzrostem liczebności populacji (Tabela 1). Dane przedstawione w Tabeli 1 na temat liczebności osobników rasy polski spaniel myśliwski pochodziły z publikowanych co roku danych ZKwP (ZKwP, 2018, 2019, 2020, 2021, 2022, 2023) . Obejmowały one lata od 2017 r. (od otwarcia ksiąg wstępnych - KW) do 2023 r. i dotyczyły wyłącznie osobników z Polski, zgłoszonych do ZKwP. Dane za rok 2024 nie zostały do tej pory opublikowane.

Tabela 1. Liczba osobników rasy PSM w latach 2017-2023 wg danych ZKwP (ZKwP, 2018, 2019, 2020, 2021, 2022, 2023),

Osobniki zarejestrowane w ZKwP (szt.)	W podziale wg płci (szt.)		W tym wykorzystywane w hodowli (szt.)		Szczenięta (szt.)		Liczba miotów	Rok
	Psy	Suki	Reproduktorzy	Suki hodowlane	Psy	Suki		
43	13	30	1	1	8	11	2	2017
60	22	48	4	7	31	29	12	2018
138	50	88	13	21	25	30	12	2019
173	59	114	22	48	106	115	28	2020
285	96	189	39	71	112	127	39	2021
346	129	217	71	74	151	163	28	2022
364	135	229	56	85	89	80	23	2023

Pod koniec 2017 roku było zarejestrowanych 43 przedstawicieli rasy polski spaniel myśliwski. W 2018 r. nastąpił wzrost całkowitej liczby osobników do 70. W kolejnych latach tendencja wzrostowa utrzymywała się i umacniała, ponieważ całkowita liczba osobników tej rasy pod koniec 2022 r. wyniosła 346, a w następnym 2023 r. 364 psy. Nastąpił również wzrost liczby zarejestrowanych miotów, z 2 w 2017 r. (19 szczeniąt) do 39 miotów w 2021 r. (239 szczeniąt). W 2022 r. zaobserwowano niewielki spadek liczby miotów, do poziomu z 2020 r., jednak liczba urodzonych szczeniąt była wyjątkowo duża i wynosiła 314 osobników. W 2023 r. w 23 miotach urodziło się 169 szczeniąt (Tabela 1).

Zebrano także dane na temat liczby hodowli polskiego spaniela myśliwskiego prowadzonych zarówno w Polsce jak i za granicą. Dane pochodziły z Biuletynu Newslettera poświęconego rasie polski spaniel myśliwski (2021-2024) i obejmowały lata 2020-2023 (Biuletyn newsletter poświęcony rasie polski spaniel myśliwski, 2021b, 2022, 2023, 2024). Niestety za lata poprzednie i za rok 2024 takie informacje nie zostały jeszcze opublikowane. W 2020 r. zgłoszono 32 przydomki hodowlane, 40 w 2021 r. i 2 hodowle zarejestrowano również poza granicami Polski, w Holandii i Szwecji. Rok 2022 był podobny do 2021 r., tj. zgłoszono 42 przydomki hodowlane w Polsce i 3 poza granicami. W 2023 r. nastąpił duży wzrost liczby hodowli w Polsce - zgłoszono 12 nowych nazw hodowli, łącznie była to liczba 54 hodowli polskiego spaniela myśliwskiego zarejestrowanych w Polsce.

2.2. Zmienność u zwierząt, ze szczególnym uwzględnieniem zmienności fenotypowej u psów

Zmienność jest jedną z podstawowych właściwości organizmów żywych. Stanowi źródło różnorodności, pozwala populacjom zwierząt dostosowywać się do zmieniających się warunków środowiska. W biologii wyróżnia się następujące rodzaje zmienności: genetyczną, środowiskową oraz fenotypową. Fenotyp definiowany jest, jako zespół cech morfologicznych, fizjologicznych i behawioralnych organizmu, powstających w wyniku interakcji genotypu z warunkami środowiskowymi (Falconer i Mackay, 1996). Szczególnym przykładem zmienności fenotypowej w obrębie gatunku jest pies domowy (*Canis lupus familiaris*). W wyniku domestykacji i długotrwałej selekcji hodowlanej powstało ponad 400 ras, które różnią się między sobą m.in. wielkością i kształtem czaszki oraz innymi cechami (Wayne i Ostrander, 1999).

Zmienność fenotypowa u psa domowego stanowi przedmiot wielu badań naukowych: Kaelin i Barsh (2010) - praca o odmianach barwnych sierści oraz genach odpowiedzialnych za kolor włosa; Boyko (2011) - praca o różnorodności morfologii (rozmiar ciała, kształt czaszki, zębów, długość kości), z głównym naciskiem na zmienność między i wewnątrz ras; Vaysse i wsp. (2011) - praca o poszukiwaniu korelacji cech morfologicznych i behawioralnych z wybranymi regionami genomu; Alvarez i Akey (2012) - praca o roli CNV (zmienności liczby kopii DNA) jako źródła zmienności fenotypowej głównie cech takich jak: pomarszczona skóra u rasy shar-pei czy krótkie kończyny u jamników i corgi; Serres-Armeroi i wsp. (2021) - szeroka analiza wpływu CNV na cechy morfologiczne i podatność na choroby; Slavney i wsp. (2021) - praca o umaszczeniu u psów, ale w kontekście intensywności feomelaniny; Bartusiak i wsp. (2022) – praca, w której autorzy starają się przewidzieć rasę i fenotyp (wzrost, masę ciała) na podstawie danych SNP (polimorfizmu pojedynczego nukleotydu).

Zmienność fenotypowa jest także elementem oceny wartości użytkowej zwierząt gospodarskich, takich jak bydło czy konie (Skrzyński i Szymik, 2024; PZHK, 2020). W tym kontekście szczególną rolę odgrywają pomiary zoometryczne. Najstarsza znaleziona instrukcja w języku polskim zawierająca szczegółowy opis wykonanych pomiarów wraz z użyciem narzędzi (laski zoometrycznej, taśmy metrycznej) do ich przeprowadzenia pochodzi z 1959r. Praca ta dotyczyła technik wykonania u koni pomiarów takich jak: wysokość w kłębie, długość skośna tułowia, głębokość klatki

piersiowej, obwód klatki piersiowej (Sasimowski, 1959). Natomiast, w przypadku psów, informacje na temat niektórych pomiarów zoometrycznych, np. wysokości w kłębie pojawiały się prawdopodobnie już w pierwszych standardach rasy, które były publikowane pod koniec XIX wieku przez angielski The Kennel Club (<https://www.thekennelclub.org.uk/>) i tak pozostaje do dziś - standard każdej rasy uznanej przez FCI zawiera informację o wysokości w kłębie z podziałem na płęć (FCI Model Standard, 2016). Pomiar ten jest zapisywany w formie przedziału (od - do) zalecanego wzrostu osobno dla psa i suki, ewentualnie w formie dopuszczalnego wahania (tolerancji) w określonym zakresie (np. ± 2 cm).

2.3. Wskaźniki i parametry opisujące zmienność genetyczną na podstawie analizy rodowodowej

Analiza struktury genetycznej populacji na podstawie rodowodów jest jednym ze sposobów oceny zmienności genetycznej danej populacji. Pozwala oszacować stopień pokrewieństwa, poziom inbredu, czy zidentyfikować osobniki, które wywarły największy wpływ na różnorodność genetyczną. Dzięki temu możliwe jest skuteczniejsze zarządzanie hodowlą oraz podejmowanie działań mających na celu ochronę zmienności genetycznej (Lacy, 1995; Falconer i Mackay, 1996; Gutiérrez i Goyache, 2005). Analiza rodowodowa znajduje zastosowanie przede wszystkim w hodowli zwierząt, a także w badaniach populacyjnych człowieka (Boichard i wsp., 1997; Gutiérrez i wsp., 2008).

Średni współczynnik spokrewnienia (ang. *Average Relatedness* - AR) – jest jednym z podstawowych współczynników stosowanych w analizach zmienności genetycznej populacji. Rozumiany jest jako miara udziału genów danego osobnika w całej analizowanej populacji. Wskazuje on średni stopień pokrewieństwa między danym osobnikiem a resztą populacji. Wyrażany jest zwykle jako procent i informuje o prawdopodobieństwie, że losowo wybrany allel od danego osobnika i od reszty populacji będzie identyczny (Falconer i Mackay, 1996). Praktyczne zastosowanie współczynnika spokrewnienia, szczególnie w kontekście wykorzystywania danych rodowodowych do oceny zmienności genetycznej populacji przedstawiono w pracach Goyache i wsp. (2003) i Gutiérrez i wsp. (2003). Im wyższa wartość AR, tym większy wpływ genetyczny danego osobnika na populację, co oznacza, że materiał genetyczny

danego osobnika jest szeroko rozpowszechniony wśród innych osobników, a więc może to prowadzić do ograniczenia różnorodności genetycznej.

Współczynnik inbredu (oznaczany jako F lub F_x) to drugi z podstawowych wskaźników opisujących różnorodność genetyczną populacji. W literaturze naukowej spotyka się dwa klasyczne ujęcia tego pojęcia, zaproponowane przez Malécot'a (1948) oraz Wright'a (1922). Zgodnie z definicją Malécot'a, współczynnik inbredu jest prawdopodobieństwem, że oba allele danego genu u danego osobnika są identyczne z powodu pochodzenia od wspólnego przodka. Z kolei koncepcja Wright'a tłumaczy współczynnik inbredu jako korelację pomiędzy allelami przekazywanymi przez gamety tworzące zygotę. Oznacza to, że im wyższy stopień spokrewnienia rodziców, tym większe prawdopodobieństwo, że ich potomstwo odziedziczy dwa identyczne allele danego genu. Obie definicje są równoważne i powszechnie stosowane w analizach opisujących zmienność genetyczną populacji.

Wzrost homozygotyczności (identycznych alleli u danego osobnika) może prowadzić do ujawnienia się fenotypowego alleli recesywnych o niekorzystnym działaniu, co skutkuje wystąpieniem tak zwanej depresji inbredowej (Falconer i Mackay, 1996; Leroy, 2014). Z tego względu monitorowanie poziomu inbredu w danej populacji jest kluczowe dla utrzymania zdrowia i różnorodności genetycznej (Leroy, 2014).

Efektywna wielkość populacji (N_e) – jest to teoretyczna liczebność populacji idealnej, w której wszystkie osobniki w równym stopniu uczestniczą w rozrodzie i która pod względem dryfu genetycznego zachowuje się tak samo, jak analizowana rzeczywista populacja (Wright, 1931; Falconer i Mackay, 1996; Gutiérrez i wsp., 2003, 2008). Wartość efektywnej wielkości populacji jest niższa niż rzeczywista liczba osobników (N), ponieważ w warunkach naturalnych nie wszystkie zwierzęta biorą udział w rozrodzie, a tym samym nie przekazują swoich alleli/genów kolejnemu pokoleniu. W praktyce stosuje się dwie metody szacowania N_e : na podstawie przyrostu inbredu (ΔF) (Wright, 1931; Gutiérrez i wsp., 2003, 2009) oraz na podstawie struktury rodowodowej (Pérez-Enciso, 1995; Goyache i wsp., 2003). Według Wright'a (1931) przyrost inbredu obliczany jest za pomocą klasycznego wzoru $\Delta F = \frac{F_t - F_{t-1}}{1 - F_{t-1}}$, gdzie F_t i F_{t-1} to średni inbred w każdym kolejnym pokoleniu. Znajac ΔF można obliczyć efektywną wielkość populacji zgodnie ze wzorem: $N_e = \frac{1}{2\Delta F}$. Niestety w populacjach niewielkich lub o „płytkich” rodowodach N_e wykazuje często wartość zawyżoną,

nieodzwierciedlającą rzeczywistej efektywnej wielkości populacji (Boichard i wsp., 1997; Goyache i wsp., 2003). Z tego względu do obliczeń N_e wykorzystywana jest także metoda udoskonalona przez Gutiérrez i wsp. (2003), w której $\Delta F = l \times b$, gdzie l – średni odstęp międzypokoleniowy, b – współczynnik regresji F względem roku urodzenia. Powyższa metoda jest bardziej „odporna” na braki w informacji rodowodowej, o ile znane są daty urodzenia osobników w analizowanej populacji.

Kolejną metodą szacowania N_e jest metoda opracowana przez Cervantes i wsp. (2010), która opiera się na regresji względem liczby równoważnych pokoleń (ang. *Equivalent Complete Generations* - ECG). Jest to dość precyzyjny sposób obliczania N_e , który kompensuje wpływ niekompletności danych rodowodowych poprzez uwzględnienie głębokości pokoleń. Szczególnym rozwiązaniem metody opartej na strukturze rodowodowej jest szacowanie N_e na podstawie regresji współczynnika inbredu w czasie, zaproponowanej przez Pérez-Enciso (1995). Polega ona na obliczeniu regresji logarytmicznej wartości $1-F$ względem daty urodzenia osobników. Na podstawie uzyskanego nachylenia prostej regresji obliczany jest średni roczny przyrost inbredu (ΔF), który przekształcany jest na N_e . Wynik ten następnie korygowany jest o średnią długość pokolenia (L). Metoda ta jest przydatna do stosowania w populacjach z niepełnymi danymi rodowodowymi, ale zakłada wyraźne oddzielenie kolejnych pokoleń tzw. nienakładające się pokolenia (Gutiérrez i Goyache; 2005). Im niższa wartość N_e , tym większe ryzyko utraty różnorodności genetycznej, a więc w konsekwencji ryzyko wstąpienia depresji inbredowej.

Ocena pochodzenia genów, a ściślej analiza udziału genów w populacji, opiera się na trzech podstawowych wskaźnikach: liczbie założycieli, efektywnej liczbie założycieli (ang. *Founder equivalents* - f_e) oraz efektywnej liczbie przodków (ang. *Effectivenumber of ancestors* - f_a). Za założycielaw populacji uznaje się każdego osobnika o nieznanym pochodzeniu, a więc takiego, dla którego brak jest informacji rodowodowych (Lacy, 1989). Udział genów danego założyciela to prawdopodobieństwo, że losowo wybrany allel w populacji pochodzi od tego właśnie osobnika. Jeżeli przyjmie się, że każdy z założycieli wniósł równą część informacji genetycznej do puli genowej badanej populacji to możliwe jest obliczenie efektywnej liczby założycieli (f_e) (Lacy, 1989), czyli liczby założycieli, którzy przy równych udziałach zapewniliby taką samą różnorodność genetyczną, jaka występuje w badanej populacji. Wskaźnik f_e może równać się rzeczywistej liczbie założycieli, co stanowi maksymalną wartość, jaką ten wskaźnik może osiągnąć. W praktyce jednak udział

poszczególnych założycieli bywa nierównomierny, więc f_e przyjmuje zazwyczaj mniejsze wartości. Ponieważ wpływ przodków na strukturę genetyczną populacji zależy nie tylko od założycieli, ale także od ich potomków, zwłaszcza tych intensywnie wykorzystywanych w rozrodzie, Boichard i wsp. (1997) zaproponowali dodatkowy wskaźnik: efektywną liczbę przodków (f_a). Parametr ten uwzględnia zarówno założycieli, jak i innych przodków, którzy z różnych powodów (np. efekt wąskiego gardła, efekt popularnego reproduktora) wykorzystywani byli w rozrodzie częściej niż inne osobniki. Efektywna liczba przodków oznacza więc, minimalną liczbę przodków, niekoniecznie założycieli, których łączny wkład wyjaśnia pełną zmienność genetyczną w populacji. Im niższa wartość f_a w stosunku do f_e , tym większy stopień koncentracji genów i mniejsze zróżnicowanie genetyczne populacji (Boichard i wsp., 1997; Kania-Gierdziewicz, 2006).

Ocena kompletności danych rodowodowych stanowi istotny element analiz struktury genetycznej populacji, ponieważ pozwala określić jakość i głębokość dostępnych danych genealogicznych. Najczęściej uwzględnia się trzy podstawowe parametry zgodnie z metodą oceny według Gutiérrez i Goyache (2005). Jest to: maksymalna liczba pokoleń - czyli największa liczba znanych pokoleń wstecz dla danego osobnika, liczona jako najdłuższa linia łącząca osobnika z najbardziej odległym przodkiem w rodowodzie. Parametr ten wskazuje jak głęboko można sięgnąć w analizie danej bazy danych, niezależnie od kompletności informacji rodowodowej w poszczególnych pokoleniach. Kolejne wskaźniki to: średnia liczba kompletnych pokoleń - czyli średnia liczba kompletnych pokoleń, w których wszyscy przodkowie danego osobnika są znani oraz liczba równoważnych pełnych pokoleń, która jest sumą wartości odpowiadających udziałowi znanych przodków w każdym pokoleniu - wskaźnik oceniający głębokość informacji rodowodowej, ale z uwzględnieniem częściowych braków. Równie ważnym wskaźnikiem jest wskaźnik kompletności rodowodów zaproponowany przez MacCluera i wsp. (1983), który wskazuje średni odsetek znanych przodków w każdym kolejnym pokoleniu obliczany dla każdego osobnika i uśredniany dla całej populacji. Wysokie wartości powyższych wskaźników świadczą o dobrej kompletności danych i zwiększają wiarygodność analiz genetycznych.

2.4. Charakterystyka wybranych chorób genetycznych

Na podstawie dostępnych informacji o historii powstania rasy polskiego spaniela myśliwskiego oraz przekazów ustnych od hodowców PSM ustalono, iż następujące rasy psów mogły brać udział w tworzeniu rasy polski spaniel myśliwski: angielski cocker spaniel, angielski springer spaniel, płochacz niemiecki oraz spaniel bretoński (Łakomik-Kaszuba, 2016; informacja ustna od hodowcy PSM). Przeszukano różne bazy danych m.in. bazę chorób dziedzicznych i innych cech obejmujących 711 gatunków zwierząt, w tym także psa domowego (<https://omia.org/home/>, Online Mendelian Inheritance in Animals – OMIA), program prowadzenia badań/ testów dedykowanych określonej rasie nadzorowanych przez brytyjski The Kennel Club (<https://www.thekennelclub.org.uk/about-us/about-the-kennel-club/the-kennel-club-rules-regulations-and-codes/the-kennel-club-health-standard/>) oraz dostępne książki i publikacje: *The Genetics of the dog* (2001), *Veterinary Medical Guide to Dog and Cat Breeds* (2012) - pod kątem możliwych do wystąpienia chorób genetycznych u wyżej wymienionych ras. Na podstawie dostępnych informacji o chorobach genetycznych wybrano 5 mutacji, zlokalizowanych w 4 genach, warunkujących choroby genetyczne, które potencjalnie mogły zostać wprowadzone do populacji polskiego spaniela myśliwskiego wraz z nosicielami zmutowanych alleli w procesie „odtworzenia” rasy PSM (Tabela 2). W niniejszych badaniach wybrano następujące geny: *PRCD* (ang. *Progressive rod-cone degeneration*), *PFKM* (ang. *phosphofructokinase, muscle*), *RPGRIP1* (ang. *Retinitis Pigmentosa GTPase Regulator Interacting Protein 1*) i *T-BOX* (*T-box transcription factor T*).

Tabela 2. Charakterystykawybranychgenów, warunkujących choroby genetyczne u potencjalnych ras założycielskichpolskiego spaniela myśliwskiego.

Jednostka chorobowa	Gen	Chromosom	Źródło
Płochacz niemiecki – Wachtelhund			
Dziedziczny niedobór fosfofruktokinazy mięśniowej (PFK)	<i>PFKM</i>	27	Inal Gultekin i wsp., 2012
Springer spaniel angielski - English Springer Spaniel			
Dziedziczny niedobór fosfofruktokinazy mięśniowej (PFK)	<i>PFKM</i>	27	Smith i wsp., 1996
Postępujący czopkowo-pręcikowy zanik siatkówki typu 1 (CORD1-PRA)	<i>RPGRIP1</i>	15	Mellersh i wsp., 2006
Cocker spaniel angielski - English Cocker spaniel			
Postępująca atrofiąsiatkówki (prcd-PRA)	<i>PRCD</i>	9	Zangerl i wsp., 2006
Postępujący czopkowo-pręcikowy zanik siatkówki typu 1 (CORD1-PRA)	<i>RPGRIP1</i>	15	Donner i Mellersh 2024
Spaniel bretoński - Epagneul Breton			
Krótkoogoniastość	<i>T-box</i>	1	Hytönen i wsp., 2009

2.4.1. Gen *PRCD* i postępujące zwyrodnienie czopków i pręcików - komórek siatkówki

Siatkówka oka (łac.*retina*) to cienka błona zlokalizowana w tylnej części gałki ocznej. Zawiera ona wyspecjalizowane komórki fotoreceptorowe (pręciki i czopki) odpowiedzialne za przekształcanie bodźców świetlnych, docierających do siatkówki przez źrenicę i soczewkę, w elektryczne impulsy nerwowe. Wygenerowane sygnały są następnie przesyłane nerwem wzrokowym do ośrodków wzrokowych w mózgu, gdzie

powstaje właściwy obraz odbieranego bodźca wzrokowego. Pręciki są wrażliwe na światło i umożliwiają percepcję obrazu w warunkach słabego oświetlenia, odpowiadając głównie za widzenie skotopowe (nocne) oraz wykrywanie ruchu. Z kolei czopki są odpowiedzialne za widzenie fotopowe (dziennie) i rozróżnianie barw (Molday i Moritz, 2015). Zaburzenia funkcji fotoreceptorów mogą prowadzić do pogorszenia ostrości widzenia w nocy i/lub w dzień albo do całkowitej ślepoty.

Gen *PRCD* – warunkujący chorobę - postępujące zwyrodnienie czopków i pręcików (ang. *Progressive rod-cone degeneration - prcd*) u psa domowego został zlokalizowany w chromosomie 9 (Tabela 1). Ustalenie jego dokładnej lokalizacji oraz mutacji sprawczej było rezultatem wieloletnich badań nad tą chorobą. Początkowo zdefiniowano region kandydujący o wielkości 1,5 Mb, zlokalizowany pomiędzy genami *GRB2* a *SEC14L*. Na podstawie analiz prowadzonych przez Goldstein i wsp. (2006), region ten został zawężony do 106 kbp. Dalsze badania przeprowadzone przez Zangerl i wsp. (2006) z wykorzystaniem biblioteki EST (ang. *Expressed Sequence Tags*) siatkówki psa umożliwiły identyfikację sekwencji cDNA w obrębie zdefiniowanego regionu. Spośród nich wybrano jedną sekwencję, którą następnie sklonowano u psa domowego, człowieka i myszy. Wybrany gen zbudowany z 6 eksonów kodował niewielkie białko (ok. 6 kDa) zbudowane z 54 aminokwasów u psa domowego i człowieka oraz z 53 aminokwasów u myszy. Wykazano pełną zgodność sekwencji eksonu 1, kodującego pierwsze 28 aminokwasów u gatunków *Canis lupus familiaris* i *Homo sapiens*. Natomiast w drugim kodonie eksonu 1, zidentyfikowano mutację, która była związana z wystąpieniem objawów fenotypowych prądu u przedstawicieli 18 ras psa domowego (Zangerl i wsp., 2006). Co istotne, tę samą mutację zidentyfikowano również u kobiety z Bangladeszu, u której klinicznie rozpoznano zwyrodnienie barwnikowe siatkówki (ang. *Retinis pigmentosa* – RP). To odkrycie przyczyniło się do uznania psa domowego jako wartościowego modelu badawczego w kontekście dziedzicznych chorób siatkówki u człowieka (Zangerl i wsp., 2006). Zidentyfikowany gen, jak i kodowane przez niego białko nazwano identycznie - *PRCD*.

Funkcja białka *PRCD* nie została dotąd w pełni poznana. Dostępne badania sugerują jednak jego istotną rolę w organizacji dysków w zewnętrznych segmentach fotoreceptorów, zwłaszcza w procesie prawidłowego formowania i kształtowania dysków. Wskazują również na powiązanie *PRCD* z rodopsyną – kluczowym białkiem uczestniczącym w transdukcji sygnału świetlnego (Goldberg i wsp., 2016; Spencer i

wsp., 2016, 2019; Spencer i Arshavsky, 2019; Sechrest i wsp., 2020). Dyski powstają w wyniku uwypukleń błony komórkowej fotoreceptora, po czym ulegają spłaszczeniu tworząc rodzaj równego stosu (Goldberg i wsp., 2016). Według badań przeprowadzonych przez Spencer i wsp. (2019) u myszy, brak genu *PRCD* powoduje to, że dyski nie spłaszczają się prawidłowo - ulegają wybrzuszeniu, a część tak uwypuklonej błony odrywa się w formie pęcherzyków zewnątrzkomórkowych i gromadzi się w przestrzeni międzyfotoreceptorowej. Nabłonek barwnikowy siatkówki, mimo obecności komórek fagocytyzujących nie jest w stanie usunąć wszystkich pęcherzyków. Migrujące w okolicy przestrzeni międzyfotoreceptorowej komórki mikrogleju, wspomagają usuwanie pęcherzyków, ale ich obecność także nie zapewnia pełnej ich eliminacji. Dochodzi do akumulacji pęcherzyków, co prawdopodobnie stanowi główną przyczynę stopniowej degeneracji fotoreceptorów (Spencer i wsp., 2019). Dodatkowo, zmniejszony poziom rodopsyny obserwowany u osobników z mutacją w sekwencji genu *PRCD*, wskazuje na bezpośredni związek mutacji z utrudnioną możliwością przetwarzania bodźców świetlnych (Sechrest i wsp., 2020). Choć w badaniach Spencera i wsp. (2019) wykazano, że z czasem dyski zewnętrznych segmentów fotoreceptorów odzyskują zdolność do spłaszczania, to defekt występujący w czasie ich tworzenia prawdopodobnie wystarcza, by uruchomić kaskadę zmian degeneracyjnych, prowadzących do wystąpienia objawów choroby.

Zidentyfikowaną mutacją w genie *PRCD* to mutacja typu substytucji c.5G>A, p.C2y skutkująca zamianą guaniny (G) w adeninę (A). Mutacja prawdopodobnie nie wpływa na strukturę II-rzędową białka *PRCD*, ale odpowiada za występowanie u psów postępującego zwyrodnienia czopków i pręcików – jednej z autosomalnych recesywnych chorób dziedzicznych. Postępujące zwyrodnienie czopków i pręcików należy do grupy chorób o podobnym obrazie klinicznym, nazwanych postępującym zanikiem siatkówki (ang. *progressive retinal atrophy* - *PRA*). Określenie „postępujący” odnosi się do stopniowej utraty funkcji przez komórki siatkówki (fotoreceptory). Z tego względu omawiana choroba znana jest w literaturze także pod nazwą *PRA-prcd*. Acland i wsp. (1998) określili postępujące zwyrodnienie czopków i pręcików, jako jedną z najczęstszych dziedzicznych przyczyn ślepoty u psów. Osobniki homozygotyczne (z dwiema kopiami genu z mutacją) rodzą się z pręcikami i czopkami o prawidłowej budowie, natomiast proces degeneracji następuje u nich względnie powoli. Upośledzenie funkcji fotoreceptorów prowadzi początkowo do pogorszenia widzenia nocnego, a następnie dziennego, co jest związane z szybszym tempem

degeneracji pręcików w porównaniu do czopków (Aquirre i wsp., 1982). Czas pojawienia się pierwszych objawów oraz przebieg choroby różni się w zależności od rasy psa, niekiedy w obrębie rasy są to różnice osobnicze. Objawy kliniczne widoczne są zazwyczaj w okresie dorastania lub wczesnej dorosłości (Dostal i wsp., 2011; Miyadera, 2014). W początkowej fazie choroby obserwuje się trudności w poruszaniu się przy słabym oświetleniu oraz problemy z lokalizowaniem małych przedmiotów, takich jak piłki czy drobne smakołyki (Miyadera, 2014). W miarę jak czopki w siatkówce oka ulegają degeneracji, ślepota nocna przekształca się w ślepotę dzienną. Ostatecznie u większości psów choroba skutkuje całkowitą utratą widzenia w ciągu 1-2 lat od wystąpienia pierwszych objawów (Zangerl i wsp., 2006; Miyadera, 2012b). Nie istnieje obecnie skuteczna metoda leczenia ani terapia spowalniająca progresję pred.

Postępujący zanik siatkówki po raz pierwszy opisano u psa domowego u rasy pudel miniaturowy (Aquirre i wsp., 1982), a następnie u rasy angielski cocker spaniel (Aquirre i wsp., 1988). Klinicznie podobne objawy zaobserwowano też u ponad trzydziestu innych ras psa domowego. Zangerl i wsp. (2006) potwierdzili obecność mutacji c.5G>A, u następujących ras: amerykański cocker spaniel, australijski pies pasterski, chesapeake Bay retriever, grzywacz chiński, angielski cocker spaniel, entlebuchermountain dog, fiński lapphund, kuvasz, labrador retriever, lapponianherder, pudel miniaturowy, retriever z Nowej Szkocji, portugalski pies dowodny, silky terier, australijski pies pasterski, szwedzki lapphund, pudel toy. W wydanej przez ACVO (ang. *American College of Veterinary Ophthalmologists*, ACVO) w 2023r. „The blue book” opisano mutację 5G>A, w genie *PRCD*, którą stwierdzono także u następujących ras psa domowego: owczarek australijski, barbet, czarny terrier rosyjski, bolończyk, gryfonik brukselski, chihuahua, coton de tulear, owczarek angielski, field spaniel, sznaucer olbrzymi, golden retriever, jack russel terrier, szwedzki elkhound, spaniel japoński, karelski pies na niedźwiedzie, lagotto romagnolo, lancashire heeler, lapponian herder, lhasaapso, manchesterterrier, markiesje, miniaturowy owczarek amerykański, szpic nordycki, norweski elkhound, pomeranian, pudel, podengo, portugalski miniaturowy, puli, łajka rosyjsko-europejska, gończyserbski, hiszpański pies dowodny, terrier tybetański, nagi pies meksykański i rasy nieuznane przez FCI: australijski labradoodle, biewer terrier, mi-ki, p lott hound, owczarek australijski toy (*Genetics Committee of ACVO, 2023*).

2.4.2. Gen *RPGRIP1* - dystrofia czopkowo-pręcikowa typu 1

Dystrofia czopkowo-pręcikowa typu 1 (ang. *cone-rod dystrophiatype 1*, CORD-1) to postępujące, dziedziczne (autosomalne recesywne) zwyrodnienie siatkówki, prowadzące do ślepoty. Najlepiej poznane zostało u psów rasy jamnik miniaturowy długowłosey, ale występuje też u innych ras m.in. u springer spaniel i beagle (Miyadera i wsp., 2009). Choroba ta może być wykryta na wczesnym etapie za pomocą badania oftalmoskopowego i elektroretinogramu (ERG), zanim pojawią się objawy kliniczne. Pierwsze objawy możliwe do wykrycia podczas badania oftalmoskopowego to ziarnisty wygląd dna oka, hipperrefleksyjność oraz ścieńczenie naczyń krwionośnych (Curtis i Barnett, 1993). Z kolei elektroretinogram był prawidłowy u dziesięcioletnich szczeniąt jamnika miniaturowego długowłosego, ale w 9-10 miesiącu życia obserwowano wyraźne obniżenie amplitudy odpowiedzi komórek fotoreceptorowych, a nawet całkowity brak odpowiedzi fotoreceptorów (Turney i wsp., 2007; Lhériveau i wsp., 2009). Dystrofia czopkowo-pręcikowa typu 1 u psów rasy angielski springer spaniel ujawnia się zazwyczaj w późniejszym wieku od 2 do 9 roku życia, jednak najczęściej objawia się powyżej 6 roku życia (Narfström, 2012).

Mellersh i wsp. (2006r.) poszukiwali u psa domowego mutacji sprawczej dystrofii czopkowo-pręcikowej typu 1. Zmapowali chromosom 15, szukając regionu analogicznego do regionu genu *RPGRIP1* (ang. *Retinitis Pigmentosa GTPase Regulator Interacting Protein 1*) zlokalizowany u człowieka w chromosomie 14. Mutacja w sekwencji genu *RPGRIP1* u człowieka odpowiada za wrodzoną ślepotę Lebera (Dryja i wsp., 2001). U psa domowego zidentyfikowano mutację - insercję o długości 44 pz (Ins44 - A₂₉GGAAGCAACAGGATG) - w eksonie 2 genu *RPGRIP1*. Mutacja ta powoduje przesunięcie ramki odczytu i powstanie przedwczesnego kodonu STOP, prowadząc do skrócenia białka i utraty jego domeny wiążącej RPGR na końcu C-terminalnym (Mellersh i wsp., 2006). Prawidłowe białko *RPGRIP1* zlokalizowane jest w segmencie zewnętrznym fotoreceptorów i oddziałuje z RPGR (ang. *Retinis Pigmentosa GTPase Regulator*) – regulatorem białka barwnikowego zwyrodnienia siatkówki, które wspomaga transport innych istotnych białek do zewnętrznych segmentów fotoreceptorów. Bez prawidłowego *RPGRIP1* transport cząsteczek w fotoreceptorach jest zaburzony, co prowadzi do degeneracji siatkówki (Remansi i wsp., 2014; Patnaik i wsp., 2015). W badaniach Mellersh i wsp., (2006) u wszystkich

analizowanych psów widoczna była korelacja mutacja-cord1 (genotyp-fenotyp), stąd insercja 44pz w genie *RPGRIP1* została początkowo uznana za jedyną mutację przyczynową. Jednak kolejne badania (Miyadera i wsp., 2009, 2012b; Busse i wsp., 2011; Kuznetsova i wsp., 2012) wykazały, że u wielu psów homozygotycznych pod względem tej mutacji nie rozwija się dystrofia czopkowo-pręcikowa typu 1, co sugerowało udział dodatkowych czynników genetycznych. Miyadera i wsp. (2012b) zasugerowali, że mutacja może charakteryzować się „nieszczelnością” (mutacja hipomorficzna), czyli możliwością powstawania prawidłowego białka mimo obecności mutacji, co prawdopodobnie następuje na skutek ominięcia miejsca mutacji na poziomie transkrypcji lub translacji. Kolejne badania pozwoliły zidentyfikować dwa modyfikatory MAP9 i L3, które wpływają na tempo i siłę objawów (Forman i wsp., 2016; Ripolles-Garcia, 2023). U psów homozygotycznych pod względem mutacji w genie *RPGRIP1* oraz z obecnością obu modyfikatorów występuje najcięższa postać dystrofii czopkowo-pręcikowej typu 1, z całkowitą utratą widzenia do 3 roku życia (Forman i wsp., 2016; Ripolles-Garcia, 2023). Psy homozygotyczne wyłącznie pod względem mutacji w genie *RPGRIP1* mogą nie wykazywać objawów klinicznych nawet do 6 roku życia, a przebieg choroby jest u nich łagodniejszy i zaczyna się znacznie później (Ripolles-Garcia, 2023). Stwierdzono, że modyfikator MAP9 powodował przyspieszoną chorobę pręcików i czopków, podczas gdy modyfikator L3 przyczyniał się jedynie do przyspieszonej degeneracji czopków (Forman i wsp., 2016; Ripolles-Garcia, 2023). Lh riteau i wsp. (2014) przeprowadzili badania z wykorzystaniem terapii genowej. Podanie wirusa AAV2/5 i AAV2/8z genem *RPGRIP1* człowieka do siatkówki u psów, u których wystąpiła mutacja ins44 w genie *RPGRIP1* przywróciło funkcję fotoreceptorów w siatkówce oka, osiągając od 18% do 72% dla czopków i od 22% do 29% dla pręcików, normalnej aktywności w ciągu pierwszego miesiąca po zabiegu. Efekt ten utrzymywał się, co najmniej 24 miesiące. Nie ma obecnie zatwierdzonej terapii genowej do leczenia dystrofii czopkowo-pręcikowej typu 1 u psów, ani do leczenia wrodzonej ślepoty Lebera u ludzi wywołanej mutacją w genie *RPGRIP1* (Dryja i wsp., 2001).

W wydanej przez ACVO (ang. *American College of Veterinary Ophthalmologists*, ACVO) w 2023r. „The bluebook” występowanie mutacji insercji 44pz w genie *RPGRIP1* wymieniono także, oprócz omówionych wy zej ras psa domowego (jamnik miniaturowy długowłosy, springer spaniel) u następujących ras: american staffordshire terrier, jamnik miniaturowy krótkowłosy oraz buldog francuski. Z

kolei badania Donner i Mellersh (2024) opisaną wyżej mutację zidentyfikowali także u następujących ras: bloodhound, american staffordshire terrier, jamnik miniaturowy krótkowłosy, szanucer, field spaniel, buldog francuski, logatto romagnolo, rottweiler, wyżej weimarski krótkowłosy, chihuahua, angielski cocker spaniel, amerykański cocker spaniel, pudel miniaturowy oraz u rasy nieuznanej przez FCI: amerykański pies eskimoski

2.4.3. Gen *PFKM* i enzym fosfofruktokinaza

Fosfofruktokinaza I (ang. *Phosphofructokinase 1*–PFK-1) jest enzymem należącym do transferaz, który odpowiada za jeden z etapów przemian biochemicznych glukozy w czasie tzw. glikolizy. W prawidłowo funkcjonującej komórce glikoliza powoduje powstanie 2 cząsteczek energii (ATP) i pirogronianu. Rolą fosfofruktokinazy I jest fosforylacja fruktozo-6-fosforanu do fruktozo-1,6-bisfosforanu. Zahamowanie glikolizy na tym etapie powoduje niedobór energii (brak ATP) w komórce (Vora, 1983; Stach i Kwiatkowskiej, 2004).

Fosfofruktokinaza I występuje w tkankach w postaci biologicznie czynnej jako tetramer. Składnikami tetramery są izoenzymy PFK-1, które występują pod postacią 3 różnych podjednostek. Wyróżnia się podjednostkę M (typu mięśniowego – występującą głównie w mięśniach, sercu, mózgu i erytrocytach) określaną często jako A; podjednostkę L (typu wątrobowego – występującą przed wszystkim w wątrobie, ale też w erytrocytach, nerkach i łożysku) oznaczaną również jako B oraz podjednostkę P (typu płytkowego – obecną głównie w płytkach krwi oraz w mózgu i fibroblastach) zwaną także jako C lub F (Vora, 1983; Dunaway i wsp., 1988).

W mięśniach szkieletowych, fosfofruktokinaza I jest zbudowana wyłącznie z 4 podjednostek M (monotetramer) (Dunaway i wsp., 1988), natomiast w erytrocytach występują zarówno podjednostki M, jak i L (heterotetramer), a u psa domowego także P (Mhaskar i wsp., 1992). Szacuje się, że u człowieka podjednostka M stanowi około 50% całkowitej puli izoenzymów PFK-1 w erytrocytach (Dunaway i wsp., 1988), natomiast u psa domowego izoenzym M stanowi nawet 86% (Mhaskar i wsp., 1992). Jest to istotne, ponieważ mutacje w genie kodującym PFK-1 typu M (ang. *phosphofructokinase, muscle- PFKM*) wpływają na funkcjonowanie wymienionych komórek. Według zestawienia Stach i Kwiatkowskiej (2004) u człowieka udokumentowano 15 różnych mutacji w genie *PFKM*- głównie mutacje zmiany sensu i delecji, które wywołują

glikogenozę typu VII (choroba Tarui). U psów opisano 2 mutacje powodujące dziedziczny niedobór fosfofruktokinazy (Giger i wsp., 1992; Smith i wsp., 1996; Gerber i wsp., 2009; Inal Gultekin i wsp., 2012).

W literaturze stosowane są także inne nazwy PFK typu M m.in: ATP-zależna 6-fosfofruktokinaza, typ mięśniowy; ATP-PFK; PFK-M; 6-fosfofruktokinaza typu A; fosfofrukto-1-kinaza izoenzym A (PFK-A); fosfoheksokinaza lub jako nr EC (ang. *Enzymes Classification*) EC:2.7.1.11 (www.uniprot.org, www.ncbi.nlm.nih.gov).

U *Canis lupus familiaris* gen *PFKM* zlokalizowany jest w chromosomie 27. Obecnie u kilku ras psa domowego tj. amerykański cocker spaniel (ang. *American Cocker Spaniel* - ACS) (Giger i wsp., 1992), angielski cocker spaniel (ang. *English Cocker Spaniel* – ECS) (Smith i wsp., 1996), whippet (Gerber i wsp., 2009) oraz płochacz niemiecki (niem. *Deutscher Wachtelhund*) (Inal Gultekin i wsp., 2012) zidentyfikowano mutację w genie *PFKM*. Dla ACS, ECS oraz rasy whippet mutacja ta jest mutacją nonsensową c.2228 G>A, p.(Trp473*), czyli substytucją guaniny w adeninę, co powoduje powstanie przedwcześnie kodonu STOP. Powstające białko (enzym PFKM) jest skrócone o 40 aminokwasów (Smith i wsp., 1996). Natomiast u rasy wachtelhund mutacja c.550 C>T, p.Arg184Trp jest mutacją zmiany sensu, co oznacza, że w czasie translacji, odczytywana trójka nukleotydów (kodon) jest inna niż w prawidłowej sekwencji i do łańcucha proteinowego zostaje włączony inny aminokwas (w powyższym przypadku tryptofan zamiast argininy). Obie mutacje prowadzą do braku aktywności fosfofruktokinazy I, co silnie ogranicza glikolizę. Konsekwencje tych mutacji są widoczne szczególnie w funkcjonowaniu mięśni szkieletowych i w erytrocytach. Podobne objawy mutacji jak wymienione wyżej w genie *PFKM* stwierdzono także u człowieka (Tarui i wsp., 1965).

W mięśniach szkieletowych, które potrzebują do swojej aktywności duże ilości ATP, zmniejszenie dostępnej energii będzie prowadzić głównie do miopatii, spontanicznych skurczów lub nietolerancji wysiłkowej. Niekiedy obserwuje się wzrost kinazy kreatynowej we krwi, będący wskaźnikiem uszkodzenia mięśni (Giger i wsp., 1992; McCully i wsp., 1999; Gerber i wsp., 2009). Należy podkreślić, że w mięśniach jedyną izoformą PFK jest typ mięśniowy (*PFKM*), więc brak funkcjonalnego enzymu doprowadza do upośledzenia funkcji mięśni. Co prawda Gerber i wsp. (2009) opisali dwa przypadki u psów rasy whippet, u których wystąpiły wyraźne objawy miopatii, podobne do tych obserwowanych u ludzi, to jednak u psów dość rzadko stwierdza się ciężką postać miopatii wysiłkowej. Jak sugeruje Snow i wsp. (1982) prawdopodobnie,

dlatego że włókna mięśniowe psów mają wysoką zdolność oksydacyjną. Zdolność ta wynika z budowy mięśni szkieletowych u psa domowego, gdzie przeważają włókna mięśniowe typu I i IIA (bogate w mitochondria) czyli takie, które efektywnie wykorzystują szlaki przemian tlenowych (van Boom i wsp., 2023). Dzięki temu możliwa jest częściowa rekompensacja energetyczna przy ograniczonej glikolizie.

W erytrocytach, które czerpią energię wyłącznie z glikolizy (przez brak mitochondriów, gdy glikoliza jest zatrzymana, nie mają możliwości wykorzystania innych szlaków przemian energetycznych) występowanie mutacji c.2228 G>A, c.550 C>T w genie *PFKM* powoduje powstanie zbyt małej ilości ATP, co zaburza działanie pomp jonowych odpowiedzialnych za utrzymanie ciśnienia osmotycznego komórki. W konsekwencji zmienia się objętość erytrocytów, które pęcznieją, a następnie dochodzi do ich lizy (Mhaskar i wsp., 1992).

Jak wspomniano wcześniej mutacje w sekwencji genu *PFKM* powodują u psa domowego dziedziczny niedobór fosfofrutokinazy. Jest to choroba o autosomalnym recesywnym sposobie dziedziczenia (Giger i wsp., 1986; 1992). Chore osobniki nie wykazują objawów, dopóki nie zostaną narażone na czynniki wyzwalające takie jak: wysiłek fizyczny, nadmierne pobudzenie (np. przy intensywnym szczekaniu), czy ekspozycja na wysokie temperatury. Obecnie znane mutacje w genie *PFKM* dotyczą głównie ras „pracujących” (psów myśliwskich), dlatego objawy u tych psów pojawiają się po wykonaniu „pracy”. Mogą wystąpić: osłabienie, szybkie męczenie się, blade lub żółte dziąsła, gorączka, ciemne zabarwienie moczu (ze względu na obecność hemoglobiny i bilirubiny w moczu będące wynikiem rozpadu erytrocytów), brak apatytu i letarg będący wynikiem kryzysu hemolitycznego (Gerber i wsp., 2009). We krwi widoczna jest niedokrwistość hemolityczną i retikulocytoza (Hillströmiwsp., 2011).

Psy dotknięte dziedzicznym niedoborem fosfofruktokinazy mogą prowadzić względnie normalne życie, bez objawów choroby, jeśli zwierzęciu zostanie ograniczony wysiłek fizyczny i sytuacje stresowe.

2.4.4. Gen T-box

Krótkoogoniastość (ang. *natural bobtail*) u psów jest cechą fenotypową, która wynika z mutacji w genie *T-BOX* (ang. *transcription factor T*, *TBXT*, *T*), kodującym czynnik transkrypcyjny *brachyury*. Gen ten u psa domowego znajduje się w

chromosomie 1 (Haworth i wsp., 2001). Należy do dużej rodziny genów T-box, które odgrywają kluczową rolę w rozwoju embrionalnym, zwłaszcza w kształtowaniu osi ciała, kręgosłupa i ogona (Papaioannou, 2001). Cechą charakterystyczną genów należących do rodziny genów z motywem T jest obecność konserwatywnej domeny, która koduje region polipeptydowy, który nazwano kasetą T (ang. *T-box*) (Papaioannou i Silver, 1998). Geny z sekwencją T odgrywają istotną rolę podczas rozwoju zarodkowego zarówno u bezkręgowców, jak i kręgowców. Geny te ulegają ekspresji w określonych tkankach zarodka w trakcie gastrulacji i organogenezy oraz w niektórych tkankach organizmów dorosłych (Papaioannou i Silver, 1998; Smith, 1999; Haworth i wsp., 2001; Herrmann i Kispert za Wilson i Conlon, 2002).

Białka z domeną T kodowane są przez geny zawierające sekwencję T (kasetę T). Wykazano, że białko *brachyury* wiąże w specyficzny sposób DNA i funkcjonuje jako aktywator transkrypcji (Herrmann i wsp. za Wilson i Conlon, 2002; Wilson i Conlon, 2002; Conlon i wsp., 2001). Badania genetyczne wykazały, że u psów krótkoogoniastość i bezogoniastość związana jest z mutacją punktową c.189C>G w genie *T* (Haworth i wsp., 2001; Indrebø i wsp., 2008). Mutacja ta prowadzi do substytucji aminokwasów w domenie T-box – regionie białka odpowiedzialnego za wiązanie DNA. Zmiana ta zaburza prawidłową funkcję białka brachyury, co skutkuje skróceniem części ogonowej kręgosłupa w trakcie rozwoju zarodkowego (Papaioannou, 2001; Haworth i wsp., 2001).

Mutacja c.189C>G jest dominująca, co oznacza, że pojedyncza kopia zmutowanego allelu w genotypie wystarcza, aby u psa wystąpiło skrócenie ogona (różnej długości) lub jego brak, lub też wystąpienie tzw. załamka ogona. U heterozygot nie stwierdzono występowania innych objawów, ani zaburzeń, jak tylko skrócenie lub brak ogona. Z kolei homozygoty dominujące umierają we wczesnym okresie zarodkowym lub zaraz po urodzeniu (Haworth i wsp., 2001; Indrebø i wsp., 2007; Hytönen i wsp., 2008). Poza brakiem ogona wystąpić u nich może atreżją odbytu, a także szereg wad kręgosłupa takich jak: skrócony odcinek szyjny, piersiowy i lędźwiowy, brak kręgów krzyżowych i ogonowych, skolioza odcinka piersiowego i lędźwiowego, kifoza odcinka piersiowego (Indrebø i wsp., 2007).

Hytönen i wsp. (2008) stwierdzili u rasy szwedzki vallhund istotnie mniejszą liczebność szczeniąt w miocie (o ok. 29%), w miotach pochodzących z kojarzeń psów o krótkim ogonie (z mutacją c.189C>G). Podobne zjawisko zaobserwowały Gruszczyńska i wsp. (2013) w populacji psów rasy polski owczarek nizinny.

Nosicielstwo omawianej mutacji może być problemem hodowlanym, gdy jedynym „widocznym” objawem w hodowli są mniej liczne mioty niż wynika to ze średniej dla danej rasy psa domowego. Należy zauważyć, że skrócenie ogona może obejmować zmniejszenie jego długości tylko o 1-2 kręgi ogonowe, co hodowca/właściciel może przeoczyć. Dlatego tak ważne jest, przeprowadzanie genetycznych testów diagnostycznych w kierunku mutacji c.189C>G w genie *T-BOX* u osobników przeznaczonych do rozrodu.

Mutacja c.189C>G w genie *T-BOX* występuje u co najmniej 17 ras psów, m.in. owczarek australijski, mudi, spaniel bretoński, owczarek pirenejski, polski owczarek niziny, jack russell terrier ischipperke (Hytönen i wsp., 2009; Gruszczyńska i Czapla, 2011; Gruszczyńska i wsp., 2013; Yoo i wsp., 2017). Jednak w niektórych rasach, takich jak rottweiler, buldog angielski czy boston terrier, krótki ogon występuje mimo braku tej mutacji, co sugeruje istnienie alternatywnych mechanizmów genetycznych skracania ogona (Indrebø i wsp., 2008). Pullig (1953) przedstawił także badania na temat rodzinnej krótoogoniastości u rasy angielski cocker spaniel, ale późniejsze badania nie potwierdziły występowania mutacji c.189C>G w genie *T-boxu* tej rasy psa domowego.

3. Cel pracy

Celem badań było określenie zmienności fenotypowej i genetycznej populacji psów rasy polski spaniel myśliwski oraz identyfikacja nosicieli zmutowanych alleli wybranych genów.

4. Zakres pracy

Ze względu na przeprowadzenie badań w kilku płaszczyznach, w manuskrypcie pracy podzielono je na analizy związane ze zmiennością fenotypową, która dotyczyła pomiarów zoometrycznych psów powyżej 1 roku życia obu płci oraz analizę zmienności genetycznej. Analiza obejmująca zmienność genetyczną dotyczyła: analizy zapisów rodowodów, a także analiz molekularnych DNA (jądrowego i mitochondrialnego) wyizolowanego z cebulek włosa lub krwi obwodowej. Do analiz molekularnych wykorzystano 22 sekwencje mikrosatelitarne zlokalizowane w autosomach oraz trzy w chromosomie Y, a także przeprowadzono analizę SNP w obrębie sekwencji pętli-D mtDNA. Ze względu na fakt, iż u ras, które w XX/XXI w. wykorzystano w odtworzeniu rasy polski spaniel myśliwski, stwierdzono występowanie następujących chorób genetycznych: postępujące zwyrodnienie czopków i pręcików, dystrofię czopkowo-pręcikową typu 1, dziedziczny niedobór fosfofruktokinazy oraz krótkoogoniastłość, podjęto dokonanie analiz mających na celu identyfikację nosicieli zmutowanych alleli warunkujących je genów (*PRCD*, *RPGRIP1*, *PFKM*, *T-BOX*).

Dotychczas jeszcze nie prowadzono żadnych badań, które obejmowałyby swoim zakresem analizę zmienności fenotypowej i genetycznej oraz diagnostykę chorób genetycznych rasy polski spaniel myśliwski. Wyniki niniejszych badań mogą przyczynić się do wpisania polskiego spaniela myśliwskiego do rejestru ras uznanych przez FCI, jako szóstej polskiej rasy psa domowego.

5. Hipotezy badawcze

Na podstawie zgromadzonych informacji o rasie polski spaniel myśliwski postawiono następujące hipotezy:

1. Zmienność fenotypowa psów rasy polski spaniel myśliwski jest znaczna.
2. Zmienność genetyczna populacji tej rasy jest niewielka.
3. W trakcie tworzenia rasy osobniki pochodzące z ras założycielskich mogły być nosicielami zmutowanych alleli warunkujących choroby genetyczne.

6. Materiał:

6.1. Analiza fenotypowa

Badaniom fenotypowym (pomiaru zoometryczne) poddano 85 osobników (29 samców i 56 samic) psa domowego (*Canis lupus familiaris*) rasy polski spaniel myśliwski. Jest to liczba mniejsza niż liczba osobników, od których pobrano materiał biologiczny (włosy) do badań laboratoryjnych. Różnica ta wynika przede wszystkim z faktu, że pomiary zoometryczne wykonywane były podczas wystaw psów rasowych, co wiązało się z pewnymi ograniczonymi możliwościami organizacyjnymi. Część wystaw odbywała się w szczególnych warunkach sanitarnych, wynikających z ogłoszonego stanu epidemii Covid-19, co utrudniało przeprowadzenie bezpośrednich pomiarów. Ani Autorka badań, ani właściciel/hodowca nie chcieli podejmować zbyt bliskiego kontaktu, który był niezbędny w czasie wykonywania pomiarów. Dodatkowo, samo wykonanie pomiarów wymagało także czasu, którego właściciele/hodowcy nie zawsze chcieli/mogli poświęcić w czasie wystaw. W przeciwieństwie do tego, pobranie materiału biologicznego (włosów), było czynnością trwającą krótko.

Wszystkie analizowane osobniki były, w wieku powyżej 12-tego miesiąca życia. Dysponowano informacją rodowodową (rodowody zostały wydane przez ZKwP) o 80 analizowanych osobnikach. Pięć osobników (3 psy i 2 suki) nie posiadało rodowodu, ale zostały dla nich wydane metryki ZKwP. Wszystkie pomiary zoometryczne psów dokonano osobiście podczas wystaw krajowych (Zamość 2019, Bydgoszcz 2020, Gliwice 2022) i klubowych (I Kluba Wystawa PSM - Nadarzyn 2020, II Kluba Wystawa PSM - Moszna koło Opola 2021, IV Kluba Wystawa PSM - Łódź 2023) oraz prób węchowych (Zamostki koło Warszawy, 2019). Analizę przeprowadzono uwzględniając całkowitą liczbę analizowanych osobników z podziałem na płeć, a także wprowadzając podział na kategorie wiekowe. Kryterium podziału był wiek danego osobnika w momencie przeprowadzenia pomiarów. Starano się dobrać analizowane osobniki w grupy o podobnej liczebności, ale ze względu na charakter grupy badawczej nie było to możliwe. Ostatecznie wyodrębniono trzy grupy wiekowe (Tabela 3):

- grupa I – osobniki, których dzień wykonania pomiarów przypadał na okres od ukończenia 1 roku życia do dnia przed ukończeniem 2. roku życia,
- grupa II – osobniki, dla których dzień wykonania pomiarów przypadał na okres od ukończenia 2 roku życia do dnia przed ukończeniem 3. roku życia,
- grupa III – wszystkie osobniki 3 letnie i starsze, dla których w dniu wykonania pomiarów przypadał dzień w okresie od ukończenia 3 roku życia.

Najstarsze badane osobniki miały w chwili dokonywania pomiarów skończony siódmyrok życia.

Tabela 3. Podział na grupy wiekowe badanej grupy psów rasy polski spaniel myśliwski.

Grupa wiekowa	Zakres wieku	Liczba psów	Liczba suk
I	od 1 roku życia (włącznie) do 2 lat	16	20
II	od 2 roku życia (włącznie) do 3 lat	9	13
III	od 3 roku życia (włącznie) i starsze	4	23
Łącznie		29	56

6.2. Analiza rodowodowa

Dzięki uprzejmości ZKwP, hodowców oraz informacji z Rodowodowej Bazy PSM – działającej kiedyś pod adresem <https://www.polskispaniel.info.pl/>, możliwe było uzyskanie wglądu do rodowodów poszczególnych osobników rasy polski spaniel myśliwski, co pozwoliło stworzyć swoistą „mapę kojarzeń” sięgającą początków pracy dr A. Krzywińskiego. Rodowodowa Baza PSM była bazą on-line i powstała z inicjatywy kilku hodowców PSM, którą na bieżąco uaktualniano. Zawierała informacje o przodkach i potomkach każdego wpisanego do niej osobnika. Niestety, strona internetowa od przełomu roku 2023/2024 nie jest już dostępna, jednak hodowcy podejmują starania, by utworzyć nową, podobną bazę.

Do analiz wykorzystano rodowody 548 osobników (326 psów i 222 suk) rasy polski spaniel myśliwski urodzonych w Polsce w latach 1996-2024. Rodowody pochodziły z dwóch źródeł: ze Związku Kynologicznego w Polsce (organizacji zrzeszonej w FCI – *Fédération Cynologique Internationale*) oraz bezpośrednio otrzymane od hodowców/właścicieli psów rasy PSM. Dostępne w rodowodach informacje niezbędne do przeprowadzenia analiz rodowodowych zawierały: identyfikator osobnika, datę urodzenia, imię wraz przydomkiem oraz płeć, a także identyfikatory jego rodziców.

6.3. Analizy laboratoryjne

Badania molekularne przeprowadzono w Laboratorium Katedry Genetyki i Ochrony Zwierząt, Instytutu Nauk o Zwierzętach, Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie.

Materiałem biologicznym były włosy okrywowe oraz krew obwodowa żylna pobrana przyżyciowo od badanych psów rasy polski spaniel myśliwski (Tabela 5). Próby włosów były pobierane od psów osobiście przez autorkę niniejszej pracy doktorskiej na wystawach w Zamościu (2019), Bydgoszczy (2020), Nadarzynie (2020), Mosznie koło Opola (2021), Gliwicach (2022), Łodzi (2023) oraz próbie wędchowej w Zamostkach koło Warszawy (2019), a także przysyłane przez hodowców/ właścicieli psów. Próby krwi pobierane były przez lekarza weterynarii i zostały dostarczone osobiście przez właścicieli jako materiał, który pozostał po przeprowadzonych badaniach weterynaryjnych. Materiał badawczy kolekcjonowany był w okresie października 2019 r. do czerwca 2024 r.

Do badań zmienności genetycznej i w kierunku nosicieli zmutowanych alleli wybranych genów: *RPGRIP1*, *PFKM*, *T-BOX* przebadano łącznie 216 osobników PSM (Tabela 4). Do identyfikacji zmutowanych alleli w genie *PRCD* 84 osobniki PSM.

W badaniach zmienności genetycznej populacji psów rasy polski spaniel myśliwski wykorzystano 22 sekwencje mikrosatelitarne, zlokalizowane w 21 różnych autosomach (2 sekwencje mikrosatelitarne zlokalizowane były w chromosomie 12) i 3 zlokalizowane w chromosomie Y (Tabela 6, 7 i 8).

W niniejszych badaniach poszukiwano nosicieli zmutowanych alleli 4 genów (*PRCD*, *RPGRIP1*, *PFKM*, *T-BOX*) warunkujących choroby genetyczne u ras psa domowego, których przedstawicieli wykorzystano prawdopodobnie w tworzeniu rasy polski spaniel myśliwski (Tabela 2).

Analizy molekularne mitochondrialnego DNA – sekwencja pętli D były przeprowadzone z wykorzystaniem materiału biologicznego pochodzącego od suk, które miały potomstwo (informacja z bazy rodowodowej), i od którego to potomstwa także był pobrany materiał biologiczny. Jeśli potomstwo płci żeńskiej, miało potomstwo, to analizę przeprowadzano dalej, do czasu, aż brakowało informacji o kolejnym potomstwie. Do analiz włączono także pojedyncze samce, które według rodowodów zapoczątkowały linie męskie, wyłącznie dlatego, aby poznać haplotyp ich matek i mieć możliwie najszerszy obraz zmienności pod względem sekwencji pętli D w populacji polskiego spaniela myśliwskiego.

Tabela 4. Liczba prób materiału biologicznego pobranego od badanych psów rasy polski spaniel myśliwski, wykorzystana w analizach molekularnych.

Rodzaj genów/markerów molekularnych	Liczba samców (szt.)		Liczba samic (szt.)		Łącznie
	Włosy	Krew obwodowa	Włosy	Krew obwodowa	
Sekwencje mikrosatelitarne; geny: <i>RPGRIP1</i> , <i>PFKM</i> , <i>T-BOX</i>	74	6	129	7	216
<i>PRCD</i> ,	33	-	50	-	84
mtDNA – pętla D	21	-	42	2	65

7. Metodyka badań

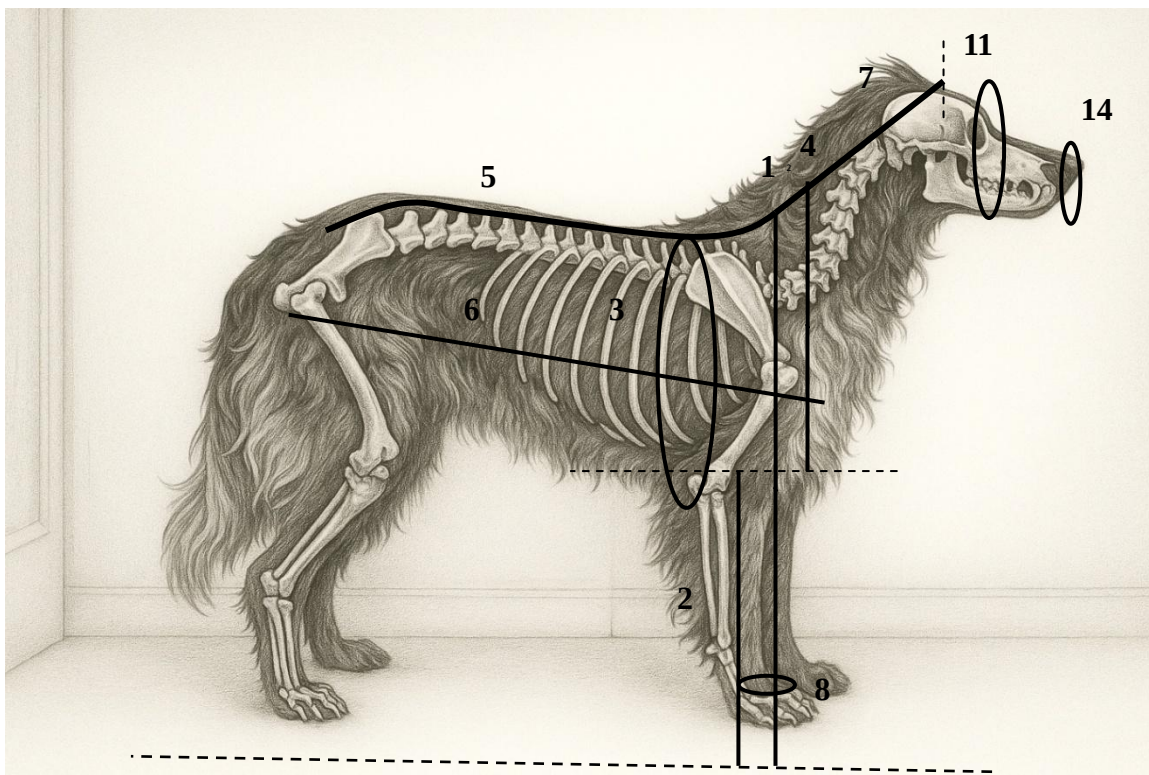
7.1. Analiza zmienności fenotypowej

Na podstawie literatury naukowej (Ściesiński, 2002; Janeczek i wsp., 2004; Horoszewicz i wsp., 2015; Frąckowiak i wsp., 2021) i konsultacji z przedstawicielami Zarządu Głównego ZKwP oraz Klubu – Komisji Polskiego Spaniela Myśliwskiego do analizy fenotypowej wybrane zostały odpowiednie pomiary zoometryczne, które umożliwiały jak najlepsze scharakteryzowanie przedstawicieli rasy, a w konsekwencji badaną populację polskiego spaniela myśliwskiego. Wybrane miary dotyczyły niektórych elementów budowy ciała, tj. głowa, szyja, klatka piersiowa, tułów i nadgarstek. Są to parametry powszechnie używane zarówno w kynologii do opisu cech fenotypowych psa domowego, jak i u zwierząt gospodarskich (Ściesiński, 2002; Janeczek i wsp., 2004; Horoszewicz i wsp., 2015; Frąckowiak i wsp., 2021).

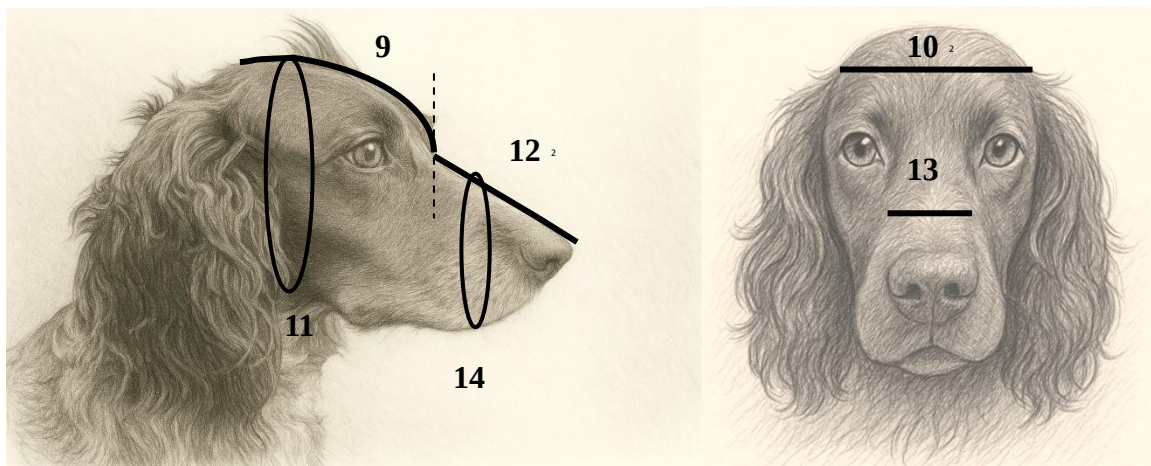
Na Rycinie 2 i 3 przedstawiono i zwizualizowano miejsca pomiaru na ciele psa:

1. wysokość w kłębie – odległość od podłoża do najwyższego punktu kłębu,
2. wysokość mostka - odległość od podłoża do mostka (do rękojeści mostka),
3. obwód klatki piersiowej – za tylnymi krawędziami łopatek,
4. głębokość klatki piersiowej – od najwyższego punktu kłębu do rękojeści mostka,
5. długość grzbietu - od linii łączącej tylne krawędzie łopatek do linii łączącej guzy biodrowe,
6. długość skośna tułowia (zwana także w niektórych publikacjach zwłaszcza w jęz. angielskim długością tułowia) - od guza kości ramiennej do guza kulszowego,

7. długość szyi - od guzowatości kości potylicznej do ostatniego kręgu szyjnego,
8. obwód nadgarstka - w najwęższym miejscu,
9. długość mózgowieczaszki – od guzowatości kości potylicznej do stopu,
10. szerokość mózgowieczaszki - pomiędzy najbardziej wystającymi punktami kości skroniowych,
11. obwód głowy - w najszerszym punkcie,
12. długość kufy - od stopu do czubka nosa,
13. szerokość kufy - w najszerszym punkcie,
14. obwód kufy - w najszerszym punkcie.



Rycina 2. Wybrane pomiary zoometryczne wykonane u badanych psów rasy polski spaniel myśliwski (zdjęcie własne, zmodyfikowane przez chat GPT, OpenAI, Universal Primer).



Rycina 3. Wybrane pomiary zoometryczne głowy wykonane u badanych psów rasy polski spaniel myśliwski(zdjęcie własne, zmodyfikowane przez chat GPT, OpenAI, Universal Primer).

Do zebrania pomiarów wykorzystano: laskę zoometryczną (pomiary 1 i 2), taśmę metrową (pomiary: 3,5-9, 11,12, 14), cyrkiel zoometryczny (pomiary: 4, 10 i 13). Wszystkie pomiary Autorka niniejszej pracy wykonywała osobiście. Dołożono wszelkich starań, aby pomiary były dokładne i miarodajne. Do pomiaru wybierano płaskie podłoże, psy przed pomiarem przyjmowały prawidłową postawę tj.: wyprostowane kończyny przednie, ustawione prostopadle do podłoża; tylne lekko do tyłu; głowa skierowano prosto. Pomiary wykonano z dokładnością 0,5 cm dla laski zoometrycznej i taśmy metrowej oraz 0,2 dla cyrkla zoometrycznego.

W niektórych przypadkach nie było możliwe zebranie kompletnych pomiarów (Tabela 5). W dużej mierze wynikało to z warunków, w jakich pomiary były wykonywane. W czasie wystawy psów, zwierzęta były narażone na wielką liczbę bodźców, co powodowało, że psy nie były w stanie utrzymać postawy przez cały czas badania i niekiedy z tego właśnie powodu niemożliwe było dokonanie u danego osobnika wszystkich pomiarów. Niektóre osobniki wykazywały agresję, być może spowodowaną nadmiarem stresu. Zdarzało się, że cyrkiel i laska zoometryczne z racji swoich rozmiarów, wyglądu czy też z jakiego materiału zostały wykonane (stal/metal) wywoływały u psów lęk i być może nieprzyjemne uczucie zimna. Wtedy zwierzęta reagowały natychmiastową zmianą pozycji, uniemożliwiając odpowiednie wykonanie właściwego pomiaru. Dodatkowo pomiary 2, 4 i 6 nie były uwzględnione od początku badań, a zostały włączone w trakcie (od wystawy w Mosznie w 2021 r.), po dyskusji z przedstawicielami Zarządu Klubu PSM. U niektórych psów nie było możliwości wykonania dodatkowych pomiarów.

Tabela 5. Liczba wykonanych pomiarów zoometrycznych u badanych osobników rasy polski spaniel myśliwski z podziałem na płeć.

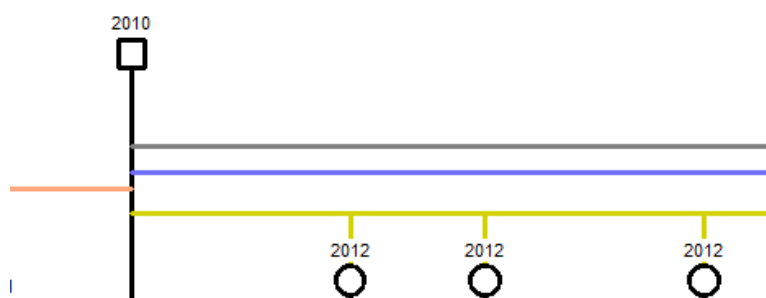
Rodzaj pomiaru	Psy (szt.)	Suki (szt.)
wysokość w kłębie	28	52
wysokość mostka	18	22
obwód klatki piersiowej	30	55
głębokość klatki piersiowej	17	21
długość grzbietu	27	56
długość skośna tułowia	9	9
długość szyi	28	56
obwód nadgarstka	29	56
długość mózgowioczaski	28	53
szerokośćmózgowioczaski	26	49
obwód głowy	27	50
długość kufy	28	53
Szerokośćkufy	28	53
obwód kufy	28	54
Liczba wszystkich przebadanych osobników	29	56
Liczba osobników, dla których uzyskano wszystkie pomiary	7	10

7.2. Analiza rodowodowa - tworzenie „mapy kojarzeń”.

Informacja rodowodowa, która została przeanalizowana dzięki programowi GenoPro 2020 wersja 3.1.0.1.(<https://genopro.com/>) umożliwiła zwizualizowanie kojarzeń przeprowadzonych pomiędzy badanymi osobnikami polskiego spaniela myśliwskiego (tzw. „mapa kojarzeń”) oraz wyodrębnienie linii hodowlanych męskich i żeńskich, rozumianych jako całkowite potomstwo po przodku (pies lub suka), dla którego brak informacji o rodzicach (tzw. NN – rodzice nieznani). Program GenoPro jest programem pozwalającym tworzyć graficzne drzewa genealogiczne w postaci genogramów. „Mapa kojarzeń” to schemat, gdzie zostały naniesione wszystkie kojarzenia wraz z informacją ourodzonych szczeniąt od 1992r. do 2021r. Późniejsze mioty „wymuszały” wprowadzanie tak wielu linii łączących ich rodziców, że dla zachowania czytelności mapy podjęto decyzję, aby zakończyć tworzenie schematu na osobnikach urodzonych w 2021 r. Przyjęto, że każde kojarzenie reprezentowane jest linią poziomą w innym kolorze, a potomstwo urodzone z danego kojarzenia połączono z linią kojarzenia linią pionową w tym samym kolorze (Rycina 4), co miało ułatwić

zrozumienie/„poruszanie się” po schemacie. Czarne pionowe linie wyprowadzone w dół od danego osobnika, są liniami pomocniczymi. Nad symbolem płci każdego osobnika (koło – samica, kwadrat - samiec) podany jest rok urodzenia. Nie było możliwe ułożenie wszystkich osobników urodzonych w danym roku, na tym samym poziomie, ale zachowano regułę, że osobniki urodzone w późniejszych latach znajdują się w genogramie niżej. Z kolei każda z wyodrębnionych linii męskiej i żeńskiej oznaczona została wybranym kolorem, przy czym wybrany kolor dotyczył wszystkich linii łączących osobniki spokrewnione umieszczone na genogramie.

Zgodnie z nomenklaturą kynologiczną w niniejszej dysertacji zastosowano następujące określenia: „linia męska” – oznaczająca osobniki męskie (potomków męskich) pochodzące po danym reproduktorze; „linia hodowlana żeńska” – potomków żeńskich pochodzących po danej suce.



Rycina 4. Fragment "mapy kojarzeń" ukazujący sposób zaprezentowania danych w genogramie. Schemat powstał przy użyciu programu GenoPro 2020.

7.3. Analizy molekularne

W celu zachowania anonimowości wyników analiz w analizach laboratoryjnych każdemu osobnikowi nadano numer. Przydzielony numer porządkowy był zupełnie innym numerem niż ten wynikający z analizy rodowodowej.

7.3.1. Izolacja DNA

7.3.1.1. Protokół izolacji DNA z cebulek włosów

DNA został wyizolowany z cebulek włosów przy użyciu kolumnowego zestawu komercyjnego GeneMatrixTissue&Bacterial DNA Purification Kit (EURx). Aby izolacja była skuteczna od każdego osobnika przygotowano minimum 10 włosów (średnio 15 włosów) i jałowym skalpelem odcięto od nich cebulki włosa. Następnie odcięte fragmenty włosów o długości ok. 0,3-0,5 cm wraz z cebulkami włosa przeniesiono do 2 ml probówki typu Eppendorf. Kolejno dodawano do próbówki: 350

μl buforu Lyse T, 20 μl 1M DTT oraz 20 μl proteinazy K. Następnie próby zostały wymieszane przez worteksowanie, po czym wstawione do inkubacji z wytrząsaniem prędkością 800 rpm w temperaturze 56°C przez całą noc w termobloku z wytrząsaniem (Thermo-Shaker, Biosan). Wszystko wykonane zostało z należytą starannością, aby ograniczyć możliwość kontaminacji obcym DNA. Następnego dnia dokonano aktywacji minikolumn wiążących DNA, poprzez dodanie 40 μl buforu aktywującego Buffer T na membranę minikolumn, które pozostawiono w temperaturze pokojowej, aż do czasu naniesienia prób na membranę minikolumny. W międzyczasie do próbek z przygotowanym materiałem (po inkubacji) dodawano 350 μl buforu Sol T, dokładnie mieszano i poddawano inkubacji przez 10 min. w 70°C. Następnie dodawano 350 μl 96 % etanolu, ponownie mieszano i wirowano w temperaturze pokojowej przez 1 minutę z prędkością 13500 rpm. Następnie 600 μl mieszaniny наносono na środek membrany danej minikolumny umieszczonej w próbówce odbierającej i wirowano przez 1 minutę z prędkością 13500rpm. Następnie minikolumnę wyjmowano, przesącz wylewano i minikolumnę umieszczano z powrotem w próbówce odbierającej, po czym za pomocą pipety наносono na membranę minikolumny pozostałą część suernatantu. Powtarzano wirowanie (1 minuta z prędkością 13500 rpm) i ponownie minikolumnę wyjmowano, przesącz wylewano, a minikolumnę umieszczano z powrotem w próbówce odbierającej. Następnie dodawano do niej 500 μl buforu płuczącego Wash TX1 i wirowano przez 1 minutę z prędkością 13500rpm. Ponownie minikolumnę wyjmowano, przesącz wylewano, a minikolumnę umieszczano z powrotem w próbówce odbierającej i dodawano 500 μl buforu płuczącego Wash TX2 i wirowano przez 2 min. z prędkością 13500rpm. Następnie minikolumnę umieszczano w nowej próbówce 1,5 ml typu Eppendorf i przeprowadzono elucję DNA poprzez dodanie 50 μl buforu Elution wcześniej podgrzanego do 80°C, odstawiano próbki z minikolumnami na 2 min. w temperaturze pokojowej i wirowano przez 1 min. z prędkością 13500rpm. W celu uzyskania jak największej ilości DNA procedurę wypłukania DNA z membrany powtarzano, dodając tę samą objętość buforu Elution, ale DNA był wypłukiwany do nowej próbówki 1,5 ml typu Eppendorf. Minikolumnę ostatecznie usuwano, a obie próbówki z otrzymanym izolatemykano i przechowywano do dalszych analiz w lodówce, w temperaturze 4°C.

W sumie uzyskano 406 próbek (2 próby na każdego osobnika) z wyizolowanym DNA.

7.3.1.2. Protokół izolacji DNA z krwi obwodowej

DNA został wyizolowany z prób krwi obwodowej pobranych na EDTA-K₂ przy użyciu kolumnowego zestawu komercyjnego GeneMATRIXQuick Blood DNA Purification Kit (EURx).

Izolację DNA rozpoczęto od aktywacji minikolumn wiążących DNA, poprzez dodanie 30 µl buforu aktywującego Buffer QB na membranę minikolumn, które pozostawiono w temperaturze pokojowej, aż do czasu naniesienia prób. W międzyczasie do nowej probówki 1,5 ml typu Eppendorf dodawano 200 µl krwi, 10µl proteinazy K oraz 200µl buforu Sol QB, całość mieszano przez worteksowanie i inkubowano przez 15 min. w 70°C. Następnie dodawano 200 µl 96% etanolu, ponownie mieszano przez worteksowanie i wirowano przez 1 min. z prędkością 13500rpm. Kolejną całość mieszaniny przenoszono do przygotowanej wcześniej minikolumny i wirowano przez 2 min. z prędkością 13500rpm. Minikolumnę wyjmowano, przesącz wylewano, a minikolumnę umieszczano z powrotem w probówce odbierającej, po czym dodawano 500 µl buforu płuczącego Wash QBX1 i wirowano przez 1 min. z prędkością 13500rpm. Kolejny raz minikolumnę wyjmowano, przesącz wylewano, a minikolumnę umieszczano z powrotem w probówce odbierającej, dodając tym razem 500 µl buforu płuczącego Wash QBX2 i wirowano przez 2 min. z prędkością 13500rpm. Następnie minikolumnę umieszczano w nowej probówce 1,5ml typu Eppendorf i przeprowadzano elucję DNA poprzez dodanie 100µl buforu Elution podgrzanego do 80°C, odstawiano probówki na 2 min. w temperaturze pokojowej i wirowano przez 1 min. z prędkością 13500rpm. Minikolumnę ostatecznie usuwano, a probówki z otrzymanym izolatami zamykano i przechowywano do dalszych analiz w lodówce, w temperaturze 4°C. W sumie uzyskano 13 prób z wyizolowanym DNA.

7.3.2. Sprawdzenie czystości i stężenia DNA za pomocą NanoDrop ND-2000

Czystość i stężenie DNA zostało następnie sprawdzone za pomocą spektrofotometru NanoDrop ND-2000 (ThermoScientific). Do dalszej analizy zostały wybrane próby o możliwie najlepszej czystości: 1,5-1,8 OD dla izolatu z włosów oraz 1,8-2,0 OD dla izolatów z krwi obwodowej oraz o odpowiednim stężeniu. Jeśli otrzymano próby, które nie spełniały stawianych wyżej wymogów o stężeniu i czystości DNA to takie próbki zostały poddane ponownej izolacji.

7.3.3. Rozdział elektroforetyczny DNA w 1% żelu agarozowym

Ze względu na niewielką koncentrację DNA po izolacji z cebulek włosa, rozdzielowi elektroforetycznemu w 1% żelu agarozowym poddano tylko próby DNA wyizolowanego z krwi obwodowej. Jednoprocentowy żel agarozowy został przygotowany poprzez zmieszanie 35ml buforu $1 \times$ TBE oraz 0,350g agarozy do rutynowych analiz (Sigma-Aldrich) i podgrzanie otrzymanej mieszaniny w kuchence mikrofalowej do czasu całkowitego rozpuszczenia agarozy. Kolbę z rozpuszczoną agarozą umieszczano na kołysce (Heidolph) w celu ostudzenia mieszaniny do temperatury ok. 50 °C, następnie dodawano 5 µl bromku etydy (Sigma). Kolejno, roztwór wylewano do przygotowanych wcześniej saneczek i odstawiano na ok. 30 min. do czasu zastygnięcia żelu. Próby DNA przygotowywano do naniesienia do kieszonek żelu poprzez zmieszanie 2 µl buforu obciążającego (błękit bromofenolowy 0,05%; cyjanol ksylenu 0,05%; EDTA 0,5m, pH=8; formamid) i 8 µl każdego izolatu. Rozdział elektroforetyczny przeprowadzono przez 30 min. przy 55 V.

7.3.4. Warunki termiczne i komponenty łańcuchowej reakcji polimerazy (ang. *Polymerase Chain Reaction* – PCR)

7.3.4.1. PCR – sekwencje mikrosatelitarne

Łańcuchowa reakcja polimerazy wybranych 25 sekwencji mikrosatelitarnych została przeprowadzona w 3 multipleksach (panele: 1, 2 i 3) z wykorzystaniem odpowiednich par starterów dla każdego z analizowanych markerów mikrosatelitarnych (Tabela 6, 7 i 8). Amplifikację przeprowadzono w termocyklerze Trioblock Termocycler (Biometra).

Tabela 6. Informacje o sekwencjach mikrosatelitarnych wybranych do panelu 1 reakcji Multipleks - PCR (Canine ISAG STR Parentage Kit, 2014).

Symbol <i>locus</i>	Numer chromosomu	Długość sekwencji	Motyw powtórzeń	Znakownanie	Sekwencja starterów
AHTk211	26	79-101	di	6-FAM	F: 5'-TTAGCAGCCGAGAAATACGC-3' R: 5'-ATTCGCCCCGACTTTGGCA-3'
FH2054	12	135-179	tetra	6-FAM	F: 5'-GCCTTATTCATTGCAGTTAGGG-3' R: 5'-ATGCTGAGTTTTGAACTTTCCC-3'
REN169D01	14	199-221	di	6-FAM	F: 5'-AGTGGGTTTGCAAGTGGAAC-3' R: 5'-AATAGCACATCTTCCCCACG-3'
REN105L03	11	279-353	di	6-FAM	F: 5'-GGAATCAAAAGCTGGCTCTCT-3' R: 5'-GAGATTGCTGCCCTTTTTACC-3'
AHTk253	23	277-297	di	6-FAM	F: 5' -ACATTTGTGGGCATTGGGGCTG-3' R: 5' -GTTTCTTTGCACATGGAGGACAAGCACGC-3'
INU055	10	190-216	di	VIC	R: 5'-CCAGGCGTCCCTATCCATCT-3' F5'-GCACCACTTTGGGCTCCTTC-3'
AHTh260	16	230-254	di	VIC	F: 5'-CGCTATACCCACACCAGGAC-3' R: 5'-GTTTCTTCCACAGAGGAAGGGATGC-3'
REN54P11	18	222-244	di	NED	F: 5'-GGGGGAATTAACAAAGCCTGAG-3' R: 5'-GTTTCTTTGCAAATTCTGAGCCCCACTG-3'
EN169O18	29	150-170	di	PET	F: 5'-CACCCAACCTGTCTGTTCCT-3' R: 5'-ACTGTGTGAGCCAATCCCTT-3'

F- starterforward, R -starter revers

Tabela 7. Informacje o sekwencjach mikrosatelitarnych wybranych do panelu 2 reakcji Multipleks-PCR(Canine ISAG STR Parentage Kit, 2014).

Symbol <i>locus</i>	Numer chromosomu	Długość sekwencji	Motyw powtórzeń	Znakownanie	Sekwencja starterów
AHT121	13	68-118	di	6-FAM	F: 5'-TATTGCGAATGTCAGTCTT-3' R: 5'-ATAGATACACTCTCTCTCCG-3'
FH2848	2	222-244	di	6-FAM	F: 5'-CAAAACCAACCCATTCACTC-3' R: 5'-TCACAAGGACTTTTCTCCTG-3'
REN64E19	34	130-150	di	6-FAM	F: 5'-TGGAGAGATGATATCCAAAAGGA-3' R: 5'-AGCCACACTGCTTGGTGAG-3'
INRA21	21	87-111	di	VIC	F: 5'-ATGTAGTTGAGATTTCTCCTACGG-3' R: 5'-GTTTCTTTAATGGCTGATTATTTGGTGG-3'
REN162C0 4	7	192-212	di	NED	F: 5'-TTCCCTTTGCTTTAGTAGGTTTTG-3' R: 5'-TGGCTGTATTCTTTGGCACA-3'
CXX279	22	109-133	di	PET	F: 5'-TGCTCAATGAAATAAGCCAGG-3' R: 5'-GGCGACCTTCATTCTCTGAC-3'
INU005	33	102-136	di	NED	F: 5'-CATGCTGGTTCTGTGTTAGGC-3' R: 5'-AAATACAATCTTGCGTGTGTGC-3'
INU030	12	139-157	di	PET	F: 5'-GGCTCCATGCTCAAGTCTGT-3' R: 5-CATTGAAAGGGAATGCTGGT'-3'

F- starter forward, R -starter revers

Tabela 8. Informacje o sekwencjach mikrosatelitarnych wybranych do panelu 3 reakcji Multipleks-PCR (Östrander i wsp., 1993 ; Sundqvist i wsp., 2001).

Symbol <i>locus</i>	Rodzaj chromosomu	Długość sekwencji	Motyw powtórzeń	Znakownanie	Sekwencja starterów
C109	A	168-172	di	TET	F: 5'-AACTTTAAGCCACACTTCTGCA-3' R: 5'-ACTTGCCTCTGGCTTTTAAGC-3'
C172	A	156-164	di	TET	F: 5'-CCTGTCTCCTGTGGACCAAT-3' R: 5'-ACATGCAAAAGGACACATTACG-3'
C204	A	199-218	di	HEX	F: 5'-CGAGAGCAACATAGGCATGA-3' R: 5'-CAAAGTGCTGTGGCAGGTC-3'
C225	A	161-167	di	6-FAM	F: 5'-AGCGACTATTATATGCCAGCG-3' R: 5'-CTCATTGGTGTAAGTGGCG-3'
C250	A	172-178	di	6-FAM	F: 5'-TTAGTTAACCCAGCTCCCCCA-3' R: 5'-TCACCCTGTTAGCTGCTCAA-3'
MS34A	Y	174-182	di	PET	F: 5'-AGCCATTCCTGGCCGAGTGG-3' R: 5'-GGTCCCCTTTTGCCATAGTGT-3'
MS34B	Y	208-210	di	6-FAM	F: 5'-AGCCATTCCTGGCCGAGTCC-3' R: 5'-GGTCCCCTTTTGCCATAGTGT-3'
MS41B	Y	212-228	di	TET	F: 5'-TCCTCTAATTTTCCCCTCTA-3' R: 5'-CTGCTCGACCCTCTTCTCTG-3'

F- starter forward, R -starter revers, A – lokalizacja w autosomie, Y – lokalizacja w chromosomie płci Y

Amplifikacja DNA odbyła się w objętości końcowej 10µl. Komponenty reakcji PCR w zależności od panelu były:

- Panel 1: 5µl KAPA2G Fast Multiplex Mix (Roche), 0,1 µl każdego startera L, 0,1 µl każdego startera R, 1,2 µl woda wolna od DNaz i RNaz, 2µl matrycowy DNA.
- Panel 2: 5 µl KAPA2G Fast Multiplex Mix (Roche), 0,1 µl każdego startera L, 0,1 µl każdego startera R, 1,4 µl woda wolna od DNaz i RNaz, 2µl matrycowy DNA.
- Panel 3: 5 µl KAPA2G Fast Multiplex Mix (Roche), 0,1 µl każdego startera L (z wyjątkiem : 0,15 µl dla C204; 0,2 µl dla MS34B i 0,25 µl dla MS41B) , 0,1 µl każdego startera R (z wyjątkiem : 0,15 µl dla C204; 0,2 µl dla MS34B i 0,25 µl dla MS41B, 3,8µl matrycowy DNA).

Warunki termiczne łańcuchowej reakcji polimerazy były ustalone empirycznie w termocyklerze gradientowym T-gradient Thermoblock (Biometra). Profil termiczny poszczególnych etapów PCR z wykorzystaniem sekwencji mikrosatelitarnych zaprezentowano w Tabeli 9, 10 i 11):

Tabela 9. Profil termiczny reakcji PCR dla Panelu 1.

Etapy reakcji PCR	Czas [s]	Temperatura [°C]	
Denaturacja wstępna	570	95	
Denaturacja właściwa	30	95	} × 14 cykli
Hybrydyzacja starterów	45	63	
Wydłużanie	45	72	
Denaturacja właściwa	30	95	} × 19 cykli
Hybrydyzacja starterów	45	60	
Wydłużanie	45	72	
Wydłużanie końcowe	30	60	

Tabela 10. Profil termiczny reakcji PCR dla Panelu 2.

Etapy reakcji PCR	Czas [s]	Temperatura [°C]	
Denaturacja wstępna	570	95	
Denaturacja właściwa	30	95	} × 14 cykli
Hybrydyzacja starterów	45	55	
Wydłużanie	45	72	
Denaturacja właściwa	30	95	} × 19 cykli
Hybrydyzacja starterów	45	52	
Wydłużanie	45	72	
Wydłużanie końcowe	30	60	

Tabela 11. Profil termiczny reakcji PCR dla Panelu 3.

Etapy reakcji PCR	Czas [s]	Temperatura [°C]	
Denaturacja wstępna	300	95	
Denaturacja właściwa	30	95	} × 29 cykli
Hybrydyzacja starterów	30	62	
Wydłużanie	45	72	
Wydłużanie końcowe	30	6-	

7.3.4.2. PCR – badania zmienności regionu kontrolnego mitochondrialnego DNA oraz nosicieli wybranych 5 mutacji w 4 badanych genach (*PRCD*, *RPGRIP1*, *PFKM*, *T-BOX*).

Łańcuchowa reakcja polimerazy została przeprowadzona z wykorzystaniem odpowiedniej pary starterów do amplifikacji fragmentów każdego z analizowanych genów (Tabela 12). Amplifikację przeprowadzono w termocyklerze Trioblock Termocycler (Biometra).

Tabela 12. Charakterystyka badanych genów starterów wykorzystanych do ich amplifikacji w PCR w badaniach zmienności genetycznej polskiego spaniela myśliwskiego.

Nazwa genu	Długość amplifikowanego fragmentu (pz)	Lokalizacja genu	Nazwa starteru	Sekwencje starterów	Źródło
Pętla D	228	region kontrolny mtDNA	L15562F H15790R	5`agatgccaggtatagtcca3` 5`ccatgcatataagcatgtaca3`	Kopaliani i wsp., 2014
<i>PRCD</i>	512	Chromosom 9	PRCDF PRCDR	5`ccgacctgctgcccacgactg3` 5`ccctttcctgggactttagg3`	Zangerl i wsp., 2006
<i>RPGRIP1</i>	207	Chromosom 15	RPGRIP1_F RPGRIP1_R	5`ccctctgcctatgtctctgc3` 5`tcacagcggaggaggctacgaa3`	Mellersh i wsp., 2006
<i>PFKM</i> (c.550 C>T)	314	Chromosom 27	PFKM_F PFKM_R	5`ccagtggcagcaggaacc3` 5`ctggggatgcgtaagagggtcttg3`	Inal Gultekin i wsp., 2012
<i>PFKM</i> (c.2228 G>A)	326	Chromosom 27	PFKex21_F PFKBan21_R	5`agcatgcagtctcaggccccta3` 5`gaagagcctgcagtaccgagt3`	Smith i wsp., 1996
<i>T-BOX</i>	702	Chromosom 1	Primer 1 F Primer 2 R	5`gaggatgggctcagcttcaggcac3` 5`cactctccgttcacgtactcc3`	Indrebø i wsp., 2008

Amplifikacja DNA odbyła się w objętości końcowej 43µl (izolat DNA z włosa) w analizach pętli-D regionu kontrolnego mtDNA; 30,6µl (izolat DNA z włosa) lub 29,6 µl (izolat DNA z krwi obwodowej) w analizach fragmentów wybranych genów. Komponentami reakcji były:

- dla fragmentu mtDNA: 25µl ColorTaq PCR Master MIX (Taq DNA polimeraza 1 u, FastGene® TaqBuffer 1X dNTPs 0,2 mM, MgCl₂ 1,5 mM oraz stabilizatory) (EURx), 0,5 µl starter L, 0,5µl starter H, 7µl matrycowy DNA, 10µl woda wolna od DNaz i RNaz.
- Dla fragmentów wybranych genów: PRCD, RPGRIP1, PFKM, T-BOX:
 - 20µl ColorTaq PCR Master MIX (Taq DNA polimeraza 1u, FastGene® TaqBuffer 1X, dNTPs 0,2 mM, MgCl₂ 1,5 mM oraz stabilizatory) (EURx), 0,3 µl starter Forward, 0,3 µl starter Rewers i 10 µl matrycowy DNA wyizolowany z cebulki włosa,
 - 20µl ColorTaq PCR Master MIX (Taq DNA polimeraza 1 u, FastGene® TaqBuffer 1X, dNTPs 0,2 mM, MgCl₂ 1,5 mM oraz stabilizatory) (EURx), 0,3 µl starter Forward, 0,3 µl starter Rewers, 7 µl H₂O i 2 µl matrycowy DNA wyizolowany z krwi obwodowej.

Warunki termiczne łańcuchowej reakcji polimerazy były ustalone empirycznie w termocyklerze gradientowym T-gradient Thermoblock(Biometra). Profil termiczny poszczególnych etapów PCR zaprezentowanow Tabeli 13 i 14..

Tabela 13. Profil termiczny reakcji PCR dla fragmentu regionu kontrolnego pętla D mtDNA.

Etapy reakcji PCR	Czas [s]	Temperatura [°C]	
Region kontrolny mtDNA			
Denaturacja wstępna	180	95	
Denaturacja właściwa	30	94	} × 46 cykli
Hybrydyzacja starterów	60	51	
Wydłużanie	60	72	
Wydłużanie końcowe	10	72	

Tabela 14. Profil termiczny reakcji PCR dla fragmentu wybranych 4 genów.

Etapy reakcji PCR	Czas [s]	Temperatura [°C]	
<i>PRCD</i>			
Denaturacja wstępna	180	95	} × 35 cykli
Denaturacja właściwa	30	95	
Hybrydyzacja starterów	45	62	
Wydłużanie	45	72	
Wydłużanie końcowe	45	72	
<i>RPGRIP1</i>			
Denaturacja wstępna	180	95	} × 35 cykli
Denaturacja właściwa	30	95	
Hybrydyzacja starterów	45	59	
Wydłużanie	60	72	
Wydłużanie końcowe	10	72	
<i>PFKM(c.550 C>T)</i>			
Denaturacja wstępna	180	95	} × 35 cykli
Denaturacja właściwa	30	95	
Hybrydyzacja starterów	45	62	
Wydłużanie	45	72	
Wydłużanie końcowe	10	72	
<i>PFKM(c.2228 G>A)</i>			
Denaturacja wstępna	180	95	} ×35 cykli
Denaturacja właściwa	30	95	
Hybrydyzacja startera	45	66	
Wydłużanie	45	72	
Wydłużanie końcowe	10	72	
<i>T-BOX</i>			
Denaturacja wstępna	180	95	} × 35 cykli
Denaturacja właściwa	30	95	
Hybrydyzacja startera	30	61	
Wydłużanie	45	72	
Wydłużanie końcowe	10	72	

W zależności od tego, jaki produkt PCR analizowano, poddawano go odpowiednim dalszym analizom: sekwencjonowaniu (region kontrolny mtDNA i fragment sekwencji genu PRCD) lub trawieniu za pomocą enzymu restrykcyjnego (fragment genu: RPGRIP1, PFKM dla obu mutacji oraz T-BOX).

7.3.5. Rozdział elektroforetyczny DNA w 1,5% żelu agarozowym

W celu oceny skuteczności reakcji, produkt PCR został poddany elektroforezie w 1,5% żelu agarozowym. Żel został przygotowany poprzez zmieszanie 35 ml buforu $1 \times$ TBE, 0,2625 g agarozyrutynowych analiz (Sigma Aldrich) i 0,2625g agarozy o wysokiej rozdzielczości (Sigma Aldrich) oraz podgrzanie otrzymanej mieszaniny do czasu całkowitego rozpuszczenia agarozy. Dalsze czynności wykonywano w takiej kolejności jak opisano w podrozdziale 8.3.3 Następnie przygotowywano mieszaninę 2 μ l buforu obciążającego (błękit bromofenolowy 0,05%; cyjanol ksylenu 0,05%; EDTA 0,5 Mm, pH=8; formamid) i 8 μ l produktu PCR, po czym наносzono ją do kieszonek żelu. Elektroforezę przeprowadzono przez 30 min. i pod natężeniem 55V.

Do identyfikacji mutacji w genie *RPGRIP1* wystarczyło przeprowadzenie rozdziału elektroforetycznego w 1,5 % żelu agarozowym. Produkt PCR badanego fragmentu bez mutacji był długości 207pz, natomiast w przypadku wystąpienia mutacji (insercji 44pz) produkt PCR miałby wielkość 251 pz.

7.3.6. Oczyszczanie produktów PCR

Sekwencjonowaniu poddawano próby, które służyły analizom zmienności regionu kontrolnego mtDNA oraz identyfikacji mutacji w genie PRCD. Jednak, aby było to możliwe próby poddawano oczyszczeniu.

Oczyszczanie miało na celu usunięcie między innymi niewykorzystanych starterów w reakcji PCR oraz niewielkich (poniżej 20 pz) fragmentów dwuniciowego DNA. Do tego etapu analiz wykorzystano komercyjny zestaw GeneMATRIX PCR / DNA Clean-Up Purification Kit (EURx). Na początku aktywowano minikolumnę, poprzez dodanie na środek membrany 40 μ l buforu aktywującego Buffer DX i pozostawiano ją w temperaturze pokojowej. W międzyczasie, do produktu PCR dodawano 70 μ l buforu Orange DX, a następnie próby mieszano. Tak uzyskaną mieszaninę наносzono na membranę minikolumny i wirowano przez 1 min. z prędkością 13500rpm. Następnie wyjmowano minikolumnę, wylewano przesącz i umieszczano

minikolumnę z powrotem w probówce odbierającej. Kolejną czynnością było dodanie 500µl buforu płuczącego Wash DX1 na membranę minikolumny, wirowanie przez 1 min. z prędkością 13500rpm. Ponownie wyjmowano minikolumnę, wylewano przesącz i umieszczono minikolumnę z powrotem w probówce odbierającej. Następnie dodawano 650µl buforu Wash DX2 i wirowano przez 1 min. z prędkością 13500rpm. Po raz trzeci wyjmowano minikolumnę, wylewano przesącz i umieszczano minikolumnę z powrotem w probówce odbierającej. Wirowano przez 2 min. z prędkością 13500rpm w celu usunięcia resztek buforu płuczącego. Minikolumnę umieszczano w nowej probówce 2 ml typu Eppendorf, do której dodawano 50-100µl buforu Elution w zależności od ilości otrzymanego produktu PCR (intensywności świecenia prążków po rozdziale elektroforetycznym; odczyt stężenia DNA w spektrofotometrze Nanodropp 2000), pozostawiono na 2 minuty w temperaturze pokojowej, a następnie wirowano przez 1 min. z prędkością 13500rpm. Minikolumny ostatecznie usuwano, a próbki zamykano. Możliwe było ich przechowywanie do czasu dalszych analiz w lodówce w temperaturze 4°C.

7.3.7. Sekwencjonowanie metodą Sangera

Sekwencjonowaniu metodą Sangera poddano oczyszczone produkty PCR *regionu* kontrolnego mtDNA oraz badanego fragmentu genu *PRCD*. Sekwencjonowanie zlecono firmie zewnętrznej - Pracowni Sekwencjonowania w Instytucie Biochemii i Biofizyki PAN w Warszawie (IBB). Zgodnie z instrukcją dostarczania prób do Pracowni Sekwencjonowania, przygotowywano 30µl każdej oczyszczonej próby oraz po 10µl każdego ze starterów (stężenie 5 pmoli/µl -5µM). Próby do sekwencjonowania dostarczano osobiście, zapewniając odpowiednie warunki termiczne podczas transportu. Sekwencjonowanie wykonano bezpośrednią metodą Sangera używając zestawu BigDye Terminator v 3.1 CycleSequencing Kit (Thermo Fisher Scientific) zgodnie z zaleceniami producenta. Rozdział i odczyt otrzymanych sekwencji przeprowadzono na aparacie ABI3730xl (ThermoScientific Fisher) w Instytucie Biochemii i Biofizyki PAN w Warszawie w Pracowni Sekwencjonowania. Dla uzyskanego produktu PCR przeprowadzono sekwencjonowanie w obu kierunkach. Po otrzymaniu sekwencji sprawdzano ich odczyt i jakość za pomocą programów: BioEdit 7.26 (Hall, 1999) i Chromas 2.6.6 (Technelysium, 2018). Tylko sekwencje z chromatogramów dobrej jakości odczytu były poddane analizom w programie MEGA.

7.3.8. Trawienie produktów PCR wybranymi enzymami restrykcyjnymi

Po uzyskaniu produktu PCR, do identyfikacji mutacji w genach: *PFKM* i *T-BOX* zastosowano trawienie za pomocą odpowiednich enzymów restrykcyjnych. Reakcję przeprowadzono zgodnie z procedurami rekomendowanymi przez producenta (Tabela 15).

Tabela 15. Skład mieszaniny reakcyjnej oraz warunków termicznych reakcji trawienia wybranych sekwencji badanych genów przez odpowiednie enzymy restrykcyjne.

Nazwa genu	<i>PFKM</i> (c.550 C>T)	<i>PFKM</i> (c.2228 G>A)	<i>T-BOX</i>
Wielkość produktu PCR (pz)	314	326	702
Enzym restrykcyjny (Thermo Scientific)	<i>MspI</i> FastDigest	<i>BanI</i>	<i>BstEII</i> FastDigest
Substraty mieszaniny reakcyjnej (μl):			
1. produkt PCR	10	10	10
2. H ₂ O, wolna od nukleaz	15	18	20
3a. bufor 10×FastDigest	5	-	5
3b. bufor zero 10×	-	2	-
4. enzym restrykcyjny	1	1	1
Warunki termiczne reakcji			
Inkubacja	37°C/15 min.	37°C/60 min.	37°C/15 min.
Inaktywacja	brak	65°C/20 min.	brak

Produkty trawienia poddawano rozdzielowi elektroforetycznemu w 2% żelu agarozowym (0,700 g NuSieve agaroz (Lonza) rozpuszczone w 35ml 1 × TBE) w przypadku obu mutacji w genie *PFKM* lub w natywnym 10% żelu poliakryloamidowym, barwionym azotanem srebra w przypadku analizy genu *T-box*.

7.3.9. Testy genetyczne identyfikujące mutację w genach *PFKM* i *T-BOX*.

Wybór mutacji, fragmentu genu do amplifikacji, starterów, enzymów restrykcyjnych oraz dobranie odpowiednich warunków termicznych PCR, umożliwiło zaprojektowanie testu genetycznego, który identyfikował obecności mutacji w wybranych genach w populacji polskiego spaniela myśliwskiego. Możliwy do zaobserwowania wynik testu zaprezentowano w Tabeli 16.

Tabela 16. Przewidywany wynik trawienia produktu PCR wybranym enzymem restrykcyjnym w genach PFKM i T-BOX.

Gen i identyfikowana mutacja	Produkt PCR (pz)	Enzym restrykcyjny	Długość fragmentów restrykcyjnych (pz)	Homozygota recesywna	Heterozygota	Homozygota dominująca
PFKM (c.550 C>T)	314	MspI	263	_____	_____	
			147		_____	_____
			116		_____	_____
			51	_____	_____	_____
PFKM (c.2228 G>A)	326	BanI	326	_____	_____	
			310		_____	_____
			25		_____	_____
Wynik testu↑				chory (2 allele z mutacją)	nosiciel (1 allel z mutacją)	zdrowy (2 allele dzikie)
T-BOX(c.189C>G)	702	BstEII	511	_____	_____	_____
			191	_____	_____	
			160		_____	_____
			31		_____	_____
Wynik testu↑				zdrowy (2 allele dzikie)	nosiciel (1 allel z mutacją)	chory (1 allele z mutacją)

7.3.10. Rozdział elektroforetyczny produktu PCR (fragment genu *T-BOX*) trawionego enzymem restrykcyjnym w 10% żel poliakryloamidowy.

Dziesięć procentowy żel poliakryloamidowy przygotowano poprzez zmieszanie w zlewce: 4 ml poliakrylamidu (29 akrylamid : 1 bisakrylamid), 6 ml 1 × buforu TBE i 10 µl TEMED. Całość mieszaniny nabrano do strzykawki i przefiltrowano przez filtr membranowy. Następnie mieszaninę przesączono do nowej zlewki, dodano 100 µl 10% APS i całość wymieszano delikatnym ruchem okrężnym (ok. 3 min). Kolejno, żel wylewano pomiędzy przygotowane wcześniej szyby, wkładano grzebień i odstawiono w pozycji ukośnej na czas polimeryzacji, ok. 20 min. Po tym czasie, wyciągano grzebień, usuwano silikonowe uszczelki i ustawiono szyby w aparacie do elektroforezy. Próby do elektroforezy przygotowano do naniesienia do kieszonek żelu poprzez zmieszanie 2 µl buforu obciążającego (błękit bromofenolowy 0,05%; cyjanol ksylenu 0,05%; EDTA 0,5m, pH=8; formamid) i 10 µl produktu PCR trawionego enzymem restrykcyjnym. Rozdział elektroforetyczny przeprowadzono przez 20 min. przy 300 V.

7.3.11. Barwienie srebrem fragmentów DNA w żelu poliakrylamidowym

Po zakończonym rozdziale elektroforetycznym szklane szybki wyjmowano z aparatu do elektroforezy pionowej (Biometra) i delikatnie rozdzielono szyby. Najpierw do naczynia, w którym przeprowadzano barwienie, dodawano 300 ml 10% silnie schłodzonego etanolu. Następnie delikatnie, by nie uszkodzić żelu, zanurzono żel w 10% etanolu i mieszano przez 15 min. na kołysce. Alkohol wylewano, a żel przepłukiwano wodą MilliQ. Dodawano 300 ml 1% kwasu azotowego i ponownie mieszano przez 10 min. na kołysce. Kwas azotowy wylewano, a żel ponownie przepłukiwano wodą MilliQ. Następnie dodawano 300 ml 0,2% roztworu azotanu srebra z dodatkiem 300 µl formaldehydu i ponownie mieszano na kołysce przez 20 min. Roztwór azotanu srebra wylewano, a żel ponownie, dwukrotnie przepłukano wodą MilliQ. Przedostatnim krokiem było dodanie 1000 ml 3% węgla sodu z dodatkiem 500 µl formaldehydu. Roztwór ten dodawano małymi porcjami, a gdy zaczynał przybierać ciemny odcień, natychmiast go wylewano. Etap ten trwał do czasu, aż uzyskano prążki DNA o odpowiedniej intensywności. Ostatnią porcję węgla sodowego także wylewano. Na koniec, utrwalano żel, mieszając go przez 15 min. w 300 ml 10% kwasu octowego, po czym kwas wylewano i po raz ostatni płukano żel w wodzie destylowanej. Wykonano dokumentację fotograficzną wyniku barwienia.

7.4. Analizy statystyczne i bioinformatyczne

7.4.1. Analizy statystyczne wykorzystane w badaniach zmienności fenotypowej

Wyniki otrzymane dla zmienności fenotypowej poddano analizie przy użyciu programu Excel 2007 (część pakietu Microsoft Office 2007) i Statistica v.13 (StatSoft, 2013). Dla każdego pomiaru obliczono podstawowe statystyki opisowe (średnią arytmetyczną, odchylenie standardowe, medianę, kwartyle, minimum i maksimum) i przedstawiono graficznie w formie wykresu pudełkowego, częstość występowania danego pomiaru (histogram) wraz z krzywą Gaussa obrazującą rozkład normalny w populacji w podziale na płeć, oraz w podziale na grupy wiekowe..

Do porównania cech fenotypowych pomiędzy samcami i samicami oraz pomiędzy grupami wiekowymi zastosowano test Shapiro–Wilka w celu oceny normalności rozkładu zmiennych.

Dla pomiarów, dla których u obu płci spełnione zostało założenie o rozkładzie normalnym i jednorodnych wariancjach (test Levene’a, $p > 0,05$) użyto testu t-Studenta, natomiast przy nierównych wariancjach (test Levene’a, $p < 0,05$) – testu t z niezależną estymacją wariancji (test Welcha).

Dla pomiarów, dla których we wszystkich trzech grupach wiekowych spełnione zostało założenie o rozkładzie normalnym i jednorodnych wariancjach (test Levene’a, $p > 0,05$) użyto testu jednoczynnikowej ANOVA. Kolejno, jeśli występowały istotne różnice między grupami (test ANOVA $p < 0,05$) to wykonywanoy test NIR. Natomiast jeśli założenie o rozkładzie normalnym nie było spełnione to wykonywano test Kruskala-Wallisa. Za istotne statystycznie przyjęto wartości $p \leq 0,05$.

7.4.2. Analizy statystyczne wykorzystane w badaniach zmienności genetycznej na podstawie informacji rodowodowej

Analizę rodowodową przeprowadzono z wykorzystaniem programu ENDOG_4.8 (Gutiérrez i Goyache, 2005) służącego do oszacowania spokrewnienia, inbredu, oceny kompletności rodowodów i analizy dystansu genetycznego w obrębie populacji. W tym celu przygotowano odpowiednio sformatowaną bazę danych, w programie Excel 2007 (część pakietu Microsoft Office 2007), opartą wyłącznie na informacjach rodowodowych (Tabela 17). Dane niezbędne do analizy, obejmujące

informacje o rodzicach każdego osobnika oraz datę jego urodzenia, zostały uporządkowane chronologicznie (według daty urodzenia) i oznaczone numerycznie. W przypadkach, gdy brakowało danych o rodzicach, fakt ten został odpowiednio odnotowany poprzez przypisanie wartości ID = 0. Jeżeli rodowód nie zawierał dokładnej daty urodzenia, zgodnie z wymaganiami programu ENDOG_4.8 wprowadzono najbardziej prawdopodobną wartość (dotyczyło to 13 osobników). Na podstawie danych dotyczących najstarszych zwierząt przyjęto średni wiek uzyskania potomstwa na poziomie 3 lat, zarówno dla samców, jak i samic. Zgodnie z instrukcją programu ENDOG_4.8 każdy osobnik mógł wystąpić w kolumnie „ID_osobnik” wyłącznie jeden raz. W celu uniknięcia pomyłek związanych z powtarzającymi się lub podobnymi imionami, wszystkie psy przed zakodowaniem numerycznym identyfikowano na podstawie pełnego imienia oraz przydomka hodowlanego. Dodatkowo zakodowano płeć: wartość 1 oznaczała samca, natomiast wartość 2 – samicę.

Tabela 17. Fragment bazy danych rodowodowych badanej populacji polskiego spaniela myśliwskiego przygotowane do analiz programem ENDOG_4.8.

ID_osobnik	ID_Ojciec	ID_Matka	Data_ur	ID_plec
1	0	0	1.01.1996	2
2	0	0	1.01.1997	1
3	0	0	1.01.2000	1
4	0	0	1.01.2005	2
5	0	0	1.01.2005	1
6	2	1	1.01.1999	2
7	2	1	1.01.2002	2
8	3	7	2.04.2004	2
9	5	4	2.04.2008	1
10	0	0	14.05.2008	1
11	2	8	1.01.2009	2
12	0	0	1.01.2010	1
13	10	7	15.04.2011	2
14	10	7	15.04.2011	2
15	2	11	1.01.2012	1
16	12	6	7.06.2012	2
...	...	...	...	..

Na podstawie przygotowanej bazy rodowodowej w programie ENDOG_4.8 wyliczono następujące parametry:

1. Współczynnik inbredu (F) - miara homozygotyczności, wynikająca bezpośrednio z kojarzeń spokrewnionych osobników (Wright, 1931).
2. Współczynnik średniego spokrewnienia - miara średniego udziału genów danego osobnika w całej populacji (Goyache i wsp., 2003; Gutiérrez i wsp., 2003).
3. Efektywna wielkość populacji - liczba osobników aktywnie przekazujących geny w populacji, obliczona na podstawie regresji liniowej współczynnika inbredu względem daty urodzenia zgodnie z metodą Gutiérrez i wsp. (2003).
4. Liczba założycieli (f) – osobniki, dla których brak jest informacji o przodkach (Lacy, 1989).
5. Efektywna liczba założycieli (f_e) – liczba założycieli, przy założeniu, że każdy z nich wniósł równy wkład genetyczny w badaną populację (Lacy, 1989).
6. Efektywna liczba przodków (f_a) – minimalna liczba przodków, którzy mają istotny wpływ na różnorodność genetyczną badanej populacji (Boicharda i wsp., 1997).
7. Kompletność rodowodu – odsetek znanych przodków w pokoleniu; ocena trzech wskaźników według metody Gutiérrez i Goyache (2005) oraz wskaźnika kompletności (MacCluera i wsp., 1983).

7.4.3. Analiza statystyczna zmienności genetycznej z wykorzystaniem sekwencji mikrosatelitarnych

W celu dokonanie oceny zmienności genetycznej w badanej populacji polskiego spaniela myśliwskiego oszacowano za pomocą programu Cervus 3.0.3. (Marshall, 1998-2007; Kalinowski i wsp., 2007): liczbę alleli czyli całkowitą liczbę różnych alleli występujących w danym *locus* w badanej populacji; średnią liczbę alleli w *locus* wyrażoną jako iloraz średniej liczby alleli w danym *locus* i alleli we wszystkich *loci*, frekwencję alleli (procentowy udział) występujących w całej badanej populacji PSM; współczynnik heterozygotyczności obserwowanej (ang. *observed heterozygosity*, H_o) i heterozygotyczności oczekiwanej (ang. *expected heterozygosity*, H_e) (Ott, 1992), gdzie:

$$H_E = \frac{n}{n-1} \left(1 - \sum_{i=1}^l p_i^2 \right)$$

n – liczba alleli w próbie

p_i – frekwencja i – tego allelu (dla $i=1, 2, \dots, l$)

l – liczba alleli

a także wskaźnik polimorfizmu (ang. *Polymorphic Information Content* – PIC)

(Botstein i wsp., 1980):gdzie:

$$PIC = 1 - \sum_{i=1}^l p_i^2 - 2 \sum_{i=2}^l \sum_{j=1}^{i-1} (p_i^2 p_j^2)$$

p_i i p_j - frekwencja i - tego i j - tego allelu w populacji;

l - liczba różnych alleli

oraz oceniano zgodności rozkładu genotypów w populacji z oczekiwaną na podstawie prawa Hardy'ego-Weinberg przy zastosowano test nieparametryczny χ^2 (Cervus 3.0.3.) (Marshall, 1998-2007; Kalinowski i wsp., 2007).

Wykorzystując program ALFREQ (Tereba i Tereba, 2005) obliczono także frekwencje genotypów występujących w badanej populacji PSM z podziałem na płeć.

Do przedstawienia wizualizacji różnic między płciami badanej populacji polskiego spaniela myśliwskiego, wykorzystując frekwencję alleli badanych sekwencji, wykorzystano program GENETIX 4.05 (Belkhir i wsp., 1996-2004). Przy pomocy tego programu na podstawie analizy FactorialCorrespondence Analysis (CA; Benzècri, 1973) wykonano wykresy, które przedstawiają związki między genotypami *multilocus* poszczególnych osobników.

Stosując program STRUCTURE 2.3.4 (Pritchard i wsp. 2000; Falush i wsp. 2003) przeprowadzono analizę struktury populacji. Zastosowano model dla skorelowanych frekwencji alleli, wykonano 10000 burn-in steps i 100000 powtórzeń Markov-chain Monte Carlo (MCMC) dla różnej liczby klastrow ($K=2-5$). Analizę wykonano w 10 iteracjach dla każdej z wartości K . W celu określenia najbardziej prawdopodobnej liczby klastrow w populacji zastosowano metodę ΔK (Evanno i wsp. 2005). Wyniki zaimportowano do programu StructureSelector (Li i Liu, 2018), program ten, oprócz metody Evano, pozwala również wykonać analizę łączoną z wizualizacją danych w CLUMPAK (Kopelman i wsp., 2015). Programy te automatyzują przetwarzanie wyników analizy struktury genetycznej. Na podstawie niezależnych

iteracji dla poszczególnych wartości K program generuje zestawy danych przy użyciu algorytmu klastrowania Markowa, opartego na macierzy podobieństwa między tymi iteracjami. Program Clumpak następnie identyfikuje optymalne dopasowanie klastrów dla różnych wartości K.

Ze względu na różną liczbę zwierząt przeanalizowanych z wykorzystaniem paneli mikrosatelitarnych, zdecydowano wykonać rozdzielne analizy dla panelu 1 (P1) i panelu 2 (P2) oraz łączoną analizę P1 i P2 dla osobników posiadających genotypy w obu tych panelach, z tej analizy usunięto osobniki u których występowały braki w więcej niż 5 markerach (ok 30% brakujących genotypów).

7.4.4. Analizy bioinformatyczne otrzymanych sekwencji po sekwencjonowaniu metodą Sangera

Otrzymane po sekwencjonowaniu sekwencje badanego fragmentu regionu kontrolnego mtDNAsów rasy polski spaniel myśliwski, a także sekwencje fragmentu genu *PRCD* analizowano za pomocą czterech programów: BioEdit Sequence Alignment Editor 7.26 (Hall, 1999), Chromas 2.6.6 (Technelysium; 2018), Basic Local Alignment Search Tool (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) oraz Molecular Evolutionary Genetic Analysis MEGA 11.0.10 (Tamura i wsp., 2021). Dwa pierwsze służą ocenie otrzymanych chromatogramów (pliki w rozszerzeniu „.ab1”) i sprawdzeniu ewentualnych wątpliwości przy odczycie kolejności nukleotydów, a także do skorygowania błędów dostarczonych zapisów sekwencji w plikach z rozszerzeniem „.seq”.

Program BLAST umożliwił porównanie otrzymanych sekwencji do sekwencji referencyjnej (NC_002008.4). Z kolei program MEGA 11.0.10, umożliwił porównanie badanych sekwencji między sobą przy użyciu algorytmu ClustalW (Thompson i wsp., 1994). Metoda ta umożliwia automatyczne dopasowanie homologicznych pozycji nukleotydów pomiędzy analizowanymi sekwencjami, co stanowi podstawę do dalszej analizy filogenetycznej. Program MEGA 11.0.10 pozwala także na skonstruowanie drzewa filogenetycznego metodą neighbor-joining dla wyodrębnionych w czasie analiz linii mtDNA. Metoda neighbor-joining (Saitou i Nei; 1987) to uproszczona metoda minimalnej ewolucji, oparta na odległościach między sekwencjami i nie wymagająca założenia stałego tempa ewolucji, co sprawia, że jest szczególnie przydatna w analizie linii mtDNA. Wiarygodność uzyskanego drzewa filogenetycznego oceniono za pomocą

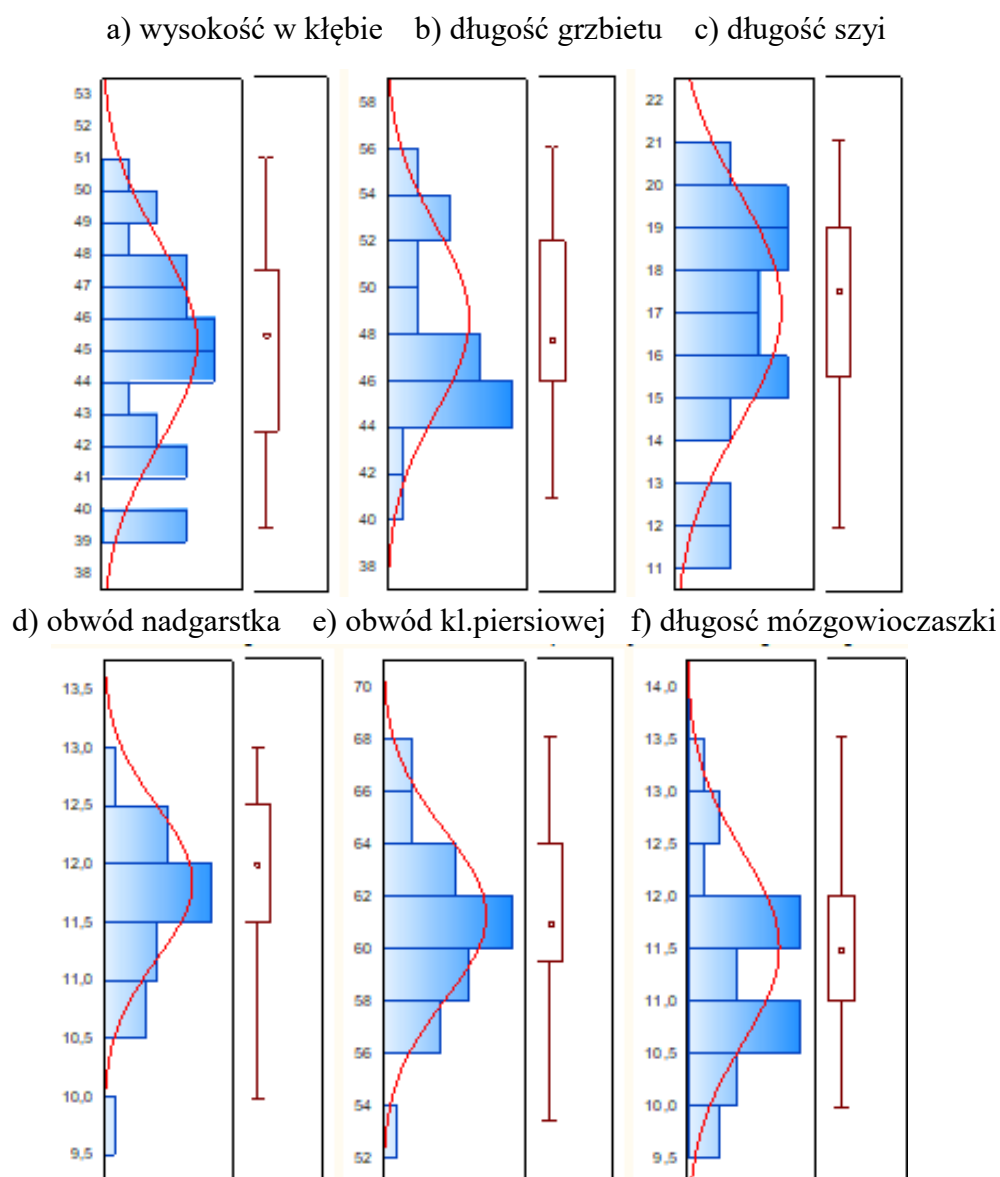
analizy bootstrapowej z wykorzystaniem 1000 replikacji, co pozwala na oszacowanie stabilności poszczególnych węzłów drzewa filogenetycznego (Felsenstein, 1985).

W wyniku przeprowadzonego sekwencjonowania uzyskano 65 sekwencji regionu pętli D mtDNA. Do dalszej analizy wybrano tylko sekwencje, których odczyt był dobrej jakości. Następnie przy pomocy programu MEGA 11.0.10 każdą sekwencję odpowiednio wyrównano (skrócono), aby analizowane fragmenty miały tę samą długość, którą ustalono na 165 pz.

8 Omówienie i dyskusja wyników

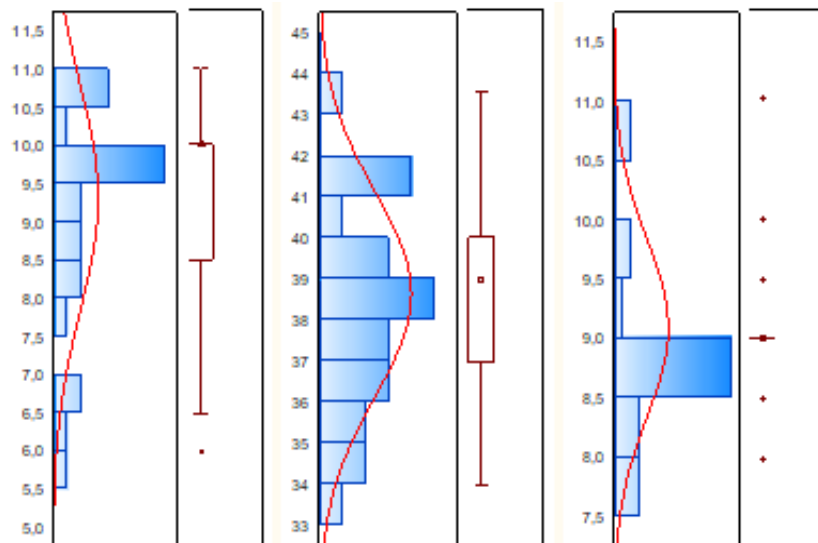
8.1 Analiza zmienności fenotypowej

Graficznie przedstawione wyników pomiarów w badanej populacji polskiego spaniela myśliwskiego w podziale na płeć (Rycina 5 i 6 – samce, Rycina 7 i 8 - samice).

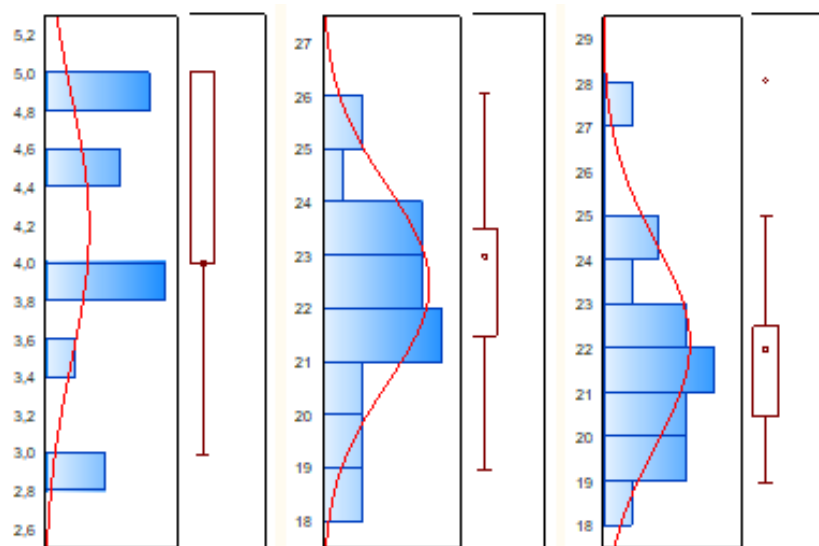


Rycina 5. Histogramy i wykresy pudełkowe pomiarów (a-f) zebranych u samców badanej populacji PSM (program Statistica v. 13).

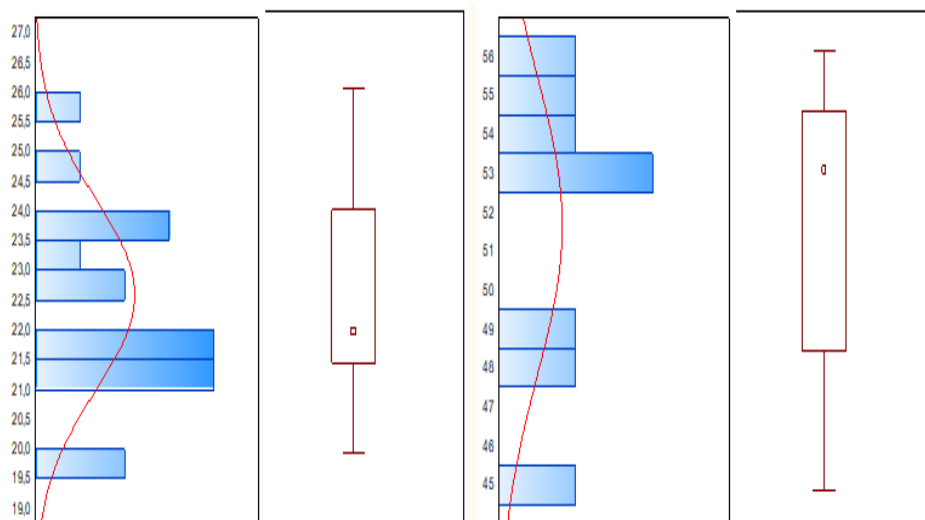
g) szerokość mózgowieczaszki h) obwód głowy i) długość kufy



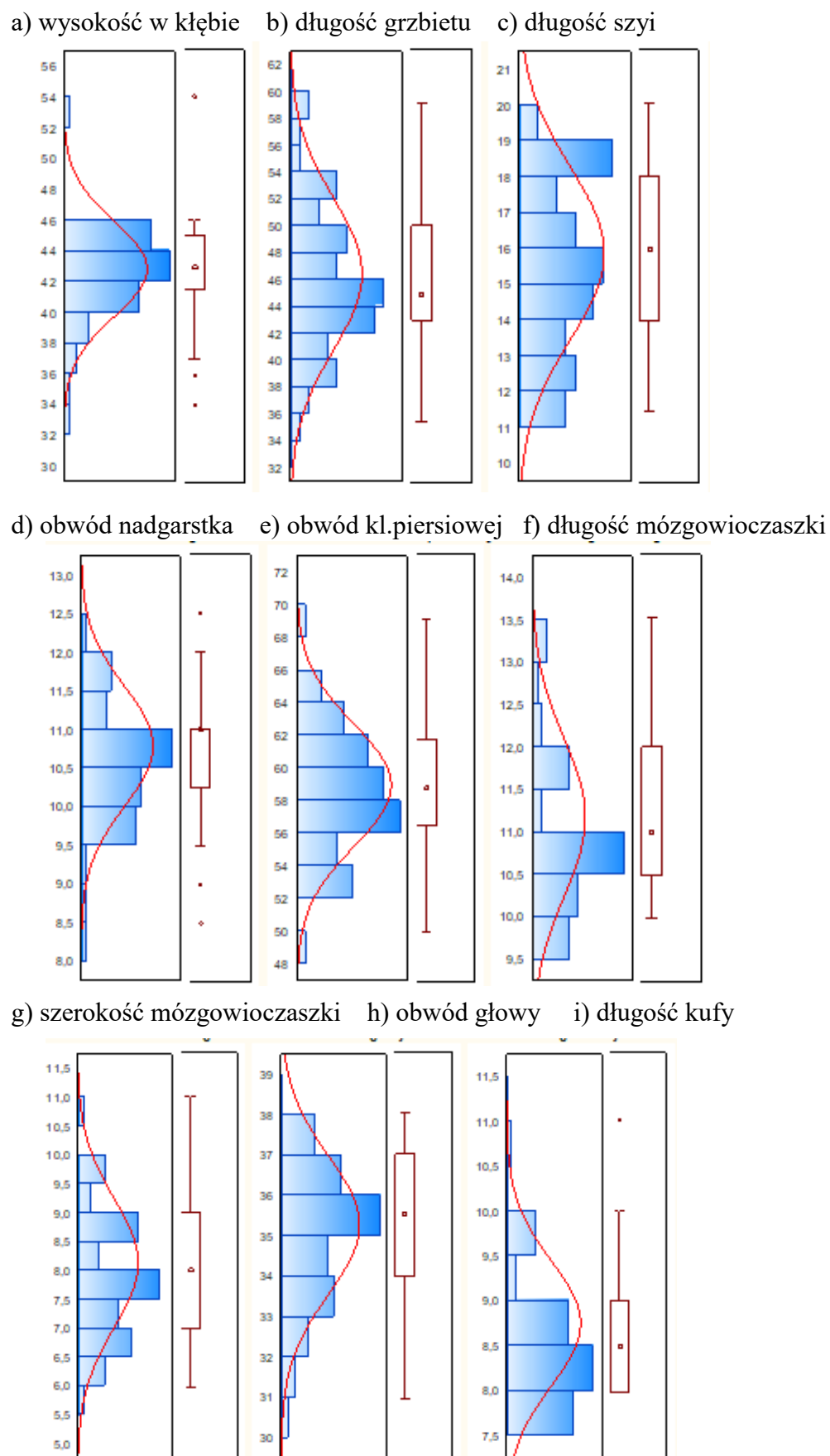
j) szerokość kufy k) obwód kufy l) wysokość do mostka



ł) głębokość kl.piersiowej m) długość skośna tułowia

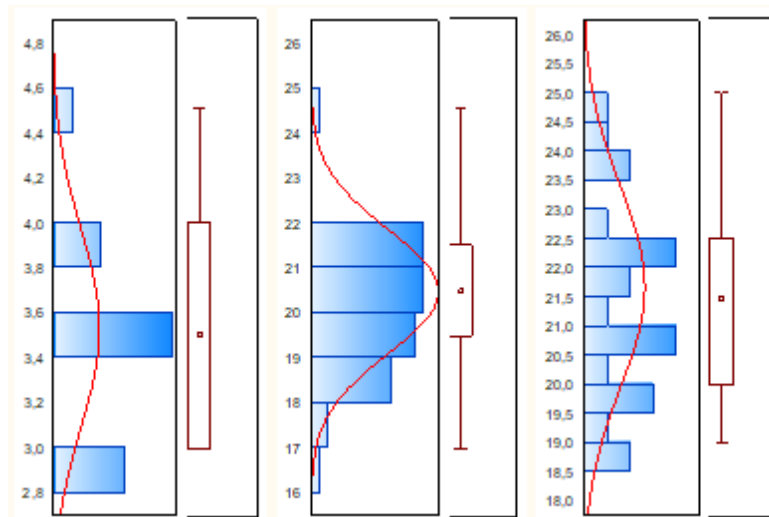


Rycina 6. Histogramy i wykresy pudełkowe pomiarów (g-m) zebranych u samców badanej populacji PSM (program Statistica v. 13).

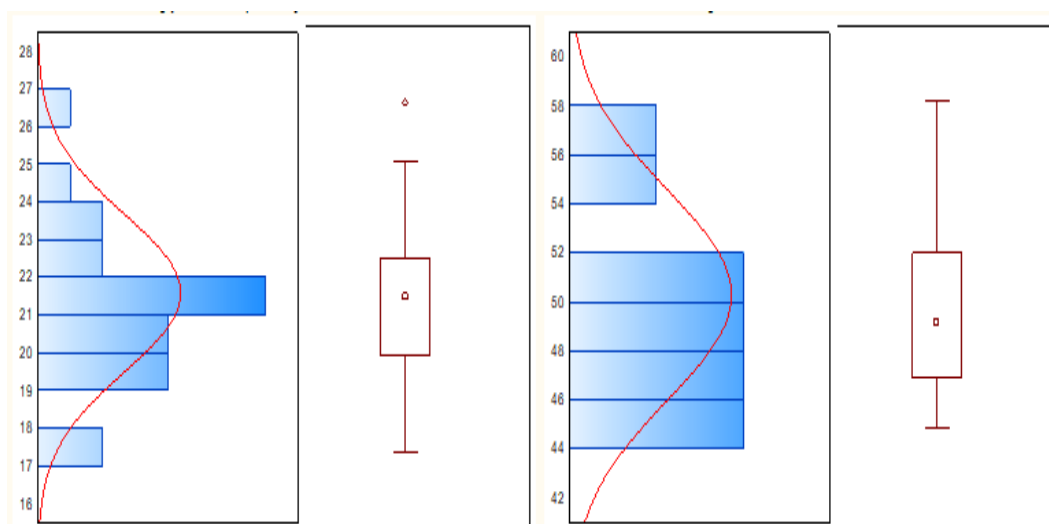


Rycina 7. Histogramy i wykresy pudełkowe pomiarów (a-i) zebranych u samic badanej populacji PSM (program Statistica v. 13).

j) szerokość kufy k) obwód kufy l) wysokość do mostka



ł) głębokość kl.piersiowej m) długość skośna tułowia



Rycina 8. Histogramy i wykresy pudełkowe pomiarów (j-m) zebranych u samic badanej populacji PSM (program Statistica v. 13).

Rozkład większości cech/pomiarów u samców był zgodny z rozkładem normalnym ($p > 0,05$), natomiast u samic większość parametrów (tj. wysokość w kłębie, długość szyi, obwód nadgarstka, długość i szerokość mózgowioczaski oraz długość, szerokość i obwód kufy) odbiegała od rozkładu normalnego.

Analizowane pomiary porównano pomiędzy płciami. Uzyskane wyniki zestawiono w Tabel 18 i 19.

Tabela 18. Wynik pomiarów zoometrycznych nr 1-7- średnie i odchylenia standardowe ($\bar{x} \pm SD$), mediana z odchyleniem ćwiartkowym ($Me \pm Q$) oraz wartości p testów statystycznych u polskiego spaniela myśliwskiego z podziałem na płeć.

Mierzony parameter	Psy		Suki		Rozkład (test Shapiro– Wilka)	Jednorodność wariancji (test Levene’a)	Test statystyczny	p	Istotność
	$\bar{x} \pm SD$ (cm)	(Me $\pm$ Q) (cm)	$\bar{x} \pm SD$ (cm)	(Me $\pm$ Q) (cm)					
Wysokość w kłębie	45,2 $\pm$ 3,16	45,5 $\pm$ 1,25	42,75 $\pm$ 2,25	43,0 $\pm$ 2	nN	-	U Manna-Whitneya	0,001	**
Wysokość mostka	22,08 $\pm$ 2,28	22 $\pm$ 2,25	21,65 $\pm$ 1,72	21,5 $\pm$ 0,75	N	0,539	t-Studenta	0,494	ns
Obwód klatki piersiowej	61,22 $\pm$ 3,19	61 $\pm$ 1,38	58,88 $\pm$ 3,74	58,75 $\pm$ 3	N	0,298	t-Studenta	0,005	**
Głębokość klatki piersiowej	22,58 $\pm$ 1,61	22 $\pm$ 0,5	21,57 $\pm$ 2,09	21,5 $\pm$ 0,5	N	0,689	t-Studenta	0,489	ns
Długość grzbietu	48,60 $\pm$ 3,94	47,75 $\pm$ 3,5	46,34 $\pm$ 3,5	45 $\pm$ 3,5	N	0,082	t-Studenta	0,069	ns
Długość skośna tułowia	51,63 $\pm$ 3,85	53 $\pm$ 3	50,25 $\pm$ 4,26	49,25 $\pm$ 3	N	0,856	t-Studenta	0,489	ns
Długość szyi	17,08 $\pm$ 2,72	17,5 $\pm$ 1,75	15,83 $\pm$ 2,39	16,0 $\pm$ 1,45	nN	-	U Manna-Whitneya	0,043	*

N-rozkład normalny, nN – brak rozkładu normalnego, ns – różnice nieistotne, *p<0.05 – różnice istotne, **p<0.01 – różnice wysoce istotne

Tabela 19. Wynik pomiarów zoometrycznych nr 8-14 - średnie i odchylenia standardowe ($\bar{x} \pm SD$), mediana z odstępem ćwiartkowym ($Me \pm Q$) (cm) oraz wartości p testów statystycznych u polskiego spaniela myśliwskiego z podziałem na płeć.

Mierzony parameter	Psy		Suki		Rozkład (test Shapiro– Wilka)	Jednorodność wariancji (test Levene’a)	Test statystyczny	p	Istotność
	$\bar{x} \pm SD$ (cm)	(Me $\pm$ Q) (cm)	$\bar{x} \pm SD$ (cm)	(Me $\pm$ Q) (cm)					
Obwód nadgarstka	11,83 $\pm$ 0,65	12,0 $\pm$ 0,5	10,77 $\pm$ 0,77	11 $\pm$ 0,38	nN	-	U Manna-Whitneya	0,000	**
Długość mózgowioczaski	11,5 $\pm$ 0,91	11,5 $\pm$ 0,5	11,16 $\pm$ 0,92	11 $\pm$ 0,75	nN	-	U Manna-Whitneya	0,084	ns
Szerokość mózgowioczaski	2,92 $\pm$ 1,47	10,0 $\pm$ 0,75	8,11 $\pm$ 1,12	8,0 $\pm$ 0,5	nN	-	U Manna-Whitneya	0,001	**
Obwód głowy	38,60 $\pm$ 2,48	39 $\pm$ 1,5	35,24 $\pm$ 1,70	8,5 $\pm$ 1,5	N	0,038	t z niezależną estymacją wariancji (test Welsha)	0,000	**
Długość kufy	9,08 $\pm$ 0,74	9,0 $\pm$ 0	8,74 $\pm$ 0,69	8,5 $\pm$ 0,5	nN	-	U Manna-Whitneya	0,025	*
Szerokość kufy	4,17 $\pm$ 0,69	4,0 $\pm$ 0,5	3,53 $\pm$ 0,44	3,5 $\pm$ 0,5	nN	-	U Manna-Whitneya	0,000	**
Obwód kufy	22,42 $\pm$ 1,84	23,0 $\pm$ 1	21,65 $\pm$ 1,72	20,50 $\pm$ 1	nN	-	U Manna-Whitneya	0,000	**

N-rozkład normalny, nN – brak rozkładu normalnego, ns – różnice nieistotne, *p<0.05 – różnice istotne, **p<0.01 – różnice wysoce istotne

Wyniki analizy wskazują, że wartość (średnia lub mediana, w zależności czy dana miara miała cechy rozkładu normalnego czy nie) dla każdego badanego pomiaru była wyższa u samców niż u samic. Istotne różnice pomiędzy samcami i samicami wykazano w zakresie: długości szyi ($p = 0,043$) – u samców szyja dłuższa o ok. 1,5 cm; wysokości w kłębie ($p = 0,001$) – samce były średnio wyższe ok 2,5 cm; obwodu klatki piersiowej ($p = 0,005$) – samce miały bardziej rozbudowaną klatkę piersiową, ok. 2,5 cm większy obwód niż samice; obwodu nadgarstka ($p < 0,001$) – u samców kończyna w nadgarstku była grubsza o ok. 1 cm. Istotne różnice dotyczyły także pomiarów na głowie to jest: szerokości mózgowioczaski ($p = 0,002$), szerokości kufy ($p < 0,001$), obwodu kufy ($p < 0,001$) oraz obwodu głowy ($p < 0,001$), co może wskazywać na wyrażnie masywniejszą budowę czaszki u samców. Natomiast różnice w długości grzbietu ($p = 0,069$), długości kufy ($p = 0,052$), długości mózgowioczaski ($p = 0,121$), wysokości od podłoża do mostka ($p = 0,49$), głębokości klatki piersiowej ($p = 0,095$) oraz długości skośnej tułowia ($p = 0,489$) nie były istotne statystycznie. Powyższe wyniki wskazujące na występowanie różnic w wartościach pomiarów cech fenotypowych wskazują na występowanie w rasie polski spaniel myśliwski dymorfizmu płciowego.

Analiza zmienności fenotypowej obejmowała także wyniki pomiarów z podziałem na płeć i grupy wiekowe. W Tabeli 20 i 21 przedstawiono wyniki pomiarów zoometrycznych, oraz odpowiednio dobranych testów statystycznych z podziałem płeć i odpowiednie grupy wiekowe.

Tabela 20. Wartości p testów statystycznych pomiarów zoometrycznych nr 1-7 u polskiego spaniela myśliwskiego z podziałem na grupy wiekowe i płeć.

Mierzony parametr	Płeć	Rozkład (test Shapiro– Wilka)	Jednorodność wariancji (test Levene’a)	Test statystyczny	P	Istotność	Test post hoc	uwagi
Wysokość w kłębie	Psy	N	0,517	ANOVA	0,042	*	NIR	grupa wiekowa 3 różni się od 1 i 2
	Suki	nN	-	Kruskal–Wallis	0,086	ns	-	
Wysokość mostka	Psy	nN	-	Kruskal–Wallis	0,259	ns	–	-
	Suki	N	0,184	ANOVA	0,062	ns	-	-
Obwód kl. piersiowej	Psy	N	0,796	ANOVA	0,003	**	NIR	grupa wiekowa 3 różni się od 1 i 2
	Suki	N	0,983	ANOVA	0,0501	ns	-	
Głębokość kl. piersiowej	Psy	nN	0,024	Kruskal–Wallis	0,362	ns	–	-
	Suki	nN	-	Kruskal–Wallis	0,57	ns	-	-
Długość grzbietu	Psy	N	0,086	ANOVA	0,0499	*	NIR	grupa wiekowa 3 różni się od 1 i 2
	Suki	N	0,460	ANOVA	0,0501	ns	-	
Długość skośna tułowia	Psy	nN	--	Kruskal–Wallis	0,101	ns	-	-
	Suki	nN	-	Kruskal–Wallis	0,348	ns	-	-
Długość szyi	Psy	N	0,656	ANOVA	0,027	*	NIR	różnica pomiędzy grupą wiekową 1 i 3 grupa wiekowa 3 różni się od 1 i 2
	Suki	nN	-	Kruskal–Wallis	0,008	**	NIR	

N-rozkład normalny, nN – brak rozkładu normalnego, ns – różnice nieistotne, * $p < 0.05$ – różnice istotne, ** $p < 0.01$ – różnice wysoce istotne

Tabela 21. Wartości p testów statystycznych pomiarów zoometrycznych nr 8-14 u polskiego spaniela myśliwskiego w podziale na grupy wiekowe i płeć

Mierzony parametr	Płeć	Rozkład (test Shapiro– Wilka)	Jednorodność wariancji (test Levene’a)	Test statystyczny	p	Istotność	Test post hoc	uwagi
Obwód nadgarstka	Psy	nN	-	Kruskal–Wallis	0,592	ns	-	-
	Suki	nN	-	Kruskal–Wallis	0,531	ns	-	--
Długość mózgowioczaszki	Psy	N	0,000	Kruskal–Wallis	0,465	ns	-	-
	Suki	nN	-	Kruskal–Wallis	0,958	ns	-	-
Szerokość mózgowioczaszki	Psy	nN	-	Kruskal–Wallis	0,823	ns	-	-
	Suki	N	0,781	ANOVA	0,316	ns	-	-
Obwód głowy	Psy	N	0,443	ANOVA	0,166	ns	-	-
	Suki	N	0,776	ANOVA	0,463	ns	-	-
Długość kufy	Psy	N	0,219	ANOVA	0,698	ns	-	-
	Suki	nN	-	Kruskal–Wallis	0,0264	*	NIR	różnica pomiędzy grupą wiekową 1 i 3
Szerokość kufy	Psy	nN	-	Kruskal–Wallis	0,465	ns	-	-
	Suki	nN	-	Kruskal–Wallis	0,687	ns	-	-
Obwód kufy	Psy	N	0,088	ANOVA	0,004	***	NIR	grupa wiekowa 3 różni się od 1 i 2
	Suki	N	0,552	ANOVA	0,142	ns	-	-

N - rozkład normalny, nN – brak rozkładu normalnego, ns – różnice nieistotne, *p<0.05 – różnice istotne, **p<0.01 – różnice wysoce istotne

Analiza wariancji wykazała u samców istotne różnice między grupami wiekowymi dla kilku parametrów zoometrycznych: wysokości w kłębie ($p = 0,042$), obwodu klatki piersiowej ($p = 0,003$), długości grzbietu ($p = 0,0499$), długości szyi ($p = 0,027$) oraz obwodu kufy ($p = 0,004$). Oznacza to prawdopodobnie, że wraz z wiekiem następował wzrost wymiarów ciała samców, obejmujący zarówno cechy tułowia, jak i części kufy. Pozostałe analizowane parametry, takie jak wysokość mostka, głębokość klatki piersiowej, długość skośna tułowia czy cechy budowy czaszki i kufy (długość, szerokość iobwód – z wyjątkiem obwodu kufy), nie wykazały istotnych różnic między grupami wiekowymi ($p > 0,05$). W grupie samic istotne zróżnicowanie pomiędzy grupami wiekowymi dotyczyło dwóch parametrów. Test Kruskala–Wallisa wykazał istotne różnice w zakresie długości szyi ($p = 0,008$) oraz długości kufy ($p = 0,0264$). Test post hoc NIR wskazywały, że w przypadku długości szyi grupa wiekowa III wykazywała istotnie niższą medianę niż w grupie I i II (podobnie jak średnie grupy wiekowe dla samców). Może to wynikać ze zmian postawy u starszych zwierząt, spowodowanych m.in. pogłębiającymi się zmianami w obrębie połączeń kręgow szyjnych lub niestabilnością struktur stawowych, co mogło wpłynąć na dokładność uzyskanych pomiarów. Z drugiej strony warto zauważyć, że w grupie III suki w wieku powyżej 6. roku życia stanowiły jedynie 26%, co sugeruje, iż obserwowane różnice mogły mieć charakter losowy. Drugi parametr, dla którego stwierdzono istotną różnicę (długość kufy), wykazywał wyższą medianę w najstarszej grupie wiekowej (III) w porównaniu z grupą najmłodszą (I), co może wskazywać na dalszy, choć niewielki rozwój części tej części twarzoczaszki wraz z wiekiem. Pozostałe cechy, takie jak wysokość w kłębie, obwód klatki piersiowej, długość grzbietu czy parametry głowy, nie wykazały istotnych różnic ($p > 0,05$).

W Tabeli 22 i 23 zaprezentowano wyniki charakteryzujące zebrane pomiary w podziale na grupy wiekowe w obrębie płci. Przy ocenie pomiarów w poszczególnych grupach wiekowych, należy zaznaczyć, że żaden z analizowanych osobników nie miał wykonanych pomiarów powtórnie, dlatego uzyskane dane mają charakter jednorazowy i nie odzwierciedlają zmian cech w czasie. Porównując wyniki uzyskane dla samców i samic, można zauważyć, że badanej populacji polskiego spaniela myśliwskiego różnice między kategoriami wiekowymi u samców były bardziej wyraźne i dotyczyły większej liczby cech. Starsze samce miały wyższe wartości dla kilku parametrów tułowia i głowy, co może być związane z wpływem czynników hormonalnych (głównie testosteronu) oraz dłuższym okresem wzrostu kośćca i umięśnienia. U samic natomiast

różnice ograniczały się głównie do długości szyi i kufy, co może wskazywać na mniejszą zmienność wymiarów ciała w zależności od wieku lub wcześniejsze osiągnięcie dojrzałej budowy ciała.

Tabela 22. Wynik pomiarów zoometrycznych nr 1-7 - średnie i odchylenia standardowe ($\bar{x} \pm SD$) oraz mediana z odchyleniem kwartylowym ($Me \pm Q$) (cm) w podziale na płeć i grupy wiekowe.

Mierzony parametr	Psy - grupa wiekowa			Suki - grupa wiekowa		
	I	II	III	I	II	III
wysokość w kłębie $\bar{x} \pm SD(\text{cm})$	44,2 $\pm$ 2,68	44,69 $\pm$ 3,27	48,5 $\pm$ 2,65	41,84 $\pm$ 3,89	42,21 $\pm$ 2,26	44,1 $\pm$ 2,70
Me $\pm$ Q (cm)	44,5 $\pm$ 2	45,5 $\pm$ 3,6	49 $\pm$ 2	42 $\pm$ 6	42,75 $\pm$ 1,25	44 $\pm$ 1,38
długość grzbietu $\bar{x} \pm SD(\text{cm})$	47,43 $\pm$ 4,26	48,75 $\pm$ 2,48	53 $\pm$ 3,89	44,45 $\pm$ 5,22	46,46 $\pm$ 6,70	47,83 $\pm$ 4,88
Me $\pm$ Q (cm)	46 $\pm$ 3,76	48 $\pm$ 1	54,25 $\pm$ 2,75	44,5 $\pm$ 3,88	45 $\pm$ 4,25	48 $\pm$ 3,5
długość szyi $\bar{x} \pm SD(\text{cm})$	16,7 $\pm$ 2,33	19,19 $\pm$ 2,56	14,13 $\pm$ 2,17	16,45 $\pm$ 2,19	16,89 $\pm$ 2,21	14,60 $\pm$ 2,27
Me $\pm$ Q (cm)	16 $\pm$ 2,25	18 $\pm$ 1,5	14,25 $\pm$ 1,88	16,5 $\pm$ 1,38	17 $\pm$ 1,5	14,5 $\pm$ 1
obwód nadgarstka $\bar{x} \pm SD(\text{cm})$	11,75 $\pm$ 0,71	12,13 $\pm$ 0,64	12,63 $\pm$ 0,75	10,75 $\pm$ 0,77	10,5 $\pm$ 0,87	10,86 $\pm$ 0,65
Me $\pm$ Q (cm)	12 $\pm$ 0,5	12 $\pm$ 0,25	12,5 $\pm$ 0,63	11 $\pm$ 0,38	10,5 $\pm$ 0,5	11 $\pm$ 0,25
obwód klatki piersiowej $\bar{x} \pm SD(\text{cm})$	59,68 $\pm$ 2,67	61,69 $\pm$ 3,03	65,25 $\pm$ 1,89	57,60 $\pm$ 3,88	58,37 $\pm$ 3,44	60,27 $\pm$ 3,17
Me $\pm$ Q (cm)	60 $\pm$ 1	61,5 $\pm$ 1,25	64,5 $\pm$ 1,25	57,5 $\pm$ 1,5	59 $\pm$ 2,75	60,5 $\pm$ 2,5
długość mózgowioczaski $\bar{x} \pm SD(\text{cm})$	11,3 $\pm$ 1,60	11,81 $\pm$ 1,56	16,88 $\pm$ 6,06	11,16 $\pm$ 1,20	11,07 $\pm$ 1,05	12,12 $\pm$ 3,39
Me $\pm$ Q (cm)	11,5 $\pm$ 1,25	11,25 $\pm$ 0,63	17 $\pm$ 10,25	11 $\pm$ 0,75	11 $\pm$ 0,5	11 $\pm$ 1

Tabela 23. Wynik pomiarów zoometrycznych nr 1-7 - średnie i odchylenia standardowe ($\bar{x} \pm SD$) oraz mediana z odstępem kwartylowym ($Me \pm Q$) (cm) w podziale na płeć i grupy wiekowe.

Mierzony parametr	Psy - grupa wiekowa			Suki - grupa wiekowa		
	I	II	III	I	II	III
szer. mózgowieczaszki $\bar{x} \pm SD(\text{cm})$	$9,03 \pm 1,68$	$9,13 \pm 1,62$	$9,75 \pm 1,77$	$7,82 \pm 1,15$	$8,36 \pm 1,03$	$8,30 \pm 1,21$
$Me \pm Q$ (cm)	$10 \pm 1,5$	$10 \pm 1,13$	$9,75 \pm 1,25$	$8 \pm 0,75$	$8 \pm 0,5$	$8 \pm 0,75$
obwód głowy $\bar{x} \pm SD(\text{cm})$	$37,88 \pm 2,01$	$39,63 \pm 2,86$	$40 \pm 2,12$	$34,88 \pm 1,80$	$35,43 \pm 2,11$	$35,59 \pm 1,58$
$Me \pm Q$ (cm)	$38 \pm 1,25$	$39,5 \pm 2,25$	$40 \pm 1,5$	$34,75 \pm 1,25$	$35,5 \pm 1,25$	36 ± 2
długość kufy $\bar{x} \pm SD(\text{cm})$	$8,5 \pm 1,63$	$8,56 \pm 0,68$	$9,13 \pm 0,63$	$7,4 \pm 1,66$	$7,61 \pm 1,24$	$8,5 \pm 1,06$
$Me \pm Q$ (cm)	$8,5 \pm 1,25$	$8,75 \pm 0,5$	$9 \pm 0,38$	$7 \pm 0,75$	$8 \pm 0,5$	$8 \pm 0,5$
szerokość kufy $\bar{x} \pm SD(\text{cm})$	$4,03 \pm 0,93$	$4,13 \pm 0,58$	$6,62 \pm 2,56$	$3,5 \pm 0,47$	$3,57 \pm 0,68$	$3,60 \pm 0,44$
$Me \pm Q$ (cm)	4 ± 1	$4 \pm 0,25$	$6,5 \pm 2,13$	$3,5 \pm 0,2,5$	$3,5 \pm 0,5$	$3,5 \pm 0,25$
obwód kufy $\bar{x} \pm SD(\text{cm})$	$21,71 \pm 1,85$	$22,88 \pm 0,92$	$25,13 \pm 1,65$	$20,23 \pm 1,29$	$20,07 \pm 1,31$	$20,90 \pm 1,42$
$Me \pm Q$ (cm)	$21,75 \pm 1,5$	$23,25 \pm 0,75$	$25,25 \pm 1,13$	$20 \pm 1,13$	$20 \pm 0,75$	21 ± 1
wysokość mostka $\bar{x} \pm SD(\text{cm})$	$22,35 \pm 2,80$	$21,92 \pm 1,53$	$21,92 \pm 1,53$	$21,95 \pm 1,96$	$21,29 \pm 1,70$	$21,13 \pm 0,63$
$Me \pm Q$ (cm)	$21,5 \pm 2,5$	$22,25 \pm 0,75$	19 ± 0	$22,25 \pm 1,5$	$21,5 \pm 1,5$	$21 \pm 0,38$
gł klatki piersiowej $\bar{x} \pm SD(\text{cm})$	$22,28 \pm 1,35$	$20,67 \pm 4,18$	24 ± 0	$20,64 \pm 2,96$	$22,13 \pm 2,43$	$22,38 \pm 1,80$
$Me \pm Q$ (cm)	$22 \pm 0,5$	$21,5 \pm 3,5$	24 ± 0	$21,5 \pm 1$	$21,25 \pm 2$	$21,75 \pm 1,13$
dł. skośna tułowia $\bar{x} \pm SD(\text{cm})$	$48,6 \pm 3,36$	$53,67 \pm 1,15$	56 ± 0	$43,3 \pm 11,57$	$40,5 \pm 12,29$	52 ± 0
$Me \pm Q$ (cm)	48 ± 2	53 ± 1	56 ± 0	$47 \pm 1,25$	$44,5 \pm 8,5$	52 ± 0

Analizowane wyniki można uznać za badania wstępne nad zmiennością fenotypową polskiego spaniela myśliwskiego. Zakres badań należy rozszerzyć, przeprowadzając podobne pomiary na przykład w sześciu grupach wiekowych – w 6., 12., 18. i 24. 30. i 36 miesiącu życia. Umożliwiłoby to prześledzenie dynamiki rozwoju somatycznego psów rasy polski spaniel myśliwski.

Sutter i wsp. (2008) w swoich obszernych badaniach przeanalizowali 1155 psów z 53 ras, dokonując 27 pomiarów. Zakładali, że wszystkie miary zebrane od minimum 3 samców i 3 samic z danej rasy są wystarczające, aby uznać je za wiarygodny wynik dla rasy. W niniejszej dysertacji liczba osobników, dla których zebrano wszystkie pomiary to odpowiednio: 7 samców i 10 samic. W badaniach Suttera i wsp. (2008) wykazano ponadto, że średnia wielkość samców u psów domowych stanowi około 109% wielkości samic, co potwierdza występowanie dymorfizmu płciowego w obrębie gatunku. Dla polskiego spaniela myśliwskiego wartość ta wynosiła około 105%, co wskazuje na umiarkowany poziom dymorfizmu. Oznacza to, że samce tej rasy są przeciętnie o około 5% większe od suk. Takie wyniki sugerują, iż dymorfizm płciowy w tej rasie jest wyraźny, ale mniej zaznaczony niż średnio obserwowano u psa domowego, co może być wynikiem pracy hodowlanej - selekcji ukierunkowanej na cechy użytkowe, a nie na rozmiar ciała. W literaturze naukowej nie znaleziono informacji dotyczącej pomiarów zoometrycznych polskiego spaniela myśliwskiego. Prezentowane w niniejszej dysertacji wyniki są pod tym kątem unikatowe. Ponadto, nie udało się znaleźć artykułów mówiących o pomiarach zoometrycznych u innych ras spanieli takich jak: angielski spring spaniel, angielski cocker spaniel, spaniel bretoński czy płochacz niemiecki, które prawdopodobnie zostały wykorzystane w powstaniu rasy polski spaniel myśliwski. Wyniki porównano więc z informacjami znajdującymi się w standardzie (wzorcu) wymienionych wyżej ras psa domowego (<https://www.zkwp.pl/wzorcu/5.pdf>; <https://www.zkwp.pl/wzorcu/125.pdf>; <https://www.zkwp.pl/wzorcu/95.pdf>, <https://www.zkwp.pl/wzorcu/104.pdf>) (Tabela 24).

Tabela 24. Porównanie wysokości w kłębie według standardu rasy polskiego spaniela myśliwskiego i standardu innych ras spanieli wykorzystanych prawdopodobnie w powstaniu rasy PSM (<https://www.zkwp.pl/wzorcel/5.pdf>; <https://www.zkwp.pl/wzorcel/125.pdf>; <https://www.zkwp.pl/wzorcel/95.pdf>, <https://www.zkwp.pl/wzorcel/104.pdf>, https://www.zkwp.pl/wzorcel/1002_PL.pdf)

Rasa psa domowego	Wysokość w kłębie (cm)	
	samce	samice
polski spaniel myśliwski	43-48 ± 2	42-44 ± 2
angielski cocker spaniel	39-41	38-39
angielski springer spaniel	51	51
spaniel bretoński	47-52	46-51
płochacz niemiecki	48-54	46-52

Porównanie wyników pomiarów zoometrycznych z wartościami zaczerpniętymi ze wzorców innych ras spanieli (Tabela 24) wskazuje, że polski spaniel myśliwski pod względem wysokości w kłębie zajmuje pozycję pośrednią pomiędzy wartością pomiaru rasy angielski cocker spaniel a pozostałymi rasami spanieli. Warto podkreślić, że standard rasy polskiego spaniela myśliwskiego ma charakter wstępny, dlatego podane wartości mogą ulec modyfikacji w trakcie procedur związanych z ostatecznym uznaniem rasy przez FCI. Obecnie wysokość w kłębie (43 - 48 ±2 cm u samców i 42 - 44 ±2 cm u samic) jest zbliżona do dolnych granic przedziału typowego dla spaniela bretońskiego i płochacza niemieckiego (<https://www.zkwp.pl/wzorcel/95.pdf> , <https://www.zkwp.pl/wzorcel/104.pdf>). Dla angielskiego springer spaniela wysokość w kłębie określono na stałym poziomie 51 cm dla obu płci (<https://www.zkwp.pl/wzorcel/125.pdf>), co stanowi wartość zbliżoną do wartości psów rasy PSM, natomiast w przypadku suk jest to około 6 cm różnicy.

Porównując oszacowane wartości uzyskane w analizie zmienności fenotypowej z wartościami określonymi w standardzie rasy polskiego spaniela myśliwskiego, stwierdzono, że badana populacja spełnia założenia wzorca. Średnia wysokość w kłębie u samców wyniosła 45,2 ± 3,16 cm, natomiast u samic mediana 43,0 cm przy rozstępie kwartylowym 41,5–45,0 cm, co jest zgodne z wartościami przewidzianymi we wzorcu rasy (43–48 ±2 cm u samców oraz 42–44 ±2 cm u samic) (https://www.zkwp.pl/wzorcel/1002_PL.pdf).

8.2 Analiza rodowodowa

8.2.1 „Mapa kojarzeń” – przedstawienie schematu kojarzeń oraz linii męskich i żeńskich u polskiego spaniela myśliwskiego

Na podstawie przedstawionego schematu (Rycina 9) i informacji rodowodowej wyodrębniono linie żeńskie i męskie. Linii męskich było osiem i oznaczono je literami alfabetu od „A” do „G” i „I” (Rycina 10). Najbardziej rozbudowane były linie „A” i „B”, które w niektórych odnogach obejmują nawet pięć pokoleń. Linii żeńskich wyodrębniono także jest osiem, którym przyporządkowano litery od „M” do „U” (Rycina 11). Największą pod względem liczebności potomków była linia „M”.

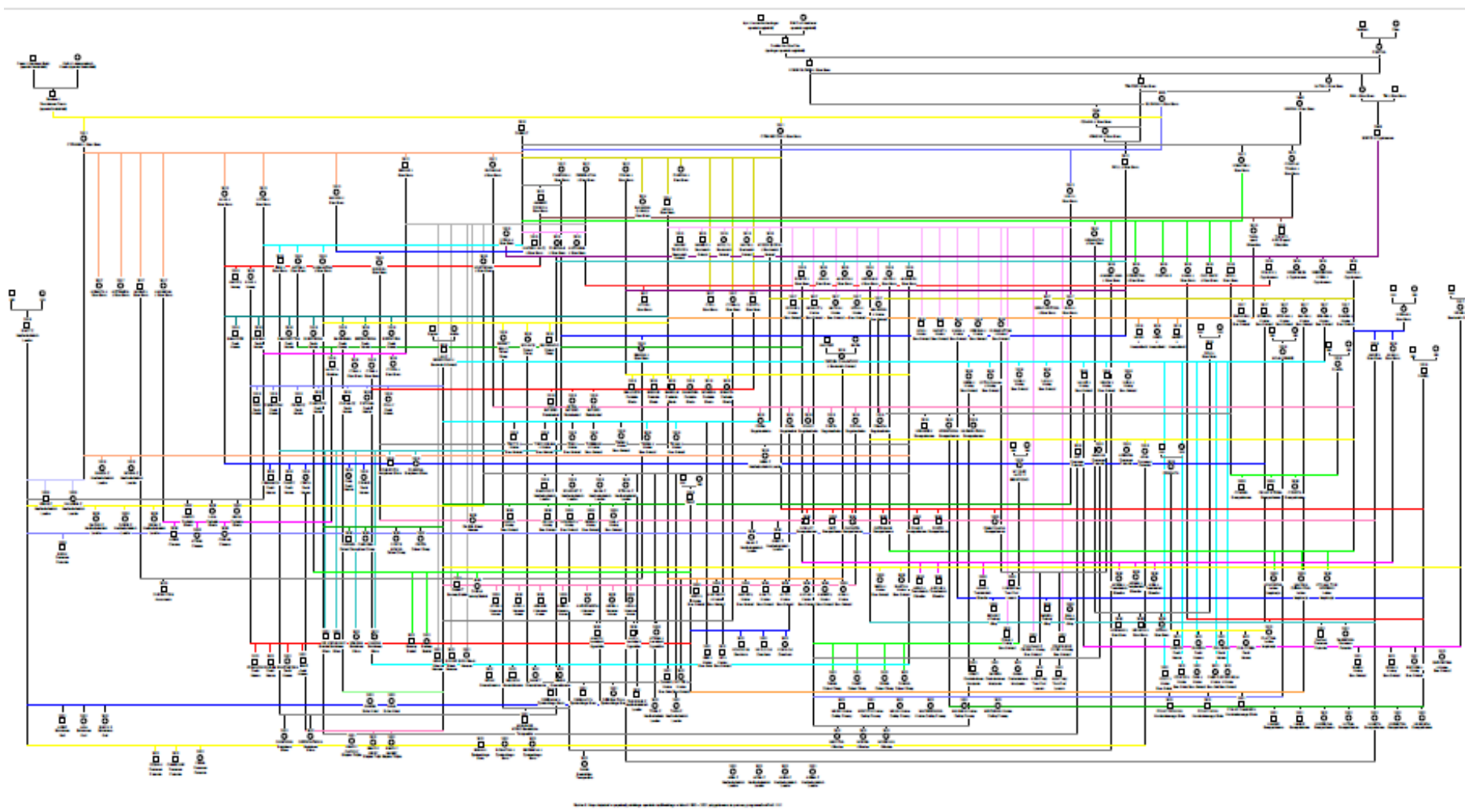
Linie łączące kojarzone pary pozostawiono w tym samym kolorze. Prezentując poszczególne linie, oznaczano tym samym kolorem każdego kolejnego potomka.

Objaśnienie do schematu linii męskich (Rycina 10):

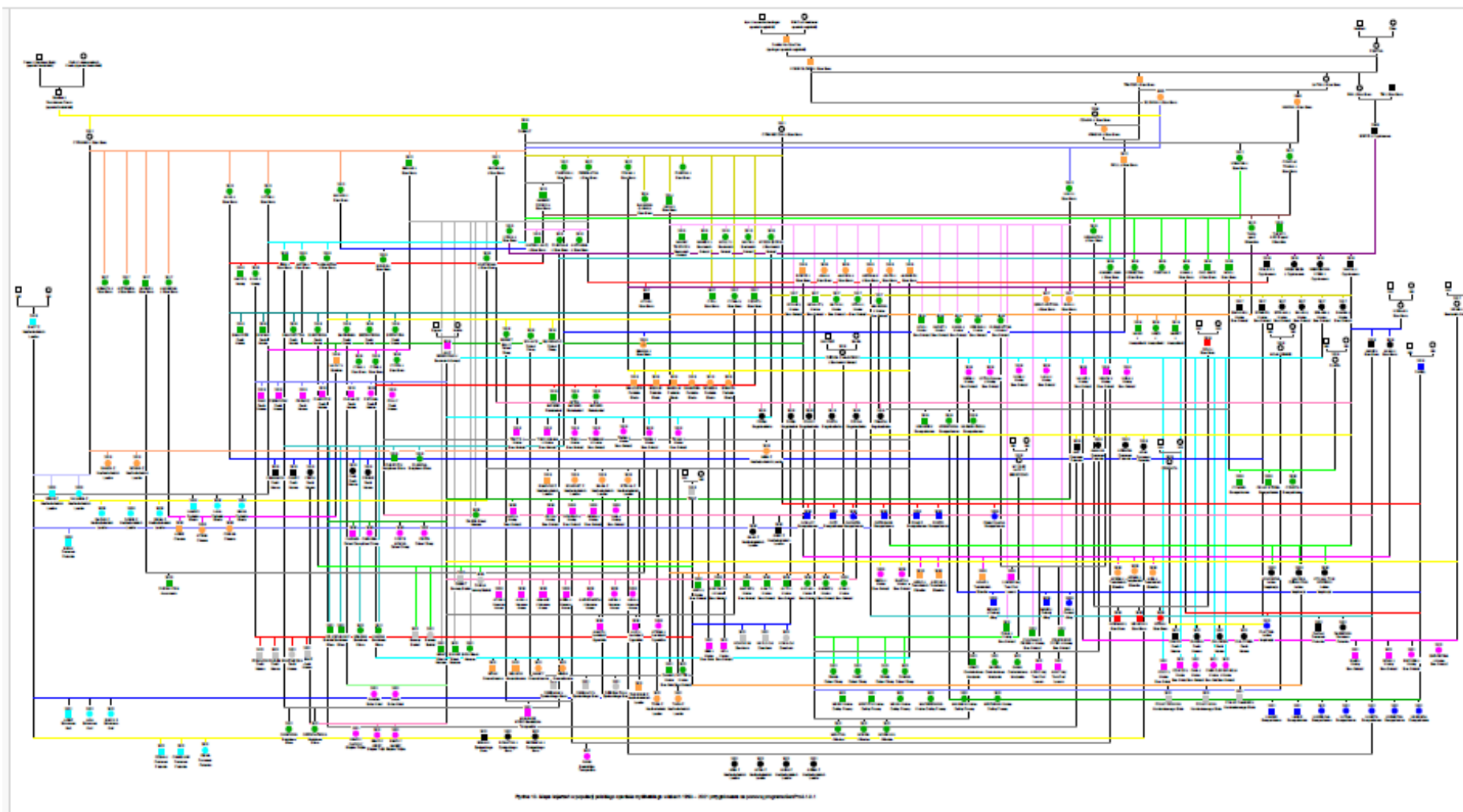
- Linia A – kolor zielony
- Linia B – kolor różowy
- Linia C – kolor pomarańczowy
- Linia D – kolor jasny niebieski
- Linia E – kolor szary
- Linia F – kolor czarny
- Linia G – kolor czerwony
- Linia I – kolor niebieski

Objaśnienie do schematu linii żeńskich (Rycina 11):

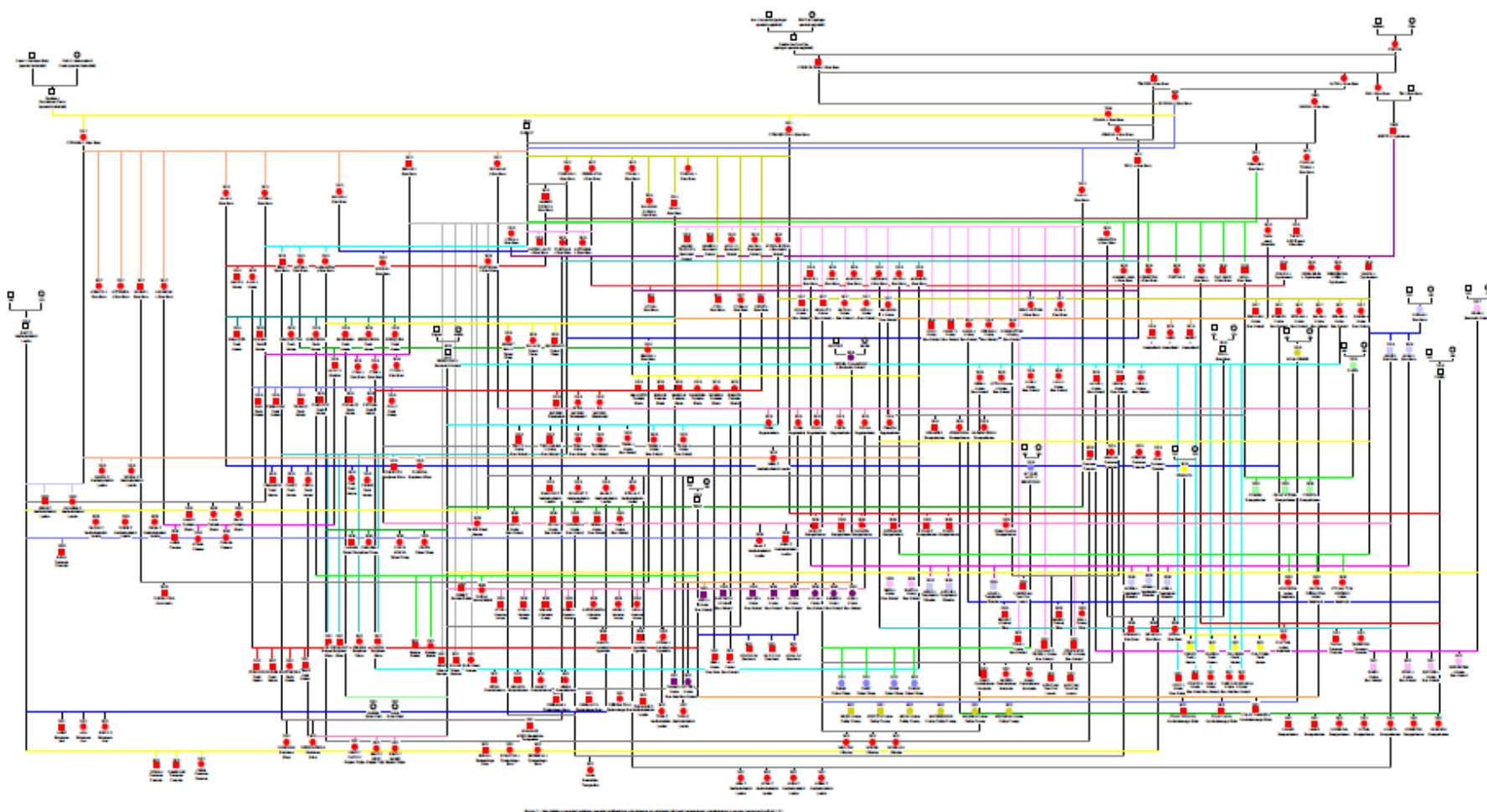
- Linia M – kolor czerwony
- Linia N – kolor różowy
- Linia O – kolor jasny zielony
- Linia P – kolor jasny złoty
- Linia R – kolor żółty
- Linia S – kolor fioletowy
- Linia T – kolor jasny niebieski
- Linia U – kolor niebieski



Rycina 9. Mapa kojarzeń w populacji polskiego spaniela myśliwskiego w latach 1993 – 2021 przygotowana za pomocą programu GenPro3.1.0.1



Rycina 10. Linie męskie w populacji polskiego spaniela myśliwskiego przygotowane na podstawie informacji rodowodowej, przedstawione za pomocą programu GenPro3.1.0.1.



Rycina 11. Linie żeńskie w populacji polskiego spaniela myśliwskiego przygotowane na podstawie informacji rodowodowej, przedstawione za pomocą programu GenPro3.1.0.1.

8.2.2 Zmienność genetyczna populacji polskiego spaniela myśliwskiego na podstawie analizy rodowodowej

Na podstawie rodowodów polskiego spaniela myśliwskiego oszacowano średni poziom spokrewnienia (AR) dla analizowanej populacji, który wyniósł 21,65%, natomiast średnia wartość współczynnika inbredu (F) wyniosła 7,38%. Spośród 548 analizowanych rodowodów badanych osobników, 306 (55,8%) było zinbredowanych ($F > 0$). Wartości F dla poszczególnych osobników w populacji wahała się od 0 % do 31,25 %, co wskazuje na prowadzenie przez hodowców/właścicieli psów kojarzeń osobników spokrewnionych. Wśród zidentyfikowanych przypadków można wyszczególnić:

- 4 pary kojarzeń pomiędzy pełnym rodzeństwem (0,73 %),
- 47 par kojarzeń pomiędzy półrodzeństwem (8,58 %),
- 16 par kojarzeń pomiędzy rodzicem a jego potomkiem (2,92 %).

Łącznie spośród wymienionych wyżej kojarzonych par, 67 par (12,23 %) dotyczyło osobników spokrewnionych w pierwszym lub drugim stopniu. Tego rodzaju dobór par do kojarzeń prowadzi do wzrostu inbredu i zmniejszenia zmienności genetycznej w populacji. Nie jest to zalecany program prowadzenia pracy hodowlanej, nie mniej stosowany przez hodowców. Tym bardziej, że wielu badaczy m.in. także Bannasch i wsp. (2021) w swoich badaniach wskazują, że osobniki pochodzące z ras/populacji o wysokim poziomie inbredu ($F > 12,5\%$) i bardzo wysokim ($F > 25\%$) częściej były poddawane opiece weterynaryjnej, co potwierdza to, że wysoki poziom inbredu może prowadzić do problemów zdrowotnych osobników zinbredowanych. Zmniejszenie liczebności miotu, czy też mniejsza przeżywalność szczeniąt jako następstwo wystąpienia depresji inbredowej u psów różnych ras opisują także Gresky i wsp. (2005) oraz Leroy i wsp. (2015). Ponadto, w badaniach Wellmann i Pfeiffer (2009) wykazano występowanie dodatniej korelacji pomiędzy wzrostem inbredu a wzrostem szansy na ujawnienie się chorób autosomalnych recesywnych. W bazie OMIA (ang. *Online Mendelian Inheritance in Animals*), umieszczono do tej pory 515 chorób genetycznych występujących u psa domowego, w tym 227 uwarunkowanych allelami recesywnymi (Nicholas i Tammen, 2025).

Jednak z drugiej strony, przy interpretacji otrzymanych wyników należy uwzględnić historię tworzenia rasy i wynikającą z tego próbę odtworzenia populacji polskiego spaniela myśliwskiego. Początkowe prace dr A. Krzywińskiego opierały się

na ograniczonej liczbie osobników i niewielkich możliwościach doboru par hodowlanych, co doprowadziło dokojarzeń w pokrewieństwie w nowopowstającej populacji polskiego spaniela myśliwskiego (Łakomik-Kaszuba, 2016, 2022).

Równie wysoki poziom inbredu w populacji ogara polskiego zaobserwowała w swoich badaniach Głazewska (2008). W badanej populacji na przestrzeni lat 1960-2004 inbred wzrósł u tej rasy z 7% do 37%. Równie wysoki średni współczynnik inbredu zanotowali Letko i wsp. (2020) w pracach nad rasą leonberger. Badania prowadzone były na rodowodach psów urodzonych w latach 1880-2016 i współczynnik inbredu w 2016 r. wyniósł 29%, a średnie spokrewnienie 31 %. Wysokie średnie spokrewnienie 25,3 % i 15,5 %, jak i współczynnik inbredu na poziomie 26,2 % i 22,0 % obserwowali Cole i wsp. (2004). Badali oni rasy, które cieszą się dużą popularnością wśród właścicieli psów i których jednocześnie liczebność osobników w rasie jest wysoka, czyli u ras owczarek niemiecki i labrador retriever, odpowiednio. Z kolei Bannash i wsp. (2021) prowadzący badania dotyczące spokrewnienia i inbredu u różnych ras psa domowego, w tym między innymi u ras z grupy spanieli, podają wartość współczynnika F dla cocker spaniela angielskiego na poziomie 39,0 %, a dla springer spaniela angielskiego 31,2 %. Na tle powyższych danych, współczynnik inbredu oszacowany w analizowanej populacji polskiego spaniela myśliwskiego może wydawać się dość niski, nie mniej jednak, jego wysoka wartość jest niepokojąca, gdyż jest to, patrząc na rys historyczny rasy, stosunkowo młoda rasa psa domowego. Jednak jak podkreślają: Leroy (2011), Lewis i wsp. (2015) oraz Bannasch(2021) w celu zachowania genetycznego „potencjału” rasy istnieje konieczność kontrolowania poziomu inbredu i kluczowe jest dokonywanie właściwego doboru zwierząt do kojarzeń.

Efektywna wielkość populacji (N_e), oszacowana metodą regresji liniowej inbredu względem daty urodzenia w badanej populacji polskiego spaniela myśliwskiego wyniosła 296,87. W badaniach dotyczących genetyki populacji zakłada się, że N_e powinna wynosić minimum 50, a wskazane jest aby wynosiła powyżej 100 (Frankham i wsp., 2002). Gdy efektywna wielkość populacji spada poniżej 100 utrata heterozygotyczności w kolejnych pokoleniach przyspiesza, a przy wartości poniżej 50 oznacza już jej utratę o 1% na pokolenie (Majala, 1990). Tym samym wzrasta ryzyko wystąpienia w danej populacji niepożądanych skutków inbredu. Henson (1990) udowodnił, że utrata różnorodności genetycznej w ciągu 10 pokoleń wyniosła dla N_e równego: 25, 50, 125, 250 i 500, co stanowiło odpowiednio 18%,10%,4%, 1,6% i 0,8%. Przy wartości 50 i mniejszej jest to już znaczna utrata różnorodności genetycznej.

Dość wysoka wartość N_e w analizowanej populacji polskiego spaniela myśliwskiego oszacowana na podstawie informacji rodowodowej świadczy o umiarkowanym tempie utraty różnorodności genetycznej. Na tej podstawie można wnioskować, że populacja PSM może być uważana za stabilną i że nie jest zagrożona gwałtownym wzrostem inbredu.

Dodatkowo wykonano symulację N_e , zgodnie z wymaganiami postawionymi przez FCI zawartymi w dokumentach, dotyczącymi międzynarodowego, tymczasowego uznania nowej rasy psa domowego (regulamin wewnętrzny FCI, załączniki nr 5). Wytyczne FCI wskazują, że w przypadku braku możliwości wyodrębnienia 8 grup rodzinnych, alternatywą może być oszacowanie efektywnej wielkości populacji (Frankham i wsp., 2002). N_e powinna być wyliczona dla populacji referencyjnej, definiowanej jako wszystkie osobniki urodzone w ciągu ostatnich pięciu lat oraz jej przodków z co najmniej trzech pokoleń wstecz (regulamin wewnętrzny FCI, załączniki nr 5). (W niniejszym rozdziale, nazwa „populacja referencyjna” użyta została jeszcze raz na kolejnej stronie, ale dotyczyła innej grupy zwierząt, zgodnie z opisem zastosowanym przez Gutiérrez i Goyache (2005). Na potrzeby niniejszej analizy, okres pięcioletni ustalono według daty urodzenia najmłodszego osobnika, dla którego rodowód otrzymano tj. 17.06.2024r. W okresie od 17.06.2019 r. do 17.06.2024 r. urodziło się 389 psów rasy polski spaniel myśliwski, a liczba ich przodków do trzeciego pokolenia wstecz liczyła 93 osobniki. Efektywną wielkość populacji N_e obliczono tą samą metodą jak dla całej analizowanej populacji. Jej wartość wyniosła 115,6 i była zgodna z procedurami FCI. Na dzień przeprowadzonej analizy (15.07.2025r.) rasa polski spaniel myśliwski spełnia, przynajmniej w omawianym zakresie, kryterium potrzebne do tymczasowego uznania rasy przez FCI.

Analiza struktury rodowodowej badanej populacji wykazała, że została ona założona przez niewielką liczbę osobników. Liczba założycieli wynosiła 26, natomiast ich efektywna liczba była znacznie niższa i wyniosła 6,23. Oznacza to, że udział poszczególnych założycieli był wysoce nierównomierny. Rzeczywisty wkład genetyczny do populacji był silnie skoncentrowany wokół kilku osobników (6,23), a pozostali założyciele wnieśli niewielki wkład lub na przestrzeni latich linie wygasły. Dodatkowo, tylko dwóch przodków odpowiadało za 50% zmienności genetycznej. Populacja została, więc utworzona w oparciu o niezwykle małą liczbę osobników (6,23). Pomimo tego, średni współczynnik inbredu (F) w populacji wyniósł 7,38% i był niższy od wartości oczekiwanej (8,02%) oszacowanej na podstawie udziału założycieli.

Nieodłącznym elementem analizy struktury populacji jest też liczba przodków. W analizie struktury przodków programem ENDOG_4.8 wykorzystuje się informacje o populacji referencyjnej (nie mylić z „populacją referencyjną” według FCI, zostało to wytłumaczone na poprzedniej stronie) rozumianej jako liczba osobników, dla których każdy z rodziców jest znany (Gutiérrez i Goyache, 2005). Wynik analizy wskazywał na 522 osobników populacji referencyjnej PSM, a liczba jej założycieli na 22, natomiast ich efektywna liczba oszacowana została na 6 osobników. Efektywna liczba założycieli była taka sama jak efektywna liczba przodków ($f_e=f_a=6$), co wskazuje, że ograniczenie różnorodności genetycznej populacji wynikało głównie z etapu założycielskiego, bez wyraźnych oznak dominacji pojedynczych reproduktorów w kolejnych pokoleniach. Plan hodowlany był prowadzony w sposób dość zrównoważony, bez istotnego zwiększenia udziału genetycznego pojedynczych osobników w kolejnych pokoleniach.

Analiza kompletności rodowodów przeprowadzona programem ENDOG_4.8 wykazała, że dane o rodzicach (pierwsze pokolenie wstecz) 548 osobników były dostępne w 95,26 % przypadków. Informacje o dziadkach (drugie pokolenie wstecz) były znane średnio w 79,65 % przypadków, natomiast dane dotyczące pradziadków (trzecie pokolenie wstecz) były dostępne jedynie w 54,84 % (Tabela 25.). W kolejnych pokoleniach wstecz (czwartym i piątym) zaobserwowano wyraźny spadek kompletności informacji rodowodowej.

Tabela 25. Kompletność rodowodów w badanej populacji polskiego spaniela myśliwskiego.

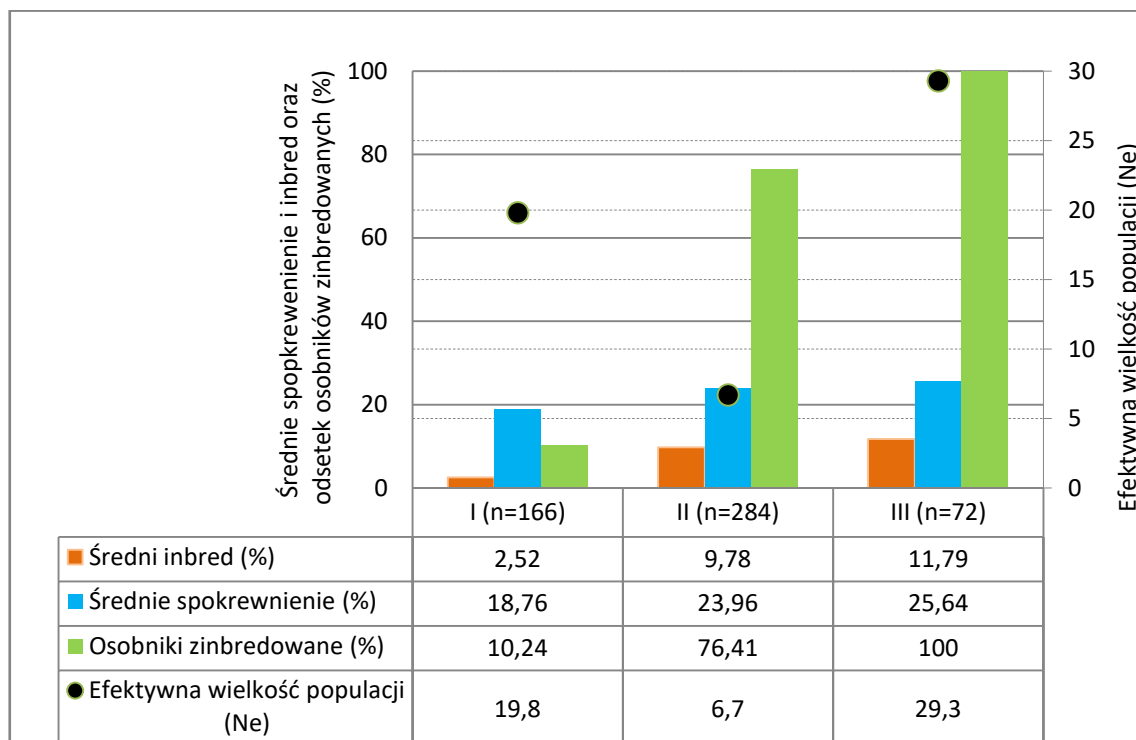
Pokolenie wstecz	Kompletność informacji o przodkach [%]
1	95,26
2	72,63 - 86,68
3	34,67 - 79,56
4	9,67 - 40,15
5	0,55 - 16,24

W celu dokładniejszej oceny zmienności genetycznej populacji, przeanalizowano ponownie podstawowe parametry zmienności genetycznej, przy czym analizę przeprowadzono:

- w rozbiciu na kolejne pokolenia (Rycina 12) Pokolenie I – liczba osobników z kompletnym rodowodem do pierwszego pokolenia wstecz (rodziców); pokolenie

II – liczba osobników z kompletnym rodowodem do drugiego pokolenia wstecz (dziadków); pokolenie III – liczba osobników z kompletnym rodowodem do trzeciego pokolenia wstecz (pradziadków),

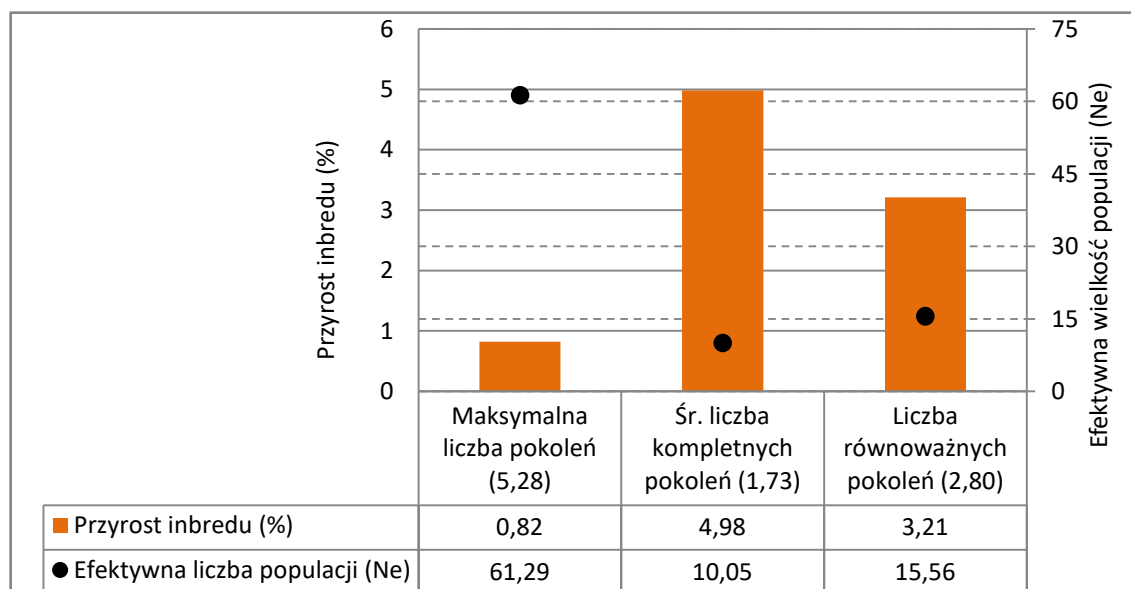
- w zależności od przyjętej liczby pokoleń (Rycina 13)



Rycina 12. Wybrane parametry analizy rodowodowej w populacji polskiego spaniela myśliwskiego w podziale na kolejne pokolenia.

Analiza danych wykazała, że „głębokość” dostępnego rodowodu wpływa na wartość podstawowych parametrów zmienności genetycznej populacji. Stwierdzono wzrost: współczynnika inbredu, średniego spokrewnienia oraz udziału osobników zinbredowanych wraz ze wzrostem liczby znanych pokoleń. Podobne wyniki badań zaprezentowane zostały przez innych autorów, szczególnie w odniesieniu do kilku pierwszych grup pokoleniowych (Calboli i wsp., 2008). W analizowanej populacji polskiego spaniela myśliwskiego obniżeniu ulega jedynie efektywna wielkość populacji w II pokoleniu ($N_e=6,7$), mimo, że to właśnie ta grupa była najliczniejszej reprezentowana (284 osobniki). Taki wynik może świadczyć o ograniczonej liczbie osobników aktywnie uczestniczących w rozrodzie w tym okresie, na przykład na skutek intensywnego wykorzystania wybranych reproduktorów. Zjawisko to jest dobrze udokumentowane w hodowli psów rasowych, gdzie ograniczona pula założycielska

oraz częste wykorzystywanie niewielkiej liczby dominujących (w rozumieniu często wykorzystywanych) reproduktorów prowadzi do szybkiego wzrostu spokrewnienia i inbrodu wewnątrz populacji (Leroy, 2011; Lewis i wsp., 2015, Bannasch i wsp., 2021). W pokoleniu III zaobserwowano ponowny wzrost N_e , co wskazywałoby na przejściowy efekt „popularnego” reproduktora, który był ograniczony jedynie do II pokolenia, bez trwałego wpływu na zmienność genetyczną populacji. W pokoleniu III zaobserwowano także najwyższy poziom inbrodu oraz bardzo wysoki udział osobników zinbredowanych (100%). Wyniki sugerują, że w pokoleniu III wzrastał udział kojarzeń krewniaczych. Należy mieć na uwadze też to, że zaobserwowany wzrost inbrodu pomiędzy pokoleniami I - III można też wytłumaczyć dysponowaniem bardziej kompletną informacją rodowodową o przodkach. Im więcej danych było dostępnych, tym dokładniejsza analiza mogła zostać przeprowadzona.



Rycina 13. Wybrane parametry analizy rodowodowej w populacji polskiego spaniela myśliwskiego w zależności od przyjętej liczby pokoleń.

Wartość efektywnej wielkości populacji (N_e) i przyrostu inbrodu (F) różniły się w zależności od liczby pokoleń uwzględnianej w analizie (Rycina 13). Przy maksymalnej liczbie pokoleń (średnio 5,28, maks. 9 pokoleń) wzrost inbrodu wyniósł 0,82 %, a efektywna wielkość populacji (N_e) wynosiła 61,29. Z kolei przy średniej liczbie kompletnych pokoleń (1,73), czyli liczbie pokoleń, dla których znana była pełna informacja o przodkach, wzrost inbrodu był wyższy i wynosił 4,98 %, przy dość niskiej efektywnej wielkości populacji ($N_e = 10,05$). Natomiast przy średniej liczbie pokoleń

(2,80), oszacowany wzrost inbredu wynosił 3,21 %, a efektywna wielkość populacji 15,56. Wyniki te wskazują na znaczące zróżnicowanie parametrów w zależności od przyjętej metodyki oceny głębokości rodowodu. Osobniki z bardzo „płytkim” rodowodem (np. informacja tylko o rodzicach) mają często zaniżony F, gdyż nie można zweryfikować pokrewieństwa, nie mając takich danych. Jak słusznie zauważa Calboli i wsp. (2008) brak pełnych danych rodowodowych utrudnia rzeczywistą ocenę poziomu inbredu. Dodatkowo, Leroy (2011) wskazuje, że analizy oparte na danych rodowodowych mają trzy istotne ograniczenia. Po pierwsze, nie wszystkie osobniki w populacji są rejestrowane. Dotyczy to psów rasowych, które mimo posiadania metryki urodzenia nie zawsze są zgłaszane do odpowiednich organów kynologicznych (np.: FCI – w Polsce ZKwP, The Kennel Club czy American Kennel Club), a tym samym nie otrzymują rodowodu. Po drugie, nawet jeśli dany osobnik ma rodowód, to w przypadku braku pełnych danych o jego rodzicach, czy dalszych przodkach, nie można wykluczyć potencjalnego pokrewieństwa z innymi osobnikami w analizowanej populacji. Osobnik może być blisko spokrewniony z innym, np. poprzez wspólnego ojca (półrodzeństwo), ale z powodu braku takiej informacji analiza nie uwzględni takiego powiązania. Po trzecie, drobne błędy pisarskie mogą wprowadzać błędną nazwę osobnika lub jego przodków, co także ma wpływ na obliczane parametry/wskaźniki. Z tego też względu, aby uzyskać pełniejszy obraz zmienności genetycznej populacji polskiego spaniela myśliwskiego, posłużono się w dalszych analizach wynikami analiz molekularnych z wykorzystaniem markerów genetycznych – sekwencji mikrosatelitarnych.

W celu oceny dynamiki reprodukcyjnej w analizowanej populacji polskiego spaniela myśliwskiego oszacowano odstęp międzypokoleniowy, definiowany jako średni wiek rodziców w chwili narodzin potomstwa przeznaczonego do reprodukcji (James, 1977). Dodatkowo wyliczono również średni wiek rodziców w chwili narodzin potomstwa niezależnie od jego późniejszego wykorzystania w hodowli. Analizę przeprowadzono osobno dla czterech podstawowych ścieżek genealogicznych: ojciec–syn, ojciec–córką, matka–syn oraz matka–córką. Wyniki uzyskane dla badanej populacji PSM przedstawiono w Tabeli 26.

Tabela 26. Odstęp międzypokoleniowy oraz średni wiek rodziców przy urodzeniu potomstwa (w latach) w badanej populacji polskiego spaniela myśliwskiego.

Ścieżka genealogiczna	Odstęp międzypokoleniowy (lata)	Średni wiek rodzica (lata)
Ojciec – syn	3,78	3,80
Ojciec – córka	3,68	3,78
Matka – syn	3,46	3,84
Matka – córka	4,25	3,75
Średnia	3,79	3,79

Oszacowane wartości były zbliżone, a średni wynik odstępu międzypokoleniowego i wieku rodzica identyczne - 3,79 lat. Wskazuje to na względnie stabilny system reprodukcyjny w populacji, bez wyraźnego opóźnienia w przystępowaniu danych osobników do rozrodu.

Dzięki analizom w programie ENDOG_4.8 możliwe było ustalenie w badanej populacji polskiego spaniela myśliwskiego osobników z największą liczbą potomstwa w przypadku każdej z płci. Wybrano po 10 psów i 10 suk, a dane przedstawiono w Tabeli 27. Lista wszystkich samców i samic mających potomstwo wraz z ich liczbą zaprezentowano w załączniku IV i V (aneks).

Tabela 27. Osobniki rasy polski spaniel myśliwski z podziałem pod względem płci i z największą liczbą potomstwa.

L.p.	Nr samca z największą liczbą potomstwa	Liczba potomstwa	L.p.	Nr samicy z największą liczbą potomstwa	Liczba potomstwa
1	31	63	1	25	23
2	107	46	2	116	17
3	12	37	3	14	17
4	67	36	4	109	16
5	76	32	5	61	14
6	79	28	6	28	14
7	54	25	7	36	13
8	98	22	8	13	13
9	46	20	9	104	12
10	185	15	10	57	11

Na podstawie tabeli 27 oraz analizy danych rodowodowych można stwierdzić, że najczęściej wykorzystywanym w rozrodzie samcem był samiec nr 31, który był kojarzony z czterema samicami – dane z Tabeli 27: nr 25 (4 mioty - 18 szczeniąt), nr 116 (2 mioty- 14 szczeniąt), nr 61 (1 miot- 3 szczenięta), nr 28 (1 miot- 7 szczeniąt) oraz z sześcioma sukami spoza osobników przedstawionych w Tabeli 27. Drugim samcem o wysokiej liczbie potomstwa był samiec nr 107. Kojarzony był on z dziesięcioma sukami, w tym z czterema należącymi do pierwszej dziesiątki najczęściej wykorzystywanych suk (Tabela 27): samica nr 25 (1 miot i 5 szczeniąt); nr 61 (1 miot- 4 szczenięta), nr 36 (2 mioty- 5 szczeniąt), nr 104 (2 mioty- 12 szczeniąt). Kolejny samiec – nr 12 – kojarzony był zarówno z samicą nr 13, jak i 14 po trzy razy, dając łącznie po 9 szczeniąt od każdej suki. Natomiast w przypadku suki o największej liczbie potomstwa nr 25 (Tabela 27) całe potomstwo pochodziło wyłącznie z kojarzeń z dwoma reproduktorami nr 31 (4 mioty -18 szczeniąt) oraz z samcem nr 107 (1 miot - 5 szczeniąt). Samica nr 116 kojarzona była z samcem nr 31 (2 mioty - 14 szczeniąt) i samcem nr 98 (1 miot -3 szczenięta). Trzecia z najczęściej wykorzystywanych suk (nr 14) także kojarzona była wyłącznie z wyżej wymienionymi najczęściej wykorzystywanymi samcami, odpowiednio z samcem nr 12 (3 mioty - 9 szczeniąt) i samcem nr 76 (2 mioty - 8 szczeniąt). Dla pozostałych samców i samic uwzględnionych w Tabeli 27 odnotowano wyłącznie jedno kojarzenie z osobnikiem przeciwnej płci uwzględnionego także w tabeli. Należy zaznaczyć, że podana w Tabeli 27 liczba szczeniąt opiera się wyłącznie na danych rodowodowych i może nie odzwierciedlać faktycznej liczby - nie dla każdego szczenięcia czy dorosłego psa jest wydawany rodowód, co zostało już wspomniane wcześniej (str. 97). Trzech najczęściej wykorzystywanych do kojarzeń reproduktorów (samce nr: 31, 107 i 12) miało łącznie 146 sztuk potomstwa.

8.3 Analiza zmienności genetycznej badanej populacji polskiego spaniela myśliwskiego z wykorzystaniem markerów mikrosatelitarnych

8.3.1 Liczba i frekwencja alleli sekwencji mikrosatelitarnych

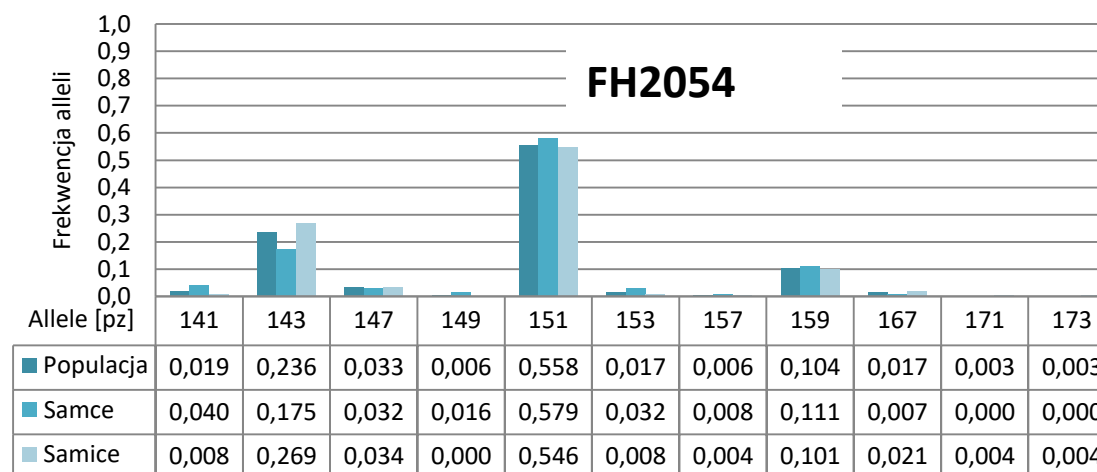
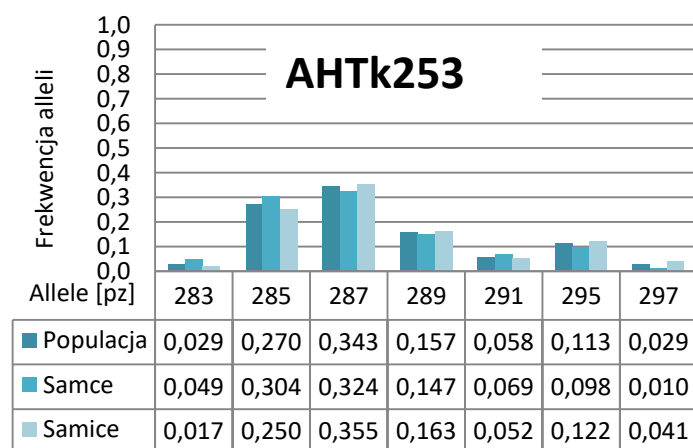
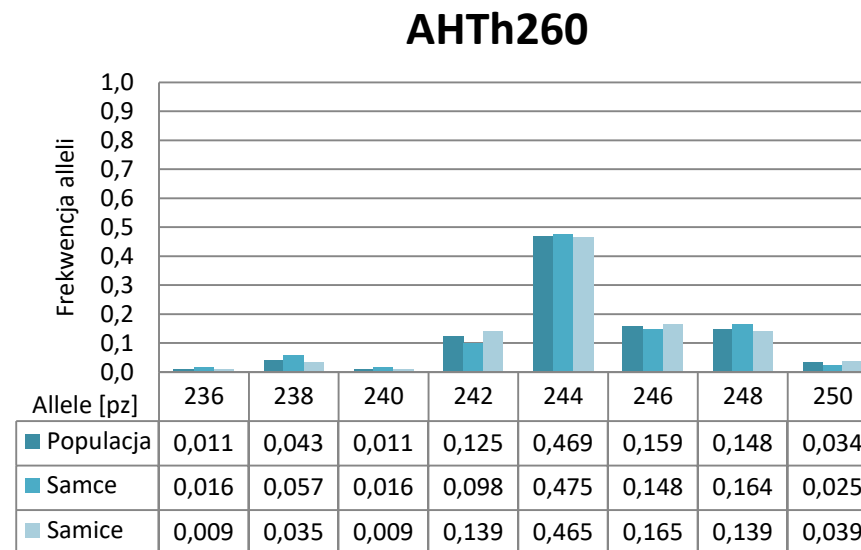
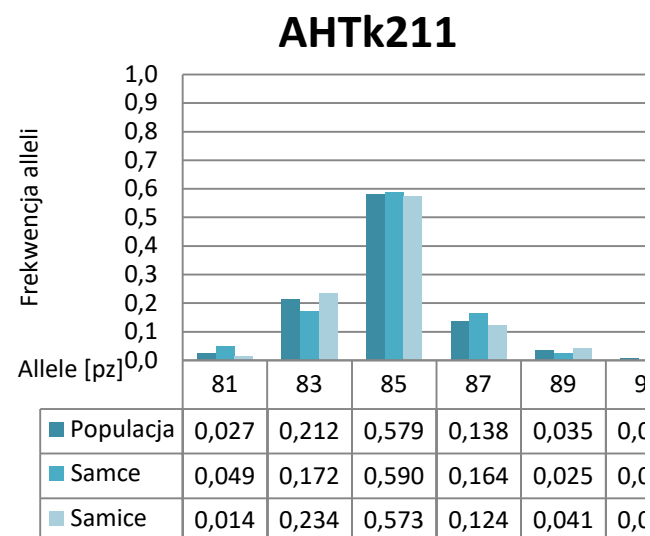
Przeprowadzenie analiz molekularnych z wykorzystaniem sekwencji mikrosatelitarnych pozwoliło na dokonanie oceny zmienności genetycznej w badanej populacji polskiego spaniela myśliwskiego.

Do analizy wykorzystano 22 *loci* mikrosatelitarne zlokalizowane w autosomach,

dla których długości alleli mieściły się w przedziale od 81 pz (AHTk211) do 250 pz (AHTh260) (Tabela 28). Liczba alleli przypadających na pojedynczy *locus* w badanej populacji wahała się od dwóch (sekwencje wykorzystane tylko w analizie u samców: C109, C225) do jedenastu (FH2054, INU055, REN169D01). Średnia liczba alleli wyniosła $7,18 \pm 2,54$, przy czym u samic wykazano nieco wyższy poziom zróżnicowania ($7,59 \pm 1,54$) niż u samców ($6,64 \pm 2,08$) (Tabela 28). Frekwencja poszczególnych alleli *loci* mikrosatelitarnych została zaprezentowana na Rycinach 14 - 18. Według Barkera (1994) w badaniach dystansu genetycznego, aby zredukować wielkość błędu standardowego, średnia liczba alleli w *locus* powinna wynosić około 4. Powyższe wyniki wskazują, że wybrane sekwencje mikrosatelitarne są odpowiednie do analizy zmienności genetycznej PSM.

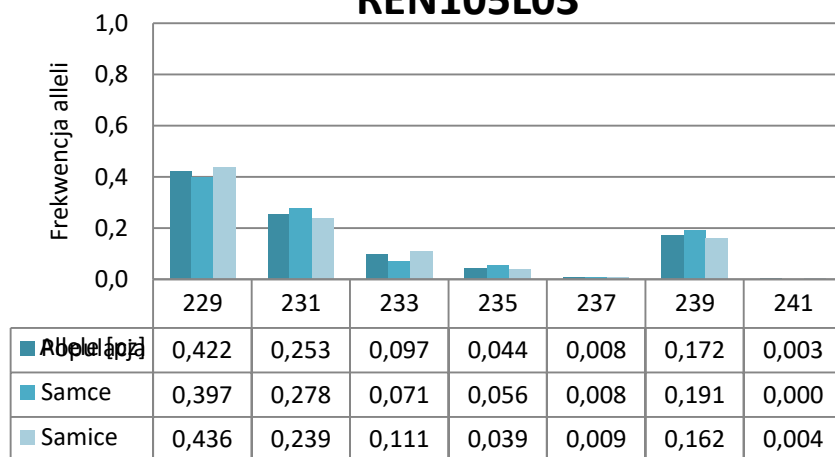
Tabela 28. Zakres długości sekwencji mikrosatelitarnych, liczba alleli i liczba osobników przebadanych w kierunku pod względem 22 sekwencji mikrosatelitarnych w badanej populacji polskiego spaniela myśliwskiego

<i>Locus</i>	Długość alleli (pz)	Liczba alleli			Liczba przebadanych osobników		
		Samce	Samice	Populacja	Samce	Samice	Populacja
AHTk211	81-91	5	6	6	61	109	170
AHTh260	236-250	8	8	8	61	115	176
AHTk253	283-297	7	7	7	51	86	137
FH2054	141-173	9	10	11	63	119	182
INU055	192-220	8	9	11	64	119	183
REN105L03	229-241	6	7	7	63	117	180
REN169D01	187-215	10	9	11	61	115	176
REN169O18	158-168	4	4	4	63	120	183
REN54P11	220-238	8	10	10	60	118	178
ATH121	90-104	8	8	8	56	101	157
CXX279	117-129	7	7	7	57	115	172
FH2848	226-238	6	6	6	70	115	185
INRA21	83-99	8	9	9	69	118	187
INU005	104-128	8	7	8	68	119	187
INU030	143-163	7	7	8	70	114	184
REN162C04	192-204	7	7	7	70	90	160
REN64E19	134-148	8	8	8	69	118	187
C109	152-154	2	-	2	60	-	60
C172	138-154	5	-	5	61	-	61
C204	194-208	5	-	5	59	-	59
C225	163-171	2	-	2	62	-	62
C250	128-146	8	-	8	53	-	53
Średnia	-	6,636	7,588	7,182	-	-	-
±SD	-	2,083	1,543	2,538	-	-	-

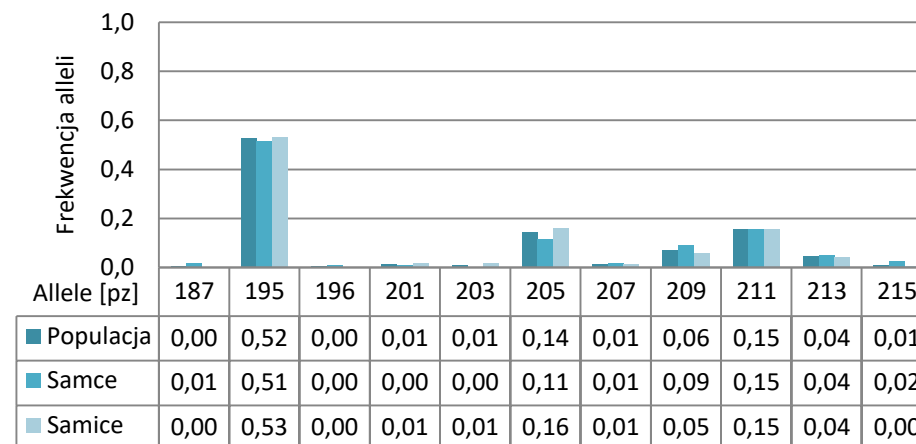


Rycina 14. Porównanie frekwencji alleli wybranych sekwencji mikrosatelitarnych w badanej populacji PSM.

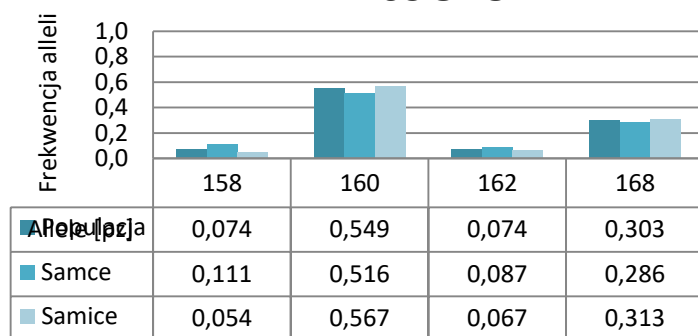
REN105L03



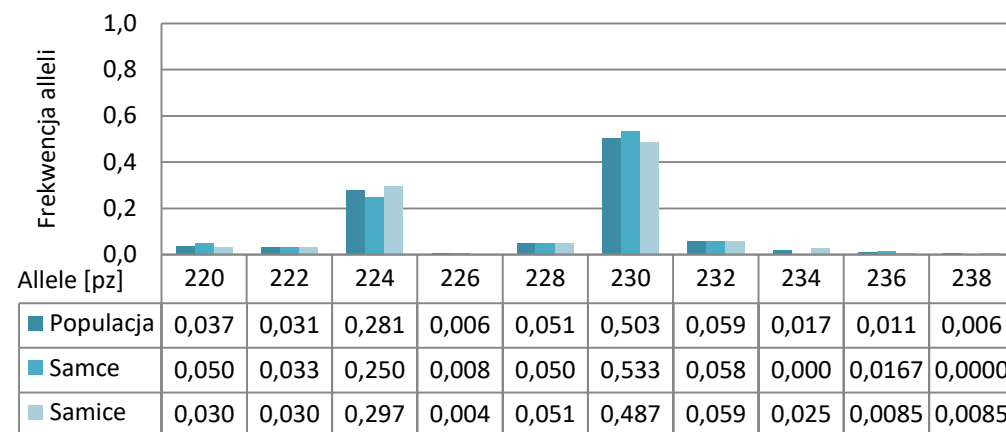
REN169D



REN169O18

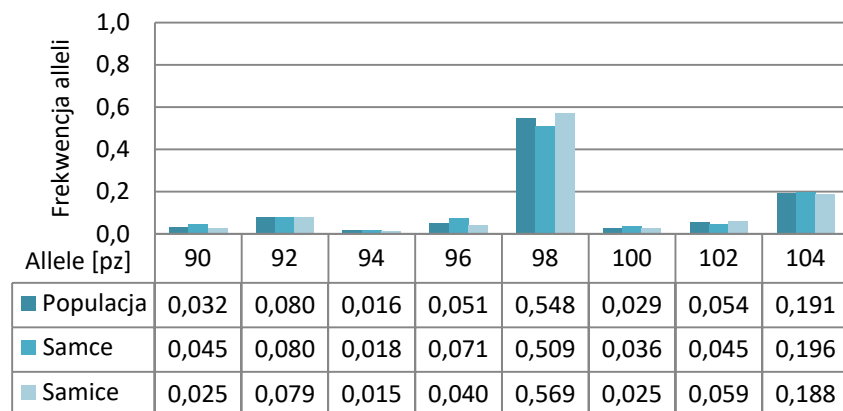


REN54P11

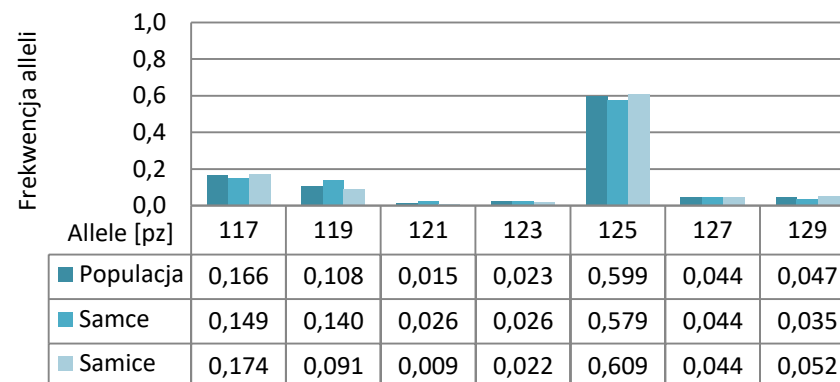


Rycina 15. Porównanie frekwencji alleli wybranych sekwencji mikrosatelitarnych w badanej populacji PSM.

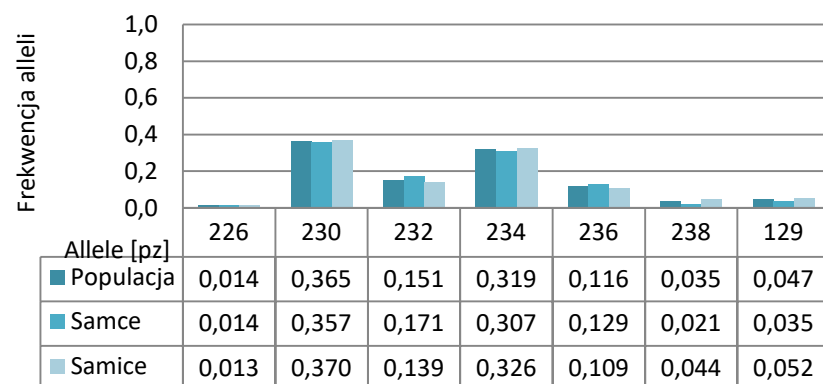
Ath121



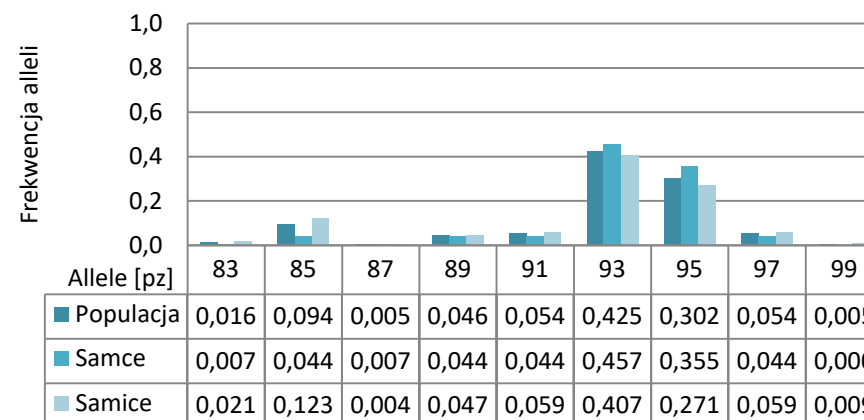
CXX279



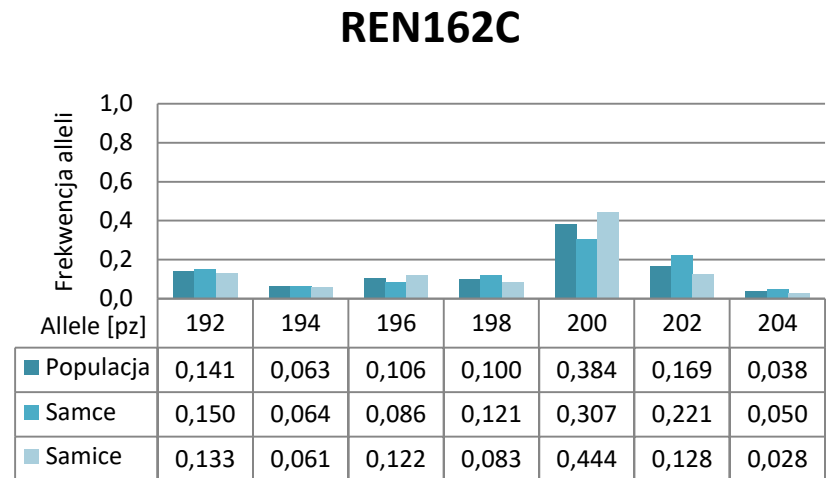
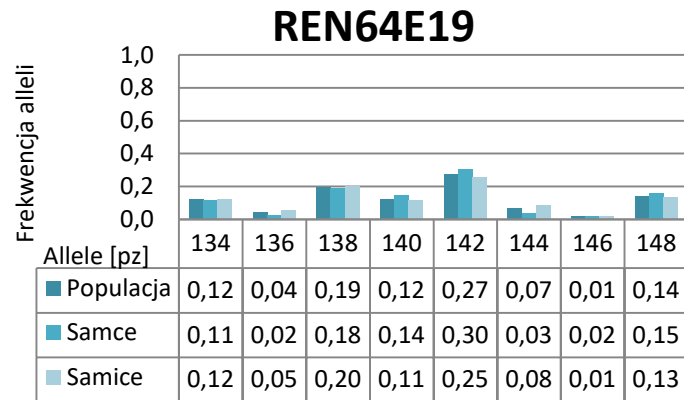
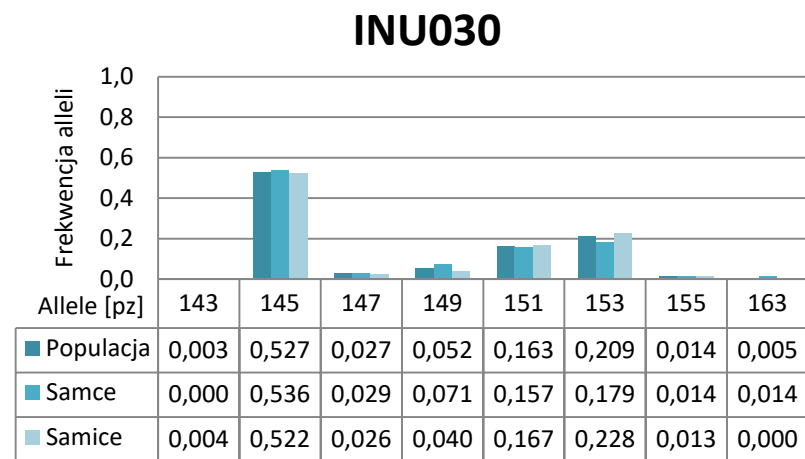
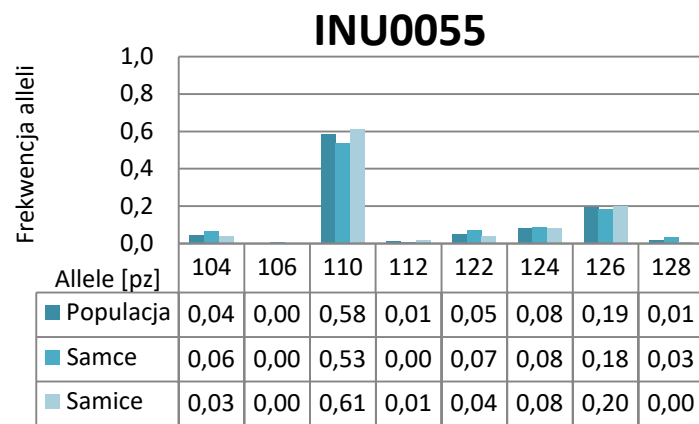
FH2848



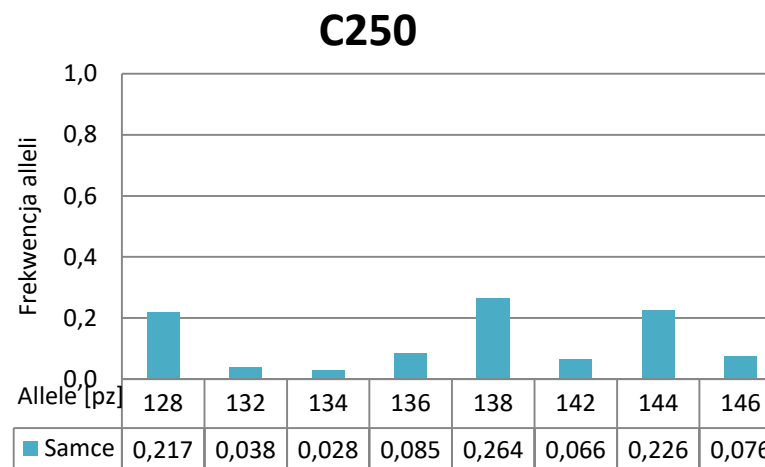
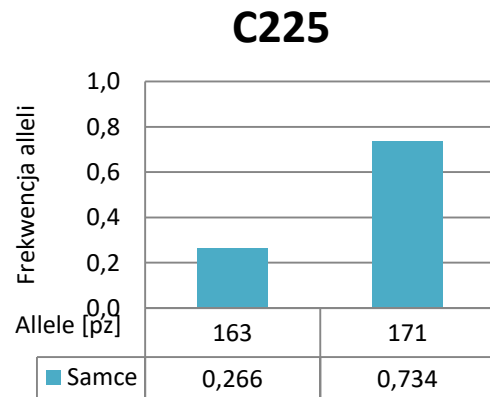
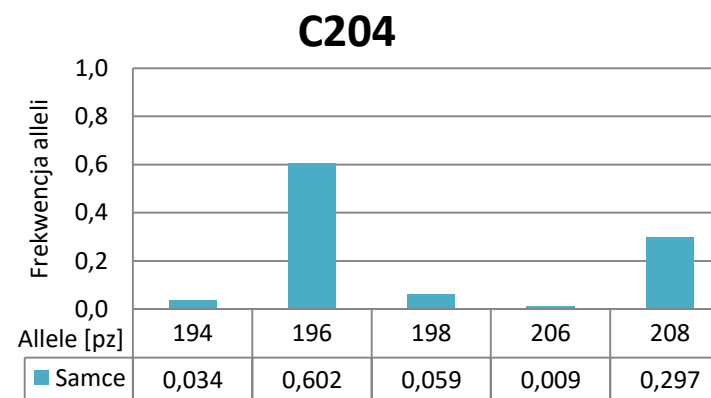
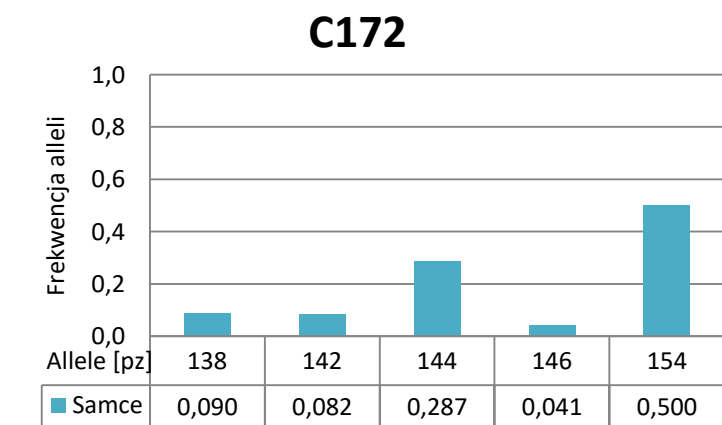
INRA121



Rycina 16. Porównanie frekwencji alleli wybranych sekwencji mikrosatelitarnych w badanej populacji PSM.



Rycina 17. Frekwe Porównanie frekwencji alleli wybranych sekwencji mikrosatelitarnych w badanej populacji PSM.



Rycina 18. Porównanie frekwencji alleli wybranych sekwencji mikrosatelitarnych w badanej populacji PSM.

9.3.3 Liczba i frekwencja genotypów pod względem sekwencji mikrosatelitarnych

Oszacowano współczynniki heterozygotyczności obserwowanej (H_o) i oczekiwanej (H_e), PIC oraz wyniki testu zgodności rozkładu genotypów z oczekiwanym w badanej populacji polskiego spaniela myśliwskiego (Tabela 29). Liczba zidentyfikowanych genotypów w badanej populacji wahała się od dwóch (C109 – sekwencja mikrosatelitarna zastosowana w analizie tylko u samców) do dwudziestu siedmiu (REN64E19). Średnia liczba genotypów wyniosła $16,96 \pm 7,39$ dla całej populacji, przy czym u samic ($17,12 \pm 3,86$) odnotowano nieco większe zróżnicowanie niż u samców ($13,36 \pm 5,24$). Średnia wartość heterozygotyczności obserwowanej (H_o) dla całej populacji wyniosła $0,646 \pm 0,186$, natomiast heterozygotyczność oczekiwana (H_e) osiągnęła podobną wartość tj. $0,641 \pm 0,167$, co wskazuje na odpowiedni poziom zmienności genetycznej badanej populacji. W przypadku 3 sekwencji (C109, C204, C225 zastosowanych tylko u samców) H_e osiągnęła wartość poniżej 0,6. Dlatego też w przyszłości nie rekomenduje się ich do wykorzystania w badaniach zmienności genetycznej populacji PSM. Natomiast pozostałe sekwencje mające wartość H_e większą od 0,6, będą mogły być wykorzystywane w tego rodzaju analizach (Ott, 1992).

Zastosowane markery mikrosatelitarne wykazywały wysokie wartości wskaźników PIC ($PIC > 0,5$ dla większości *loci*), przy średniej $0,598 \pm 0,166$, co sugeruje, że większość analizowanych *loci* mikrosatelitarnych było wystarczająco polimorficzne i może być z powodzeniem stosowane w badaniach zmienności genetycznej (Ott, 1992).

Wyniki testu równowagi Hardy’ego-Weinberga (HW) wskazują, że większość analizowanych *loci* pozostaje w równowadze genetycznej zarówno w grupie samców, jak i samic ($p > 0,05$). Istotne odchylenia od równowagi stwierdzono jedynie dla trzech markerów: FH2848 ($p < 0,001$ u samic i w całej populacji), REN64E19 ($p < 0,01$ w całej populacji) oraz C172 ($p < 0,001$ u samców).

Uzyskane wyniki wskazują, że badana populacja posiada stabilną strukturę genetyczną oraz że zastosowany zestaw 19 z 22 markerów mikrosatelitarnych (z wyjątkiem sekwencji: C109, C204, C225 pod względem, których $H_e < 0,6$) jest odpowiednia do analiz różnorodności genetycznej i identyfikacji osobników.

Tabela 29. Współczynnik heterozygotyczności obserwowanej i oczekiwanej (H_E), PIC oraz wynik testu zgodności rozkładu genotypów z oczekiwanym w badanej PSM.

Locus	Liczba genotypów			H _o			H _E			PIC			HW ^{a)}		
	Samce	Samice	Populacja	Samce	Samice	Populacja	Samce	Samice	Populacja	Samce	Samice	Populacja	Samce	Samice	Populacja
AHTk211	11	12	12	0,557	0,560	0,559	0,597	0,602	0,600	0,549	0,550	0,552	NS	NS	NS
AHTh260	19	18	21	0,721	0,678	0,693	0,717	0,718	0,716	0,680	0,682	0,682	NS	NS	NS
AHTk253	15	18	19	0,765	0,779	0,774	0,772	0,770	0,770	0,729	0,731	0,732	NS	NS	NS
FH2054	14	15	19	0,635	0,655	0,648	0,622	0,620	0,622	0,585	0,565	0,576	NS	NS	NS
INU055	16	18	22	0,734	0,689	0,705	0,731	0,727	0,728	0,684	0,681	0,684	NS	NS	NS
REN105L03	13	14	16	0,762	0,744	0,750	0,727	0,715	0,719	0,675	0,670	0,673	NS	NS	NS
REN169D01	18	19	24	0,672	0,687	0,682	0,690	0,665	0,673	0,656	0,629	0,640	NS	NS	NS
REN169O18	9	9	10	0,683	0,658	0,667	0,637	0,576	0,597	0,575	0,505	0,531	NS	NS	NS
REN54P11	14	20	22	0,633	0,703	0,680	0,649	0,669	0,661	0,601	0,618	0,614	NS	NS	NS
ATH121	18	18	25	0,589	0,624	0,611	0,691	0,631	0,652	0,655	0,595	0,618	NS	NS	NS
CXX279	14	16	20	0,526	0,539	0,535	0,624	0,588	0,599	0,586	0,552	0,565	NS	NS	NS
FH2848	13	15	15	0,586	0,626	0,611	0,737	0,727	0,729	0,686	0,678	0,682	NS	***	***
INRA21	15	22	24	0,652	0,712	0,690	0,663	0,739	0,713	0,600	0,700	0,669	NS	NS	NS
INU005	17	17	22	0,647	0,588	0,610	0,664	0,576	0,608	0,627	0,534	0,571	NS	NS	NS
INU030	14	15	18	0,557	0,605	0,587	0,655	0,648	0,650	0,612	0,597	0,604	NS	NS	NS
REN162C04	19	19	22	0,743	0,756	0,750	0,811	0,746	0,780	0,780	0,715	0,751	NS	NS	NS
REN64E19	20	26	27	0,667	0,780	0,738	0,815	0,836	0,828	0,784	0,812	0,804	NS	NS	**
C109	2	-	2	0,000	-	0,000	0,033	-	0,033	0,032	-	0,032	ND	-	ND
C172	4	-	4	1,000	-	1,000	0,657	-	0,657	0,599	-	0,599	***	-	***
C204	8	-	8	0,525	-	0,525	0,550	-	0,550	0,477	-	0,477	NS	-	NS
C225	3	-	3	0,500	-	0,500	0,394	-	0,394	0,314	-	0,314	ND	-	ND
C250	18	-	18	0,906	-	0,906	0,820	-	0,820	0,787	-	0,787	ND	-	ND
Średnia	13,364	17,118	16,955	0,639	0,670	0,646	0,648	0,680	0,641	0,603	0,636	0,598	-	-	-
±SD	5,242	3,855	7,390	0,187	0,073	0,186	0,167	0,075	0,167	0,165	0,082	0,166	-	-	-

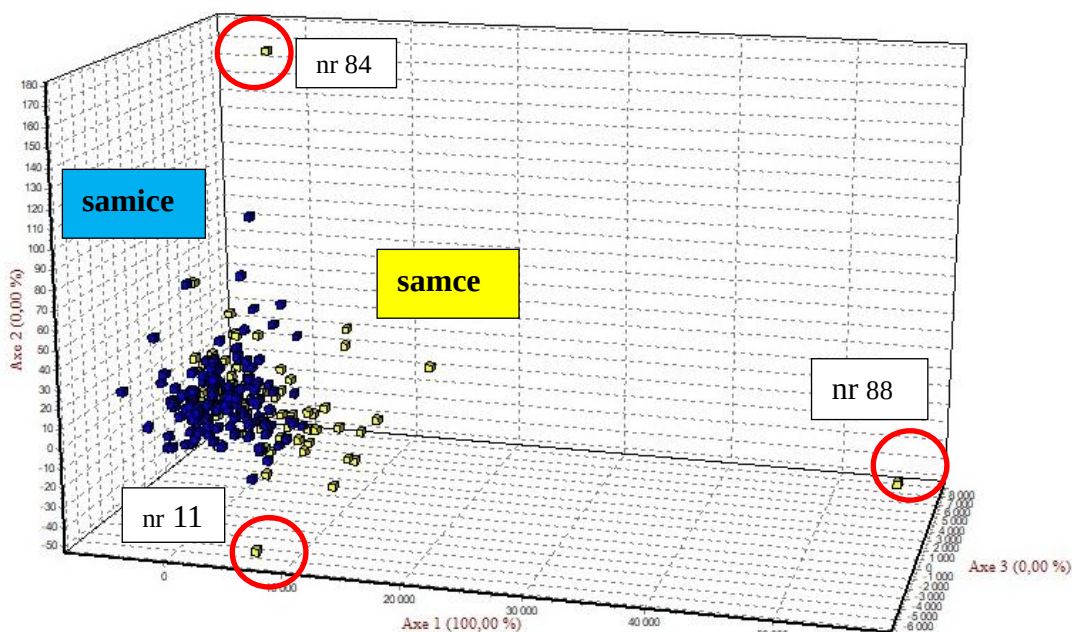
^{a)} Poziom istotności braku równowagi Hardy'ego-Weinberga: *** wysoko istotny ($p \leq 0,001$), ** wysoko istotny ($p \leq 0,01$), * istotny ($p \leq 0,05$), NS - nie istotny, ND- testu nie przeprowadzono ze względu na zbyt małą liczbę grup

Na podstawie frekwencji alleli pod względem 22 sekwencji mikrosatelitarnych oszacowano za pomocą programu Cervus 3.0.3 (Marshall, 1998-2007; Kalinowski i wsp., 2007):

- CPnE1 - kombinowane prawdopodobieństwo nie-wykluczenia dla jednego kandydującego rodzica - 0,00087949,
- CPnE2 - kombinowane prawdopodobieństwo nie-wykluczenia dla jednego kandydującego rodzica przy znanym genotypie rodzica płci przeciwnej 0,00000267
- CPnE3 - kombinowane prawdopodobieństwo nie-wykluczenia dla pary kandydujących rodziców 0,0000000002896
- CPnEI - kombinowane prawdopodobieństwo nie-wykluczenia tożsamości dwóch niespokrewnionych osobników 0,00000000000000000204
- CPnESI - kombinowane prawdopodobieństwo nie-wykluczenia tożsamości dwojga rodzeństwa - 0,00000006.

Wartości parametrów kombinowanego prawdopodobieństwa nie-wykluczenia kształtują się na bardzo niskim poziomie, co świadczy o tym, iż wybrany panel 22 sekwencji mikrosatelitarnych mógł być z powodzeniem wykorzystany do sprawdzenia prawidłowości pochodzenia danego osobnika po danej parze rodziców.

Następnie porównano rozkład genotypów między samcami i samicami na podstawie 17 sekwencji mikrosatelitarnych (z paneli P1 i P2, które były analizowane dla obu płci) za pomocą programu Genetix4.05 (Belkhir i wsp., 1996-2004). Dzięki przeprowadzonej analizie korespondencji FCA, która pozwala na odpowiednie umiejscowienie na wykresie przestrzennym 3D osobników względem siebie w zależności od podobieństwa ich genotypów (Rycina 19). Widoczny na wykresie rozkład punktów (każdy punkt reprezentuje 1 osobnika) wskazuje na podobieństwo genetyczne osobników obu płci w badanej populacji. Pojedyncze 3 punkty (zaznaczone na wykresie czerwonym kołem) oddalone od skupiska osobników z populacji PSM, były to 3 samce o nr:11; 84 i 88, które nie zostawiły po sobie żadnego potomstwa. Ich profil genetyczny różni się od profilu genetycznego pozostałych członków populacji PSM, dlatego też na wykresie osobniki w małym stopniu podobne genetycznie są tak daleko oddalone od pozostałych osobników z badanej populacji PSM (Rycina 19).

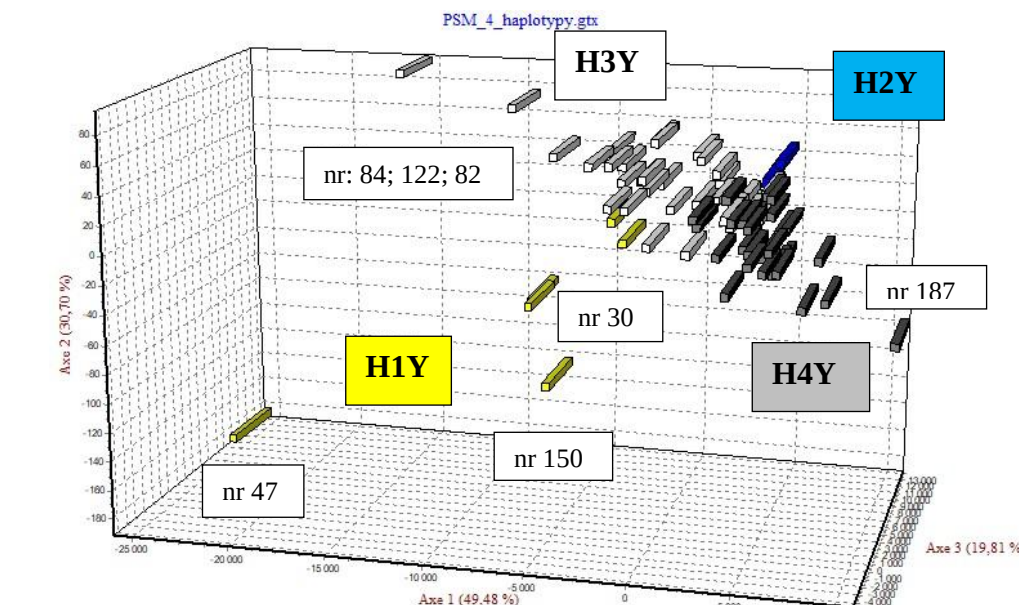


Rycina 19. Porównanie rozkładu genotypów między samcami i samicami badanej populacji polskiego spaniela myśliwskiego na podstawie 17 sekwencji mikrosatelitarnych

W badanej populacji u samców wyodrębniono 4 haplotypy na podstawie 3 sekwencji mikrosatelitarnych: MS34A, MS34B, MS41B zlokalizowanych w chromosomie Y i obliczono ich frekwencję (Tabela 30) oraz porównano rozkład genotypów między samcami w podziale na wyodrębnione 4 haplotypy z uwzględnieniem 22 sekwencji mikrosatelitarnych zlokalizowanych w autosomach (Panel 1 i 2 oraz 5 sekwencji mikrosatelitarnych z Panelu 3) (Rycina 20).

Tabela 30. Frekwencja haplotypów u samców w badanej populacji polski spaniel myśliwski pod względem 3 sekwencji mikrosatelitarnych zlokalizowanych w chromosomie Y.

Haplotyp	MS34A [pz]	MS34B [pz]	MS41B [pz]	Liczba haplotypów	Frekwencja
H1Y	170	164	212	5	0,074
H2Y	170	172	212	2	0,029
H3Y	172	164	216	33	0,485
H4Y	172	172	216	28	0,412



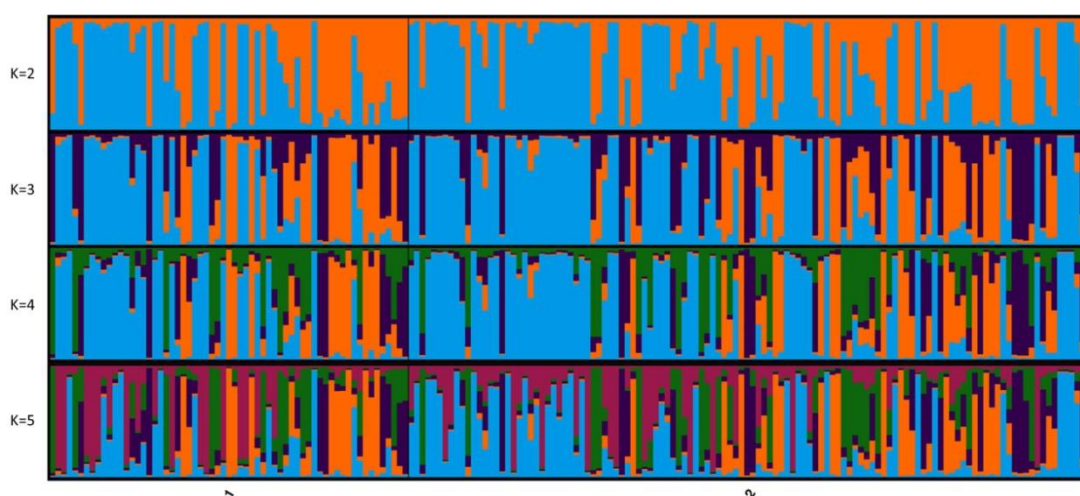
Rycina 20. Porównanie rozkładu genotypów między samcami badanej populacji polski spaniel myśliwski w podziale na 4 haplotypy z uwzględnieniem 22 sekwencji mikrosatelitarnych.

W Tabeli 30 zaprezentowano cztery haplotypy, różniące się długością alleli dla poszczególnych markerów. U prawie połowy badanych samców PSM (48,5%) stwierdzono haplotyp H3Y. Haplotyp H4Y występował również z dużą frekwencją i stwierdzono go u 41,2% osobników. Pozostałe haplotypy (H1Y, H2Y,) miały dużo niższą frekwencję, odpowiednio 7,4% i 2,9%.

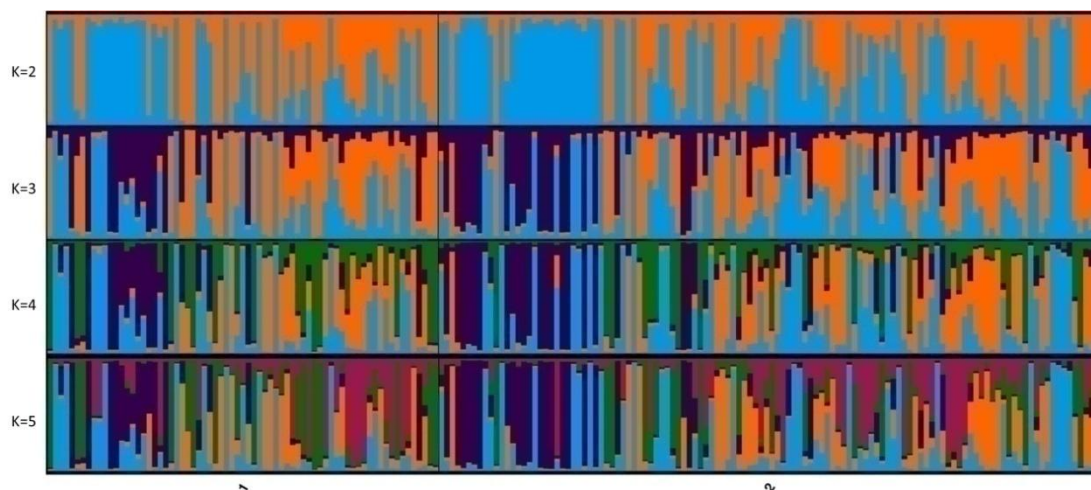
Zaprezentowany wykres przestrzenny (Rycina 20) pokazuje graficzne rozmieszczenie osobników z podziałem na poszczególne haplotypy z uwzględnieniem podobieństwa pod względem 22 sekwencji mikrosatelitarnych. Użyte na wykresie kolory odpowiadają odpowiednim rodzajom haplotypów. Obserwowany rozkład punktów sugeruje, że osobniki o haplotypach H2Y i H4Y (kolor niebieski i szary) są skupione blisko siebie, co odzwierciedla ich genetyczne podobieństwo. Natomiast osobniki o haplotypach H1Y i H3Y) są bardziej rozproszone, co wskazuje na bardziej odmienne profile genetyczne. Samce o nr: 30, 47, 82, 84, 122, 150, 182 przedstawione na Rycinie 20 jako skrajne, były osobnikami, które mimo długiego użytkowania do kojarzeń, pozostawiły po sobie niewielką liczbę potomstwa.

Analiza haplotypów samców wskazuje na obecność dwóch dominujących haplotypów oraz dwóch wariantów, które występują rzadziej. Osobniki niedawno wprowadzone przez hodowców do kojarzeń, w zamyśle do tworzenia nowych linii męskich, nie zostały wyodrębnione w analizie korespondencji FCA, jako te znacząco różniące się pod względem 22 sekwencji mikrosatelitarnych.

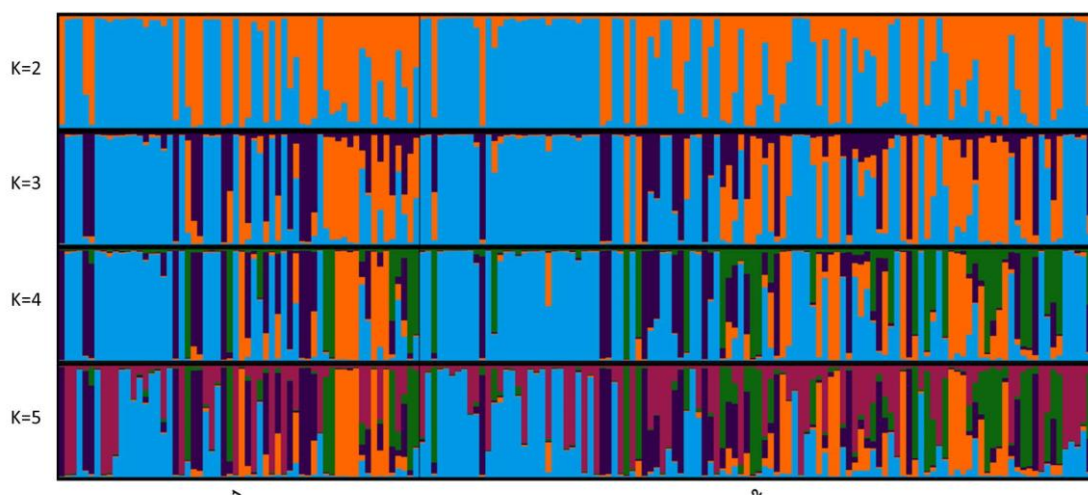
Wyniki analizy uzyskane za pomocą programu STRUCTURE dla panelu 1 (Rycia 21) obejmującego 9 markerów, przy wartości $K = 3$ ujawniła istnienie trzech klastrów (oznaczonych kolorami: niebieskim, pomarańczowym i fioletowym). Większość osobników wykazywała mieszane proporcje tych komponentów. Część osobników została przyporządkowana do jednego klastra (kolor niebieski), zaobserwowano podział na odrębne subpopulacje, choć nie są to całkowicie odrębne populacje. Zbadanie przyczyn zaistniałego zjawiska wymaga dokładniejszych analiz. W przypadku panelu 2 (Rycia 22) obejmującego inny zestaw 8 markerów, przy $K = 4$ odnotowano bardziej zróżnicowany obraz struktury genetycznej badanej populacji polskiego spaniela myśliwskiego. Kolory reprezentujące poszczególne klastry u większości osobników wskazywały na zwiększenie procentowego udziału każdego z klastrów w genotypie poszczególnych osobników. Połączenie markerów z obu paneli w zestaw mieszany (P1+P2) (Rycia 23) dla najwyższej wartości przy ΔK , wskazującej na podział na 4 klastry, pozwoliło uzyskać bardziej czytelny obraz struktury populacji, choć ogólny wzorec przypominał ten uzyskany dla panelu 1.



Rycina 21. Zestawienie wykresów przedstawiających szacowaną strukturę genetyczną populacji PSM na podstawie 8 markerów mikrosatelitarnych panelu P1. Wartość K oznacza liczbę zakładanych klastrów, „1” - samce, „2” - samice. Została zachowana taka sama kolejność osobników na każdym wykresie ($K=2-5$).



Rycina 22. Zestawienie wykresów przedstawiających szacowaną strukturę genetyczną populacji PSM na podstawie 9 markerów mikrosatelitarnych panelu P2. Wartość K oznacza liczbę zakładanych klastrow, „1” - samce, „2” samice. Została zachowana taka sama kolejność osobników



Rycina 23. Zestawienie wykresów przedstawiających szacowaną strukturę genetyczną na podstawie 17 markerów mikrosatelitarnych z obu paneli P1 i P2. Wartość K oznacza liczbę zakładanych klastrow, „1” - samce, „2” samice. Została zachowana taka sama kolejność osobników

Markery mikrosatelitarne, nazywane również STR (ang. *Short Tandem Repeats*), to krótkie sekwencje DNA o długości 2-6 par zasad, które powtarzają się tandemowo i znajdują się głównie w niekodujących regionach genomu (Jarne i Lagoda 1996). Ze względu na dziedziczenie zgodne z prawami Mendla, każdy osobnik posiada po jednym allelu od każdego z rodziców. Charakteryzują się one dużą zmiennością, co oznacza, że w jednym *locus* może występować wiele wariantów alleli, co z kolei zmniejsza prawdopodobieństwo, że dwa niespokrewnione osobniki będą miały identyczne

genotypy. Markery mikrosatelitarne są szeroko stosowane w badaniach genetycznej różnorodności populacji, w tym psów oraz do określania pokrewieństwa między osobnikami. (Goldstein i wsp., 1999; Vladimir i wsp., 2020; Radko i Podbielska, 2021)

Średnia liczba alleli przypadająca w *locus* w badanej populacji polskiego spaniela myśliwskiego wyniosła $7,18 \pm 2,54$ co jest wyższe niż wartości (5,5) opisywane dla rodzimej rasy psa domowego - owczarka podhalańskiego (Radko, 2017r.) czy też rasy kangal (6,9) (Vladimir i wsp., 2020). Zróżnicowanie liczby alleli między *loci* mikrosatelitarnymi (od 2 do 11) mieści się w zakresie stwierdzonym u różnych ras psa domowego, ale mniejszym niż w populacjach dzikich psowatych, gdzie liczba alleli często przekracza 12 w *locus* (Jarausch i wsp., 2023). Wysoką zmienność stwierdzono dla 15 z 22 markerów (≥ 7 alleli), w tym dla *loci*: AHT121, AHT260, FH2054, INU005 i INU055, co pokrywa się z wynikami badań Radko i wsp. (2017), którzy w swoich badaniach wykorzystywali także sekwencje mikrosatelitarne z panelu Canine ISAG STR Parentage Kit, 2014.

Średnia wartość heterozygotyczności obserwowanej ($H_O = 0,646$) i oczekiwanej ($H_E = 0,641$) w populacji PSM jest porównywalna z wynikami dla rasy owczarek podhalański $H_O = 0,63$; (Radko i wsp., 2017), maltańczyk $H_O = 0,685$ $H_E = 0,677$, Yorkshire terrier $H_O = 0,662$, $H_E = 0,698$ oraz biewer yorkshire terrier $H_O = 0,662$ i $H_E = 0,658$ (Radko i Podbielska, 2021), berneński pies pasterski $H_O = 0,577$, $H_E = 0,581$, golden retriever $H_O = 0,560$, $H_E = 0,584$, chiński grzywacz $H_O = 0,585$, $H_E = 0,614$, pudel $H_O = 0,578$, $H_E = 0,580$ (Radko i wsp., 2025). W badaniach Radko i Podbielska (2021) spośród ośmiu badanych ras psa domowego najniższą wartość heterozygotyczności odnotowano dla wilczarza irlandzkiego ($H_O = 0,491$, $H_E = 0,474$). Dla porównania, w rasie psów do towarzystwa, np. terier tybetański, stwierdzono wyższy poziom H_O i H_E , odpowiednio 0,769 i 0,748 (Perfilyeva i wsp., 2023).

Wysoka wartość wskaźnika polimorfizmu ($PIC = 0,598 \pm 0,166$) potwierdza wysoką przydatność markerów mikrosatelitarnych, co jest zgodne z obserwacjami Botstein i in. (1980), którzy wskazali, iż markery o wartości $PIC > 0,5$ są wysoko informatywne i przydatne do analiz pokrewieństwa oraz identyfikacji osobników. Goleman i wsp. (2019) uzyskali podobny wskaźnik PIC (0,555) dla rasy gończy polski. Badania Vladimir i wsp. (2020) dla rasy kangal wykazały zbliżone lub wyższe wartości PIC w poszczególnych markerach mikrosatelitarnych (0,52–0,87), przy średniej dla wszystkich *loci* wynoszącej 0,717. Równie wysokie wartości PIC odnotowano w badanej populacji teriera tybetańskiego, odpowiednio 0,543–0,865 (Perfilyeva i wsp.,

2023), natomiast Radko i wsp. (2025) u 4 badanych ras (berneński pies pasterski, golden retriever, chiński grzywacz, pudel) wykazali wartości PIC: 0,533; 0,539; 0,573; 0,533, odpowiednio.

W analizie haplotypówu samców PSM stwierdzono wysoką frekwencję dwóch haplotypów (H3Y i H4Y), które łącznie stanowiły ok. 90% wszystkich zidentyfikowanych. Ograniczona liczba haplotypów Y (dwa) została również odnotowana w badaniach Smetanová i wsp (2015) dla wilczaka czechosłowackiego. Różnorodność haplotypów mtDNA i chromosomu Y była również porównywana wśród grup ras uznanych przez FCI (<http://www.fci.be>) (Sundqvist, 2008). Analiza ta wykazała, że grupy były bardziej zróżnicowane pod względem częstości haplotypów chromosomu Y niż w odniesieniu do mtDNA. Można to wytłumaczyć strategiami selekcji psa domowego opartymi na wyborze osobników jako założycieli rasy: samce założyciele są bardziej prawdopodobnie pochodzenia podobnej rasy niż samice założyciele (Sundqvist, 2008).

9.4 Analiza zmienności sekwencji pętli D-loop mitochondrialnego DNA

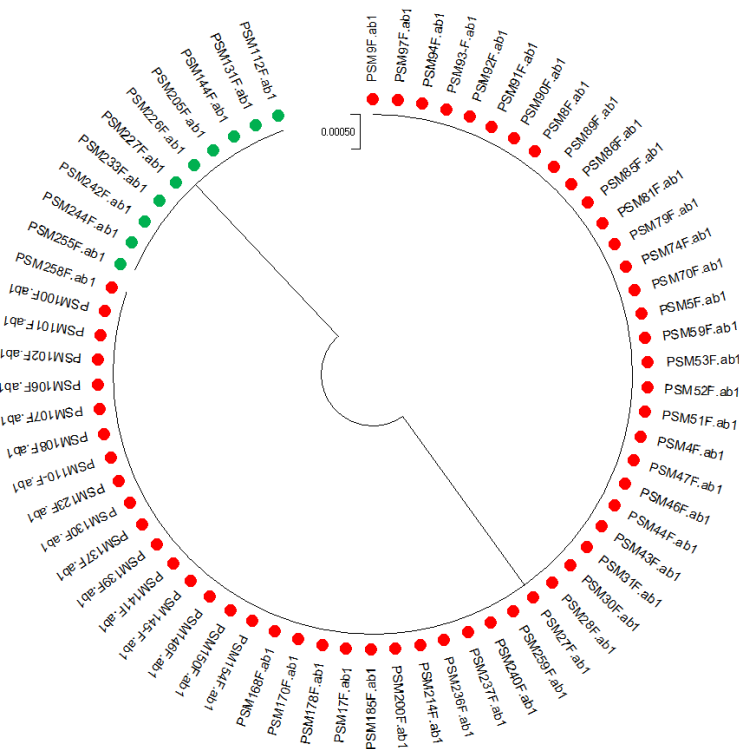
Wyniki analizy sekwencji pętli D mtDNA o długości 165 pzwskazują na występowanie podobieństwa genetycznego między badanymi osobnikami, a istniejące różnice umożliwiły wyodrębnienie linii (haplotypów) mtDNA.

Na Rycinie 24 przedstawiono wyniki wyrównania sekwencji (ang. *Multiple sequence alignment*) analizowanego regionu pętli D mitochondrialnego DNA u badanych osobników rasy polski spaniel myśliwski. Symbol „*” u góry porównania oraz kolorowe oznaczenia nukleotydów (A, T, G, C), które powtarzają się w kolejnych rzędach wskazują na stopień zgodności pomiędzy sekwencjami. Widoczna jest wysoka zgodność analizowanego fragmentu — większość pozycji nukleotydowych jest identyczna we wszystkich próbkach, co sugeruje niewielkie zróżnicowanie genetyczne w badanej populacji pod względem badanej sekwencji mtDNA. Natomiast w miejscu gdzie brakuje symbolu „*” i widoczna jest różnica w kolorach (nukleotydy T i A) - występuje polimorfizm pojedynczego nukleotydu (ang. *single nucleotide polymorphism* – SNP), stanowiący podstawę do wyodrębnienia poszczególnych linii/haplotypów mtDNA.

W celu wizualizacji wyodrębnionych haplotypów mtDNA przeprowadzono analizę filogenetyczną w programie MEGA 11.0.10. metodą neighbor-joining.

Species/Abbrv	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*							
29. PSM27F.ab1	A	T	A	A	T	T	C	A	C	T	G	A	T	C	T	T	T	C	A	A	C	A	G	T	A	A	T	C	G	A	A	T	G
30. PSM259F.ab1	A	T	A	A	T	T	C	A	C	T	G	A	T	C	T	T	T	C	A	A	C	A	G	T	A	A	T	C	G	A	A	T	G
31. PSM258F.ab1	A	T	A	A	T	T	C	A	C	T	G	A	T	C	T	T	T	C	A	A	C	A	G	T	A	A	T	C	G	A	A	T	G
32. PSM255F.ab1	A	T	A	A	T	T	C	A	C	T	G	A	T	C	T	T	T	C	A	A	C	A	G	T	A	A	T	C	G	A	A	T	G
33. PSM244F.ab1	A	T	A	A	T	T	C	A	C	T	G	A	T	C	T	T	T	C	A	A	C	A	G	T	A	A	T	C	G	A	A	T	G
34. PSM242F.ab1	A	T	A	A	T	T	C	A	C	T	G	A	T	C	T	T	T	C	A	A	C	A	G	T	A	A	T	C	G	A	A	T	G
35. PSM240F.ab1	A	T	A	A	T	T	C	A	C	T	G	A	T	C	T	T	T	C	A	A	C	A	G	T	A	A	T	C	G	A	A	T	G
36. PSM237F.ab1	A	T	A	A	T	T	C	A	C	T	G	A	T	C	T	T	T	C	A	A	C	A	G	T	A	A	T	C	G	A	A	T	G
37. PSM236F.ab1	A	T	A	A	T	T	C	A	C	T	G	A	T	C	T	T	T	C	A	A	C	A	G	T	A	A	T	C	G	A	A	T	G
38. PSM233F.ab1	A	T	A	A	T	T	C	A	C	T	G	A	T	C	T	T	T	C	A	A	C	A	G	T	A	A	T	C	G	A	A	T	G
39. PSM227F.ab1	A	T	A	A	T	T	C	A	C	T	G	A	T	C	T	T	T	C	A	A	C	A	G	T	A	A	T	C	G	A	A	T	G
40. PSM226F.ab1	A	T	A	A	T	T	C	A	C	T	G	A	T	C	T	T	T	C	A	A	C	A	G	T	A	A	T	C	G	A	A	T	G
41. PSM214F.ab1	A	T	A	A	T	T	C	A	C	T	G	A	T	C	T	T	T	C	A	A	C	A	G	T	A	A	T	C	G	A	A	T	G
42. PSM205F.ab1	A	T	A	A	T	T	C	A	C	T	G	A	T	C	T	T	T	C	A	A	C	A	G	T	A	A	T	C	G	A	A	T	G
43. PSM200F.ab1	A	T	A	A	T	T	C	A	C	T	G	A	T	C	T	T	T	C	A	A	C	A	G	T	A	A	T	C	G	A	A	T	G
44. PSM185F.ab1	A	T	A	A	T	T	C	A	C	T	G	A	T	C	T	T	T	C	A	A	C	A	G	T	A	A	T	C	G	A	A	T	G
45. PSM17F.ab1	A	T	A	A	T	T	C	A	C	T	G	A	T	C	T	T	T	C	A	A	C	A	G	T	A	A	T	C	G	A	A	T	G
46. PSM178F.ab1	A	T	A	A	T	T	C	A	C	T	G	A	T	C	T	T	T	C	A	A	C	A	G	T	A	A	T	C	G	A	A	T	G
47. PSM170F.ab1	A	T	A	A	T	T	C	A	C	T	G	A	T	C	T	T	T	C	A	A	C	A	G	T	A	A	T	C	G	A	A	T	G
48. PSM168F.ab1	A	T	A	A	T	T	C	A	C	T	G	A	T	C	T	T	T	C	A	A	C	A	G	T	A	A	T	C	G	A	A	T	G
49. PSM154F.ab1	A	T	A	A	T	T	C	A	C	T	G	A	T	C	T	T	T	C	A	A	C	A	G	T	A	A	T	C	G	A	A	T	G
50. PSM150F.ab1	A	T	A	A	T	T	C	A</																									

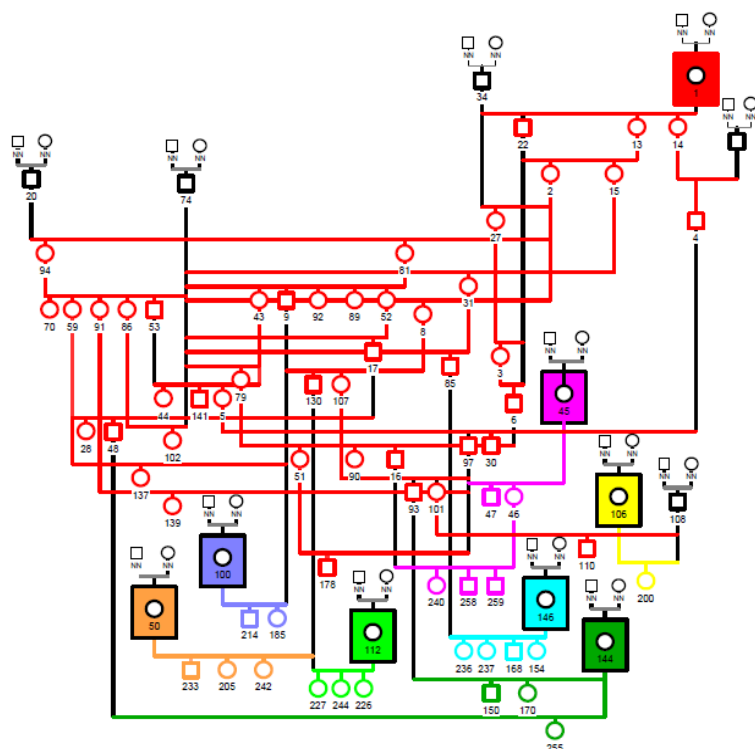
116



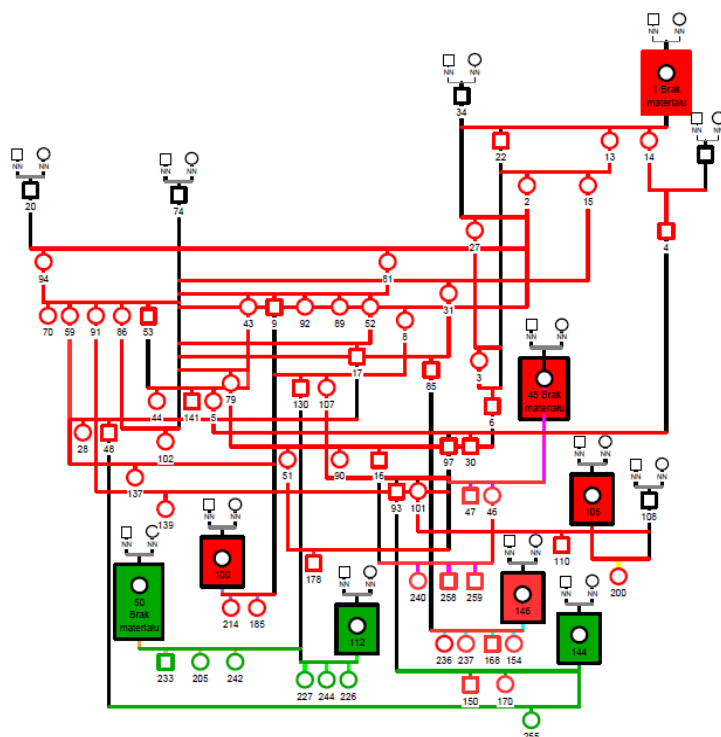
Rycina 25. Drzewo filogenetyczne skonstruowane na podstawie fragmentu sekwencji pętli D mtDNA u polskiego spaniela myśliwskiego metodą neighbor-joining w programie MEGA11.0.10.

Uzyskane wyniki wskazują jednak jednoznacznie na wyodrębnienie jedynie dwóch linii/haplotypów H1 i H2 pod względem pętli D mtDNA (Rycina 25). Pętla D (ang. *D – loop*), regionu kontrolnego (ang. *control region - CR*) jest jedynym niekodującym odcinkiem mtDNA, w którym liczba mutacji szacowana jest na ok 10% całkowitej liczby mutacji mtDNA (Bruford i wsp., 2003). W niniejszych badaniach do analiz zmienności genetycznej mtDNA wybrano pętlę DmtDNA, która z racji licznych mutacji jest tą częścią genomu mitochondrialnego, który najszybciej podlega zmianom ewolucyjnym lub inaczej ujmując, odcinek ten odznacza się największym polimorfizmem (Verscheure i wsp., 2013).

Otrzymany wynik zestawiono z informacją rodowodową i przedstawiono schematycznie w postaci wyodrębnionych linii na genogramie (Rycina 27 i 28). Na Rycinie 27 zaprezentowano osiem odrębnych linii mtDNA wyodrębnionych na podstawie informacji rodowodowych, natomiast na Rycinie 28 wyniki otrzymane na podstawie porównania analizowanego fragmentu pętli D mtDNA.



Rycina 26. Schemat linii mtDNA wyodrębnionych na podstawie informacji rodowodowej polskiego spaniela myśliwskiego(schemat powstał w programie GenoPro).



Rycina 27. Schemat linii mtDNA wyodrębnionych na podstawie wyników analizy zmienności fragmentu sekwencji pętli DmtDNA u polskiego spaniela myśliwskiego (schemat powstał w programie GenoPro).

Zauważono pewne niezgodności zapisów rodowodowych z wynikami badań molekularnych. Rodzeństwo: osobniki nr 150 (samiec) i nr 170 (samica) (zastosowana numeracja jest numeracją zastosowaną w badaniach molekularnych) miały pod względem mtDNA haplotyp H1, mimo, że po matce (osobnik nr 144) powinni dziedziczyć haplotyp H2 (Rycina 27). Występuje, więc niezgodność z oczekiwanym dziedziczeniem w linii matczynej. Z jednej strony mogłoby być to wynikiem spontanicznej mutacji, ale z racji pojawienia się tego samego haplotypu u obojga rodzeństwa, taka sytuacja była jednak mało prawdopodobna. Co więcej sprawdzając podobieństwo pod względem 22 sekwencji mikrosatelitarnych stwierdzono niezgodność pod względem trzech STR: ATH121, ATH260, FH2848, zarówno z ojcem (osobnik nr 93) jak i matką (nr 144). Sprawdzone także dziedziczenie w linii ojcowskiej sekwencji sprzężonych z chromosomem Y i stwierdzono, że ojciec osobnik 93 ma haplotyp H3Y a jego potomek (osobnik nr150) haplotyp H1Y. Z powyższych danych wynika, iż w zapisach rodowodowych psów rasy polski spaniel myśliwski mogą być błędy w zapisie pochodzenia.

Dodatkowo porównano podobieństwo wybranego do analizy w niniejszych badaniach fragment sekwencji pętli D mtDNA do sekwencji pętli D sekwencji referencyjnej (Dog10K_Boxer_Tasha - NC_002008.4) (Rycina 26).

A)

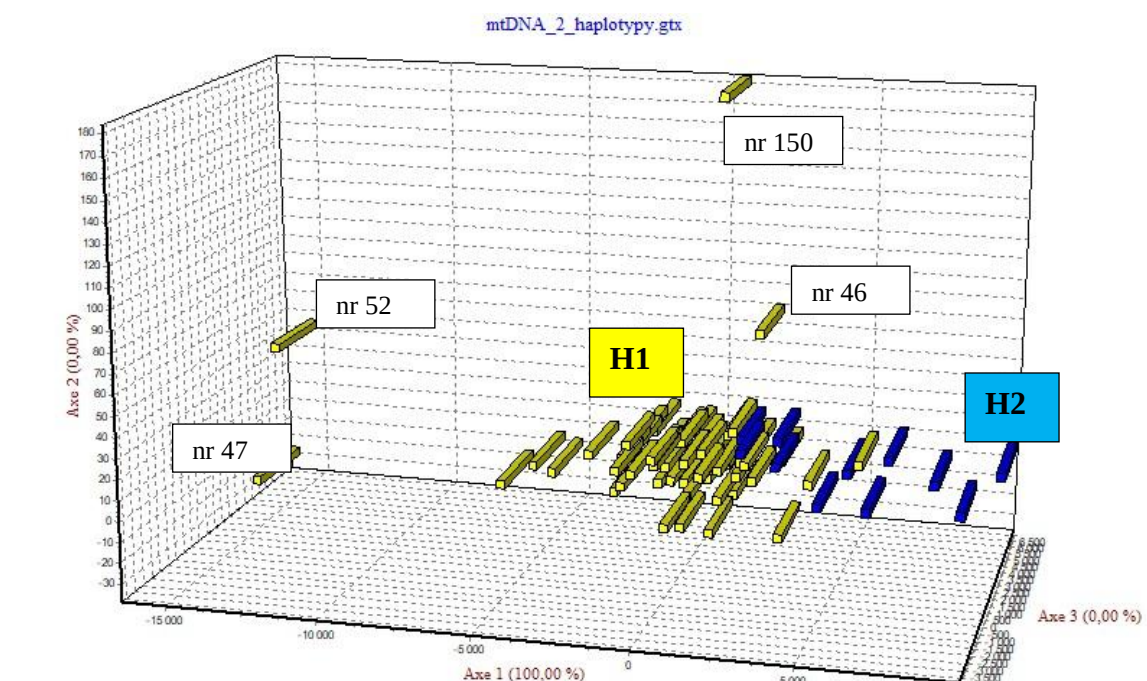
Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
300 bits(162)	2e-85	164/165(99%)	0/165(0%)	Plus/Plus
Query 134	ACTCAATCTCATAATTCAGTATCTTTCAACAGTAATCGAATGCATATCACTTAGTCCAA	193		
Sbjct 1	ACTCAATCTCATAATTCAGTATCTTTCAACAGTAATCGAATGCATATCACTTAGTCCAA	60		
Query 194	TAAGGGCTTAATCACCATGCCTCGAGAAACCATCAACCCTTGCTCGTAATGTCCCTCTTC	253		
Sbjct 61	TAAGGGCTTAATCACCATGCCTCGAGAAACCATCAACCCTTGCTCGTAATGTCCCTCTTC	120		
Query 254	TCGCTCCGGGCCCATCTAACGTGGGGTTACTATCATGAAACTA	298		
Sbjct 121	TCGCTCCGGGCCCATCTAACGTGGGGTTACTATCATGAAACTA	165		

B)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
294 bits(159)	7e-84	163/165(99%)	0/165(0%)	Plus/Plus
Query 134	ACTCAATCTCATAATTCAGTATCTTTCAACAGTAATCGAATGCATATCACTTAGTCCAA	193		
Sbjct 1	ACTCAATCTCATAATTCAGTATCTTTCAACAGTAATCGAATGCATATCACTTAGTCCAA	60		
Query 194	TAAGGGCTTAATCACCATGCCTCGAGAAACCATCAACCCTTGCTCGTAATGTCCCTCTTC	253		
Sbjct 61	TAAGGGCTTAATCACCATGCCTCGAGAAACCATCAACCCTTGCTCGTAATGTCCCTCTTC	120		
Query 254	TCGCTCCGGGCCCATCTAACGTGGGGTTACTATCATGAAACTA	298		
Sbjct 121	TCGCTCCGGGCCCATCTAACGTGGGGTTACTATCATGAAACTA	165		

Rycina 28. Porównanie sekwencji fragmentu pętli D mtDNA reprezentującej haplotyp „H1” (A) i „H2” (B) do sekwencji pętli D sekwencji referencyjnej psa domowego (NC_002008.4) programem BLAST. Czerwonym znacznikiem zaznaczono różnice w sekwencjach.

Przeprowadzona analiza czynnikowa korespondencji FCA umożliwiła zwizualizowanie różnic rozkładu genotypów między badanymi osobnikami w populacji polskiego spaniela myśliwskiego pod względem 2 haplotypów mtDNA z uwzględnieniem 17 sekwencji mikrosatelitarnych (P1 i P2). Osobniki różniące się znacząco pod względem genotypów o haplocie H1 od pozostałych osobników z populacji samców numerach: 47 i 150 (oba miały haplocie H1Y) i samice: 46, 52 pozostawiły po sobie małą liczbę szczeniąt (2-3) z wyjątkiem osobnika 150, który nie pozostawił żadnego potomka.



Rycina 29. Porównanie rozkładu genotypów między badanymi osobnikami (n=65) pod względem 2 haplotypów mtDNA badanej populacji polskiego spaniela myśliwskiego pod względem 17 sekwencji mikrosatelitarnych. (H - haplocie pod względem sekwencji mtDNA).

Na podstawie powyższego porównania zaobserwowano niewielkie różnice pomiędzy analizowanymi sekwencjami (oznaczonych na rycinie jako „Sbjct”) a sekwencją referencyjną (oznaczonej na rycinie jako „Query”): odpowiednio 1 różnica dla sekwencji haplotypu H1 i dwie różnice dla sekwencji haplotypu H2. Dla obu analizowanych sekwencji oszacowano podobieństwo z sekwencją referencyjną na poziomie 99%. Różnica pomiędzy 26 nukleotydem sekwencji z haplotypu H2, a 160 nukleotydem sekwencji petli D sekwencji referencyjnej dotyczyła miejsca polimorfizmu pojedynczego nukleotydu (SNP) (transwersja - A zamiast T), dzięki któremu

wyodrębniono 2 linie/haplotypy mtDNA w populacji polskiego spaniela myśliwskiego. Natomiast różnica w miejscu 160 nukleotydu sekwencji z haplotypu H1 i H2 w stosunku do pozycji 193 nukleotydu z sekwencji pętli D sekwencji referencyjnej (NC_002008.4) jest identyczna (tranzycja - G zamiast A). Spośród przebadanych 65 osobników 55 z nich (84,62%) miało sekwencję charakterystyczną dla haplotypu 1 (H1), a 10 osobników (15,38%) H2.

Z uwagi jednak na dosyć krótki fragment pętli D (po ujednoczeniu długości badanych sekwencji była to długość 165 pz), który wykorzystano w niniejszych badaniach wskazane by było, aby w późniejszych badaniach wykorzystać dłuższy bądź inny fragment regionu pętli D. Takie podejście mogłoby dostarczyć szerszych informacji o zróżnicowaniu mtDNA oraz być może umożliwić wyodrębnienie większej liczby linii/haplotypów mtDNA w obrębie badanej populacji polskiego spaniela myśliwskiego.

Zidentyfikowanie mniejszej liczby haplotypów w badanej populacji, niż wynikałoby to z analizy rodowodowej, jest zjawiskiem obserwowanym również w innych badaniach dotyczących zmienności mitochondrialnego DNA (mtDNA) u różnych ras psa domowego. W pracy Tkaczyk i wsp. (2020), obejmującej analizę nowo importowanych do Polski osobników rasy hovawart, wyodrębniono także jedynie dwa różne haplotypy spośród dwunastu teoretycznych linii hodowlanych, co jest wynikiem zbieżnym z uzyskanym w niniejszej dysertacji. Badania te opierały się na próbach o znanym pochodzeniu (głównie z Czech i Słowacji, pojedyncze osobniki z Rumunii, Niemiec, Węgier i Norwegii), a liczebność suk hodowlanych, reproduktorów i ich potomstwa była dobrze udokumentowana. Do oceny zmienności genetycznej wykorzystano fragment o długości około 600 pz regionu kontrolnego (pętli D) mtDNA.

Istnienie zaledwie dwóch haplotypów w obrębie ośmiu rodowodowo zdefiniowanych linii (jak w badaniach własnych) może wynikać z kilku czynników. Po pierwsze, część linii mogła mieć wspólne pochodzenie matczyne, co prowadzi do pozornego zwiększenia liczby linii genealogicznych przy braku rzeczywistego zróżnicowania mitochondrialnego DNA. Po drugie, utrata części linii matczynych może być konsekwencją zjawiska wąskiego gardła (ang. *bottleneck*), związanego np. z okresami spadku liczebności populacji, ograniczonym wykorzystaniem niektórych suk w hodowli lub preferowaniem wybranych linii w programach hodowlanych. Efekt „wąskiego gardła” miał oczywiście miejsce, w rasie PSM np. w czasie II Wojny Światowej, ale od czasu rozpoczęcia odnawiania rasy przez dr Krzywińskiego takie

sytuacje nie wydałyby się. Stąd wniosek, że w analizowanej obecnie populacji PSM, takie zjawisko możemy wykluczyć. Dodatkowo wszystkie wyodrębnione na podstawie rodowodów linie żeńskie pozostają aktywne w rozrodzie – mają potomstwo (Rycina 11). Nie obserwuje się częstszego wykorzystywania którejs z suk. Rasa PSM jest na etapie, do którego w ostatnich kilku latach zostały wprowadzone nowe suki, a potomstwo uzyskane z kojarzeń z tymi sukami, dopiero wchodzi w okres rozrodczy (oczekiwany średni wiek pojawienia się potomstwa w rasie PSM to 3,79 lat), dlatego też zdecydowana większość osobników pochodzi od 1 suki.

W pracy Angleby i Savolainen (2005) analizowano fragment pętli D o długości 573 pz u 763 psów. W wyniku analizy zidentyfikowano 122 haplotypy mtDNA, z czego 8 było nowych. Autorzy stwierdzili dodatkowo, że ten sam haplotyp może występować u różnych ras, często niezależnie od ich pochodzenia geograficznego. Większość psów należała do niewielkiej liczby dominujących haplotypów.

Podobne obserwacje uzyskali Takahashi i wsp. (2002), którzy analizowali fragment o długości około 600 pz regionu pętli D mtDNA u 365 psów należących do dziewięciu ras. W badaniu tym wyodrębniono 64 haplotypy, przy czym w obrębie każdej rasy występował jeden lub kilka dominujących typów. Przykładowo, u psów ras shih-tzu i goldenretriever stwierdzono ten sam dominujący haplotyp, obecny odpowiednio u 85 % i 74 % osobników danej rasy. Wyniki badań ww autorów potwierdzają, że pomimo dużego zróżnicowania fenotypowego, wiele ras psa domowego charakteryzuje się ograniczoną zmiennością w zakresie mtDNA.

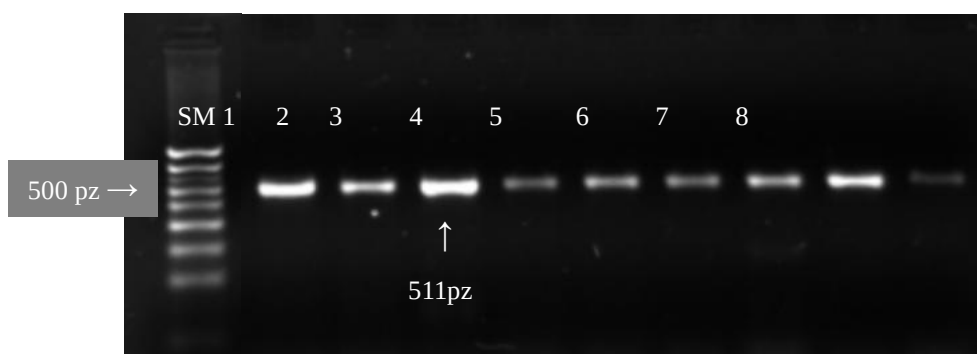
Z kolei w badaniach Vilà i wsp. (1997), obejmujących 140 prób od 67 ras psa domowego i analizujących krótszy fragment pętli D (ok. 261 pz), zidentyfikowano 26 haplotypów, z których niektóre były wspólne dla różnych ras, m.in. haplotyp D3 występował zarówno u rasy springer spaniel, borderterrier, whippet, szpica japoński i chow-chow. Wyniki te, podobnie jak dane uzyskane w niniejszej dysertacji, wskazują, że rzeczywiste zróżnicowanie mitochondrialnego DNA w populacjach psa domowego może być znacznie mniejsze, niż wynikałoby to z analizy rodowodowej.

10 Identyfikacja mutacji

10.1 Mutacja c.5G>A w genie *PRCD*

Analizie mutacji c.5G>A w genie *PRCD* poddano 84 osobników rasy polski spaniel myśliwski. Początkowo przeanalizowano możliwie wszystkich najstarszych osobników, które brały udział w rozrodzie i które tworzyły obecną populację polskiego spaniela myśliwskiego oraz te osobniki, które zostały włączone jako „nowe” (czyli osobniki, dla których rodzice nie byli znani). W przypadkach, gdy mutacja została zidentyfikowana badano także potomstwo danego osobnika, ale tylko takie które również brało aktywny udział w rozrodzie oraz te które na podstawie informacji od właściciela miało zostać przeznaczone do rozrodu w przyszłości.

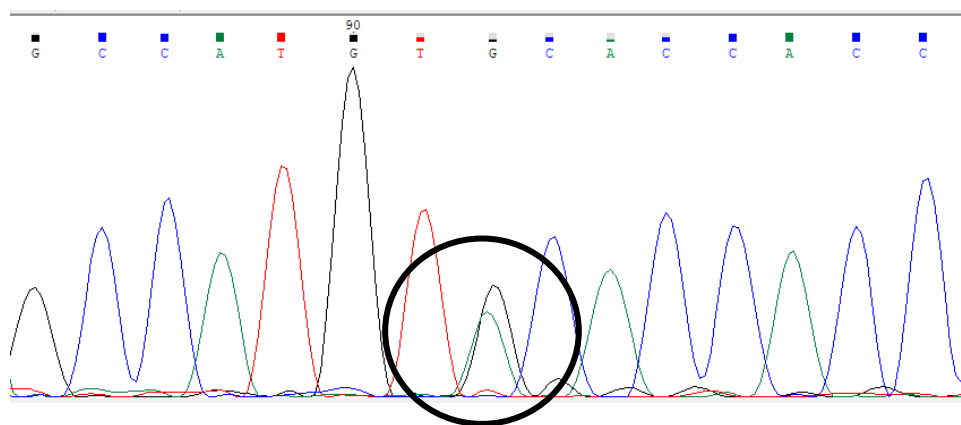
W pierwszej kolejności dokonano amplifikacji badanej sekwencji genu *PRCD* za pomocą łańcuchowej reakcji polimerazy. Na rycinie 30 przedstawiono przykładowe zdjęcie żelu po przeprowadzonym rozdziale elektroforetycznym produktów PCR.



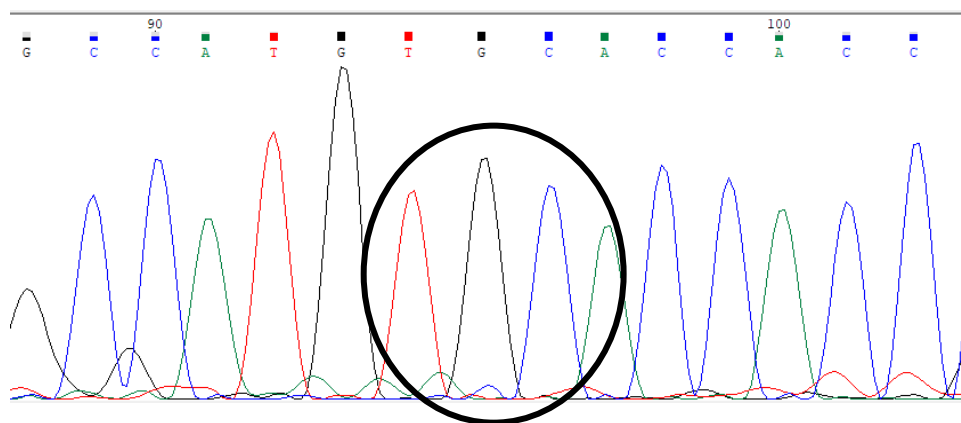
Rycina 30. Rozdział elektroforetyczny produktu PCR genu *PRCD* w 1,5% żelu agarozowym. SM-standard masy SmartLader SF EuroGenetic; próby 1-8 – produkt PCR.

Następnie próby oczyszczono zgodnie z procedurą opisaną na stronie 61-62 i przekazano do pracowni sekwencjonowania IBB. Sekwencjonowanie przeprowadzono metodą Sanger. Po otrzymaniu sekwencji sprawdzano ich jakość oraz obecność szukanej mutacji (c.5G>A) za pomocą programów: BioEdit 7.26 i Chromas 2.6.6. Sekwencje porównano także w programie MEGA 11.0.10..

Spośród 84 sekwencji zidentyfikowano wyłącznie jedną sekwencję z mutacją c.5G>A w spodziewanym miejscu (Rycina 31).



Rycina 33. Fragment chromatogramu sekwencji z mutacją c.5G>A z jednym allelem – nosiciel mutacji (program Chromas 2.6.6). Czarnym znacznikiem zaznaczono miejsce mutacji – widoczny odczyt (pik) zarówno dla nukleotydu G (prawidłowy) jak i A.



Rycina 34. Fragment chromatogramu sekwencji bez mutacji c.5G>A (program Chromas 2.6.6). Czarnym znacznikiem zaznaczono miejsce spodziewanej mutacji – widoczny odczyt (pik) dla nukleotydu G (prawidłowy).

Na podstawie powyższych wyników stwierdzono, że mutacja c.5G>A w genie *PRCD* została wprowadzona do rasy polskie spaniel myśliwski poprzez wprowadzenie osobników nr 74 (pies), 100 (suka) i 243 (pies). W populacji PSM osobniki heterozygotyczne (nosiciele mutacji), są aktywni w rozrodzie, co może oznaczać prawdopodobieństwo potomstwa, które odziedziczyło po rodzicach po jednej kopii allelu z mutacją c.5G>A, a więc będą to osobniki homozygotyczne recesywne – potencjalnie może się u nich rozwinąć postępujące zwyrodnienie czopków i pręcików (ang. *progressive rod-conedegeneration* - *prcd*). Osobnik heterozygotyczny według wiedzy (rozdział w spisie piśmiennictwa o mutacji c.5G>A w genie *PRCD*, (Zangerl i wsp., 2006) nie powinni mieć żadnych objawów choroby. Obecnie stwierdzono w badanej populacji: jednego osobnika homozygotę recesywną i 22 osobników heterozygotycznych (nosicieli zmutowanego allelu). Dla osobnika homozygotycznego

recesywnego nie było możliwe sprawdzenie czy mutacja c.5G>A występuje u rodziców, ze względu na brak od nich materiału biologicznego. W ramach opisanych badań nie były prowadzone badania okulistyczne, nie jest możliwe stwierdzenie, czy u osobnika homozygotycznego recesywnie rozwinęły się objawy choroby prcd.

Oszacowana częstość allelu z mutacją c.5G>A w genie *PRCD* w badanej populacji polskiego spaniela myśliwskiego kształtowała się na poziomie 0,169. Badania zaprezentowane w niniejszej dysertacji były ukierunkowane na identyfikację nosicieli. Jeśli rodzice danego osobnika byli osobnikami bez mutacji to ich potomstwa nie analizowano. Nie mniej niepokojący jest fakt, że nosiciela zmutowanego allelu c.5G>A w genie *PRCD* hodowcy wprowadzili do rasy stosunkowo niedawno i potomstwo odziedziczyło po nim zmutowany allel.

Oszacowana częstość występowania badanej mutacji w rasie polski spaniel myśliwski nie odbiegała znacząco od wyników badań innych autorów (Tabela 31). Takanosu (2017) analizował częstość występowania mutacji c.5G>A w genie *PRCD* w dwóch populacjach psów rasy labrador retriever w Japonii: psów domowych i psów przewodników, uzyskując wartości 0,114 i 0,026, odpowiednio. Zauważalnie niższy wynik w drugiej grupie mógł wynikać z kontroli krycia i dopuszczania do rozrodu wyłącznie psów przebadanych pod kątem występowania tej mutacji. Natomiast wyniki badań Dostal i wsp. (2011) wykazały, że częstość występowania w wmutacji u 17 ras psów wynosiła od 0 (brak mutacji c.5G>A w genie *PRCD*) do 0,45 (Tabela 31). Wyniki badań Andrade i wsp. (2019) wskazują na występowanie allelu z mutacją u rasy cocker spaniel angielski z podobną częstością (Tabela 31). Co ważne, badania Lewis i Mellersh (2019) wskazują, że w ciągu 8-10 lat po publikacji mutacji przyczynowej prcd-PRA, a więc od czasu kiedy testy genetyczne dla tej jednostki chorobowej były dostępne, nastąpił spadek częstości występowania wariantu allelu z mutacją, odpowiednio o 96,5% dla rasy labrador retriever (z 0,078 do 0,003 oraz o 95,1% dla rasy cocker spaniel angielski (z 0,126 do 0,006). Wyniki te sugerują, że hodowcy znając wyniki testów genetycznych świadomie podejmują decyzję o tym, by osobniki heterozygotyczne i/lub homozygotyczne recesywnie wykluczyć z rozrodu

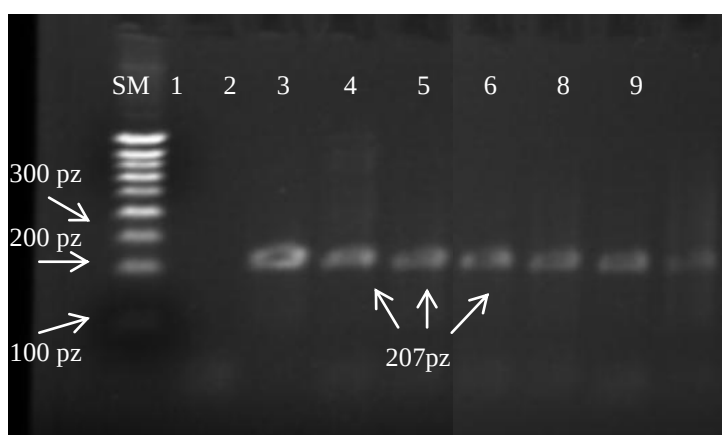
Tabela 31. Częstość występowania mutacji c.5G>A w genie PRCD u różnych ras psa domowego.

Rasa	Frekwencja allelu z mutacją	Kraj przeprowadzonych badań	Źródło
polski spaniel myśliwski	0,169	Polska	badaniawłasne
labrador retriever - populacja psów domowych	0,114	Japonia	Takanosu, 2017
labrador retriever - populacja psów przewodników	0,026		
amerykański cocker spaniel	0,090	Czechy	Dostal iwsp., 2011
angielski cocker spaniel	0,34		
angielski springer spaniel	0,00		
walijski springer spaniel	0,00		
flat coated retriever	0,00		
golden retriever	0,00		
chesapeake bay retriever	0,14		
retriever z NowejSzkocji	0,44		
labrador retriever	0,07		
pudel toy	0,45		
pudelminiaturowy			
pudelśredni	0,05		
pudelstandardowy	0,00		
portugalski pies dowodny	0,33		
chiński grzywacz	0,02		
shipperke	0,06		
australijski pies pasterski	0,00		
angielski cocker spaniel	0,255	Brazylia	Andrade iwsp., 2019

10.2. Mutacja insercji 44pz w genie *RPGRIP1*

Analizie w kierunku poszukiwania nosicieli mutacji insercji 44pz w genie *RPGRIP1* poddano 216 osobników rasy polski spaniel myśliwski, która polegała przede wszystkim na przeprowadzeniu amplifikacji badanej sekwencji genu za pomocą reakcji PCR (Rycina 35). Uzyskany produkt PCR, we wszystkich przypadkach zawsze osiągał wielkość na poziomie prążka o długości 200 pz, więc bez żadnych wątpliwości przyjęto, że wszystkie przebadane osobniki są homozygotami dominującymi pod

względem badanej sekwencji (dwa allele o długości 207 pz) genu *RPGRIP1*. Położenie prążka świadczącego o wielkości produktu PCR pomiędzy prążkiem SM (standardu masy) o długości 200 pz a 300pzmogłoby wskazywać na wystąpienie mutacji - insercji 44 pz w genie *RPGRIP1* - taki produkt PCR osiągnąłby wtedy wielkość 251 pz i zostałby zsekwencjonowany w celu uzyskać pewność co do kolejności zapisu nukleotydów w badanym fragmencie genu *RPGRIP1*. W przypadku wystąpienia mutacji sekwencja dzika od tej z mutacją różniłaby się fragmentem A₂₉GGAAGCAACAGGATG (44pz) (Mellersh i wsp., 2006). Takiej sytuacji jednak nie było, więc w niniejszych badaniach u przebadanych osobników PSM nie stwierdzono obecności mutacji insercji 44pz w genie *RPGRIP1*.



Rycina 35. Rozdział elektroforetyczny w 1,5% żelu agarozowym produktu PCR fragmentu genu *RPGRIP1*. SM-standard masy SmartLader SF EuroGenetic, próba 1 – brak produktu PCR, próby 2-9 – produkt PCR o długości 207 pz.

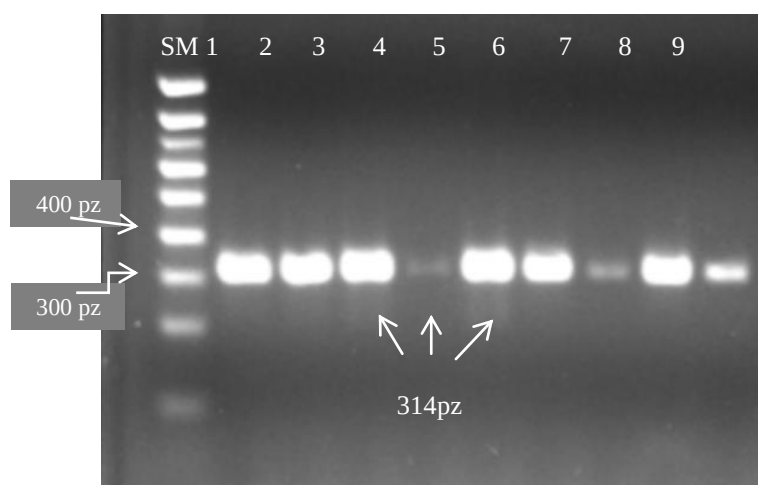
Choroby oczu, szczególnie te z grupy postępujących zwyrodnień siatkówki (ang. *progressive retinalatrophy*, PRA), są przedmiotem licznych badań. Podobnie jak to ma miejsce w przypadku mutacji ins44 w genie *RPGRIP1*- mutacji odpowiadającej za występowanie choroby cord1-PRA. W badaniach Miyadera i wsp.(2009) częstość występowania allelu z mutacją została oszacowana na następującym poziomie: u rasy angielski springer spaniel - 0,38; u beagle- 0,28; u buldog francuski - 0,13 oraz u rasy labrador retriever 0,03. Podobne wyniki, ale obejmujące większą liczbę ras uzyskali Donner i Mellersh (2024). Autorzy przeprowadzili szeroko zakrojone badania przesiewowe w poszukiwaniu m.in. mutacji ins44 w genie *RPGRIP1* spośród 242665 psów reprezentujących 226 ras psa domowego, które poddane były wcześniej badaniom komercyjnym testem genetycznym Wisdom Panel. W badaniach uwzględniono również próby od dingo i wilka szarego. Spośród ras, u których zidentyfikowano allele z mutacją

znalazły się następujące rasy (w nawiasach podana frekwencja allelu z mutacją): jamnik miniaturowy długowłosy (0,35), angielski springer spaniel (0,30), bloodhound (0,22), american staffordshire terier (0,18), jamnik miniaturowy krótkowłosy (0,18), sznauzer (0,13), field spaniel (0,12), buldog francuski (0,08), logattoromagnolo(0,08), rottweiler (0,07), wyżeł weimarski krótkowłosy (0,07), beagle (0,11), chihuahua (0,04), amerykański pies eskimoski (0,03), angielski cocker spaniel (0,02), cocker spaniel (0,01) oraz pudel miniaturowy (0,01). U dingo i wilka szarego nie stwierdzono obecności mutacji ins44 w genie *RPGRIP1* (Donner i Mellersh, 2024).

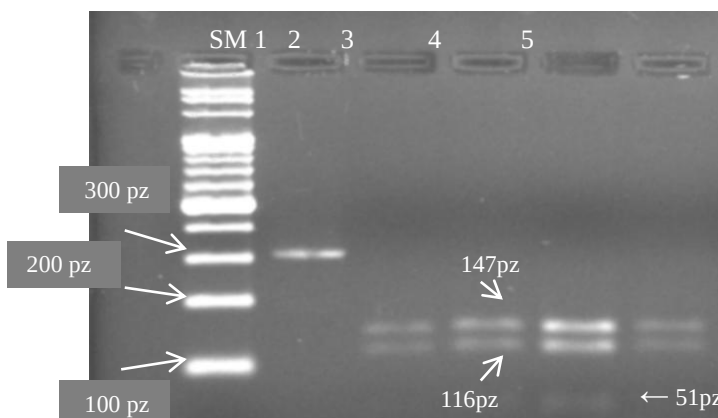
Należy podkreślić, że w przypadku cord1, obecność dwóch alleli z mutacją nie jest równoważna z rozwojem choroby, tak jak wskazują Miyadera i wsp.(2009) u jamnika miniaturowego długowłosego w wieku powyżej 4 lat, około 17% klinicznie zdrowych psów było homozygotycznych pod względem mutacji ins44pz w genie *RPGRIP1*. Podobnie jak w przypadku mutacji w genie *PRCD*, dostępność testów genetycznych dla konkretnej rasy umożliwia hodowcom świadomy wybór par do kojarzeń. Według Miyadera i wsp.(2009), którzy powołują się na badania Animal Health Trust odsetek psów homozygot recesywnych w populacji rasy jamnik miniaturowy długowłosy spadł w ciągu czterech lat z 18% do 5%.

10.3. Mutacja c.550 C>T w genie *PFKM*

Analizie mutacji c.550 C>T w genie *PFKM* poddano 216 osobników rasy polski spaniel myśliwski. Najpierw dokonano amplifikacji badanego genu za pomocą PCR (Rycina 36), a następnie produkt PCR poddano trawieniu enzymem restrykcyjnym *MspI* (Rycina 37).



Rycina 36. Rozdział elektroforetyczny w 1,5% żelu agarozowym produktu PCR fragmentu genu *PFKM*. SM-standard masy SmartLader SF EuroGenetic, próby 1-9 – produkt PCR o długości 314 pz.



Rycina 37. Rozdział elektroforetyczny w 2% żelu agarozowym produktu PCR(fragment genu *PFKM*) trawionego enzymem restrykcyjnym *MspI*. SM-standard masy SmartLader SF EuroGenetic, próba 1 – produkt PCR o długości 314 pz nietrawiony restryktazą *MspI*, próby 2-5 – fragmen

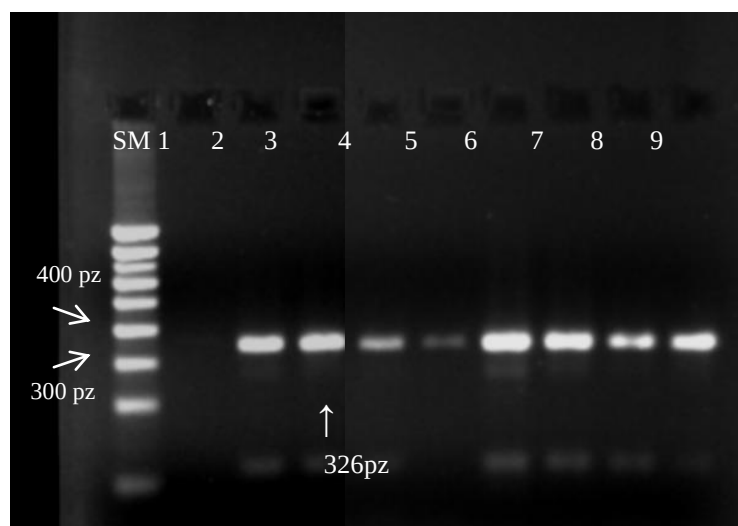
Dla wszystkich analizowanych osobników otrzymano wynik jak na Rycinie 37. Każdy produkt PCR został strawiony enzymem restrykcyjnym *MspI* i uzyskano fragmenty restrykcyjne o wielkości 147pz i 116pz oraz 51 pz (fragmentu restrykcyjnego o wielkości 51pz ze względu na jego niewielki rozmiar w większości przypadków po elektroforezie nie było widać w żelu agarozowym). Zgodnie z informacjami otrzymania możliwego wyniku powyższego testu genetycznego (Tabela 16) uznano, że wszystkie analizowane osobniki to osobniki homozygotyczne dominujące, a więc u badanych osobników pochodzących z populacji polskiego spaniela myśliwskiego nie stwierdzono występowania mutacji c.550 C>T w genie *PFKM*.

Jedynym doniesieniem na temat mutacji c.550 C>T w genie *PFKM* u psa domowego jest praca Inal Gultekin i wsp. (2012) dotycząca płochacza niemieckiego. Natomiast jedna z wiodących firm, która wprowadziła na światowy rynek testy komercyjne dla psów „Embark Test” (<https://embarkvet.com>), w swoich panelach genetycznych umożliwia diagnostykę danego osobnika pod kątem mutacji 550 C>T w genie *PFKM*. Wyniki testów dostępne są wyłącznie dla właściciela, nie są publikowane w formie zbiorczych analiz.

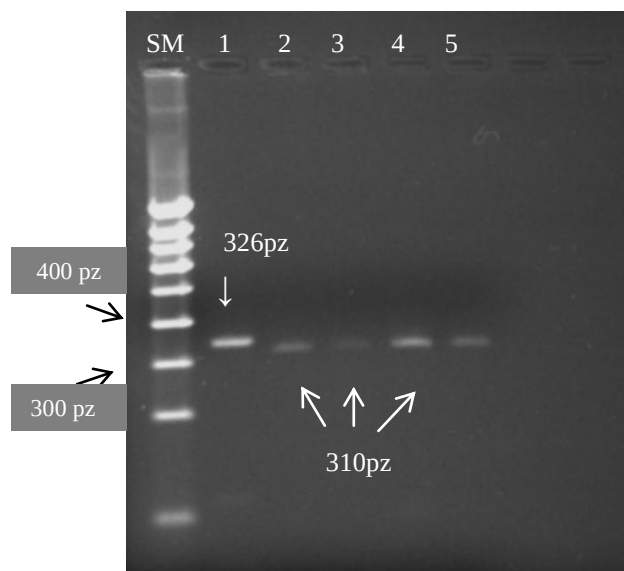
10.4. Mutacja c.2228 G>A w genie *PFKM*

W genie *PFKM* zidentyfikowano inną mutację c.2228G>A, która występuje u następujących ras psa domowego: amerykańskiego cocker spaniela, angielskiego springer spaniela i whippeta (Smith i wsp., 1996).

Analizie w kierunku nosicielstwa mutacji 2228 G>A w genie *PFKM* poddano 216 osobników rasy polski spaniel myśliwski. Dokonano amplifikacji badanej sekwencji genu *PFKM* za pomocą reakcji PCR (Rycina 38) następnie produkty PCR poddawane były trawieniu za pomocą enzymu restrykcyjnego *BanI* (Rycina 39).



Rycina 38. Rozdział elektroforetyczny w 1,5% żelu agarozowym produktu PCR fragmentu genu *PFKM*. SM-standard masy SmartLader SF EuroGenetic, próba 1 – brak produktu PCR, próby 2-9 – produkt PCR o długości 326 pz.



Rycina 39. Rozdział elektroforetyczny w 2% żelu agarozowym produktu PCR fragmentu genu *PFKM* trawionego enzymem restrykcyjnym *BanI*. SM-standard masy SmartLader SF EuroGenetic, próba 1 – produkt PCR nietrawiony enzymem *BanI*, próby 2-9 – fragmenty restrykcyjne powstałe

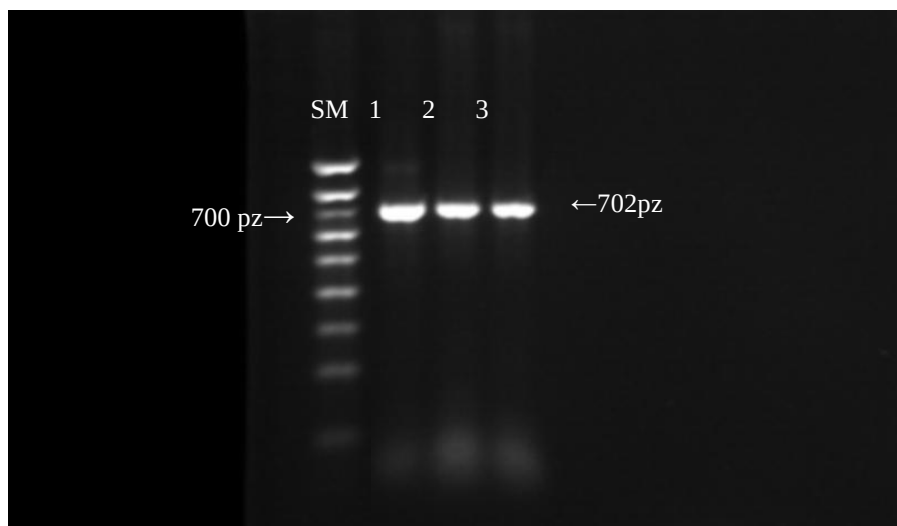
U wszystkich analizowanych osobników otrzymano wynik jak przedstawiono na Rycinie 39. To znaczy każda próba z produktem PCR została strawiona restryktazą *BanI*

i uzyskano fragmenty restrykcyjne o długości 310 pz i 25 pz (fragment restrykcyjny o 25pz nie był widoczny w żelu agarozowym po elektroforezie ze względu na jego niewielki rozmiar). Na podstawie informacji możliwym wyniki powyższego testu genetycznego (Tabela 16) przyjęto, że wszystkie analizowane osobniki to homozygoty dominujące, a więc w badanej populacji polskiego spaniela myśliwskiego nie stwierdzono mutacji c.2228 G>Aw genie *PFKM*.

Zierath i wsp. (2017) w swojej pracy przedstawili badania dotyczące próby zidentyfikowania allelu z mutacją c.2228G>A w genie *PFKM* w populacji psów mieszańców rasowych (próba badana to 34 112 osobników). Znana była rasa każdego psa z ośmiu pradziadków i informacja ta podana była w badaniach. Zidentyfikowano jedynie 19 osobników heterozygotycznych pod względem tej mutacji. Częstość allelu z mutacją wyniosła 0,000278 w badanej grupie psów. Spośród 19 osobników heterozygotycznych, tylko dla jednego psa został zidentyfikowany przodek – angielski springer spaniel - jako pradziadek. W przypadku pozostałych 18 osobników heterozygotycznych nie wykryto żadnych rasowych przodków, u których wcześniej odnotowano tę konkretną mutację (c.2228G>A). Wyniki te podkreślają znaczenie prowadzenia badań przesiewowych pod kątem różnych mutacji genetycznych także w populacjach, które nie są klasycznie kojarzone z występowaniem określonych chorób dziedzicznych. Wiedza o rzeczywistym zasięgu występowania takich mutacji jest kluczowa zarówno dla zdrowia psów, jak i dla odpowiedzialnego hodowcy.

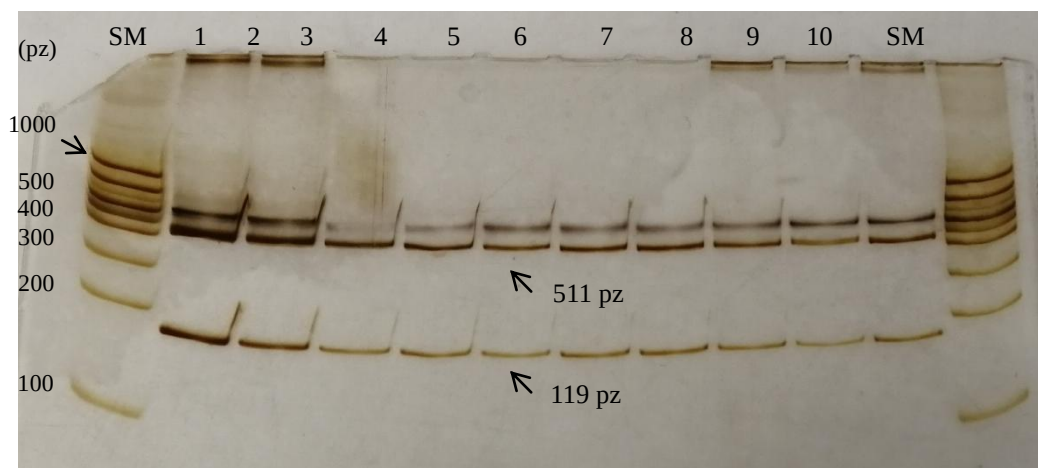
10.5. Mutacja c.189C>G w genie *T-BOX*

Analizie mutacji 189C>G w genie *T-BOX* poddano 216 osobników. Po przeprowadzeniu łańcuchowej reakcji polimerazy, produkt PCR poddawano rozdzielowi elektroforetycznemu w 1,5% żelu agarozowym (Rycina 40). Następnie produkt PCR trawiono restryktazą *BstEII* i poddawano rozdzielowi elektroforetycznemu w 10% żelu poliakryloamidowym, a następnie żel barwiono srebrem (Rycina 41).



Rycina 40. Rozdział elektroforetyczny w 1,5% żelu agarozowym produktu PCR fragmentu genu *T-box*. SM-standard masy SmartLader SF EuroGenetic, próby 1-3 – produkt PCR o długości 702 pz.

U wszystkich analizowanych 216 osobników PSM uzyskano fragmenty restrykcyjne o wielkości 511pz i 119pz (fragment restrykcyjny o wielkości 31pz nie był widoczny ze względu na jego niewielki rozmiar) (Rycina 41).



Rycina 41. Rozdział elektroforetyczny w 10% żelu poliakryloamidowym produktu PCR trawionego enzymem restrykcyjnym *BstEII*. SM-standard masy SmartLader SF EuroGenetic, próby 1-10 – fragmenty restrykcyjne powstałe po trawieniu produktu PCR enzymem *BstEII*.

Otrzymany wynik jest zgodny z informacjami o możliwym wyniku powyższego testu genetycznego (Tabela 16). Wszystkie analizowane osobniki to osobniki homozygotyczne recesywnie, a więc w badanej populacji polskiego spaniela myśliwskiego nie stwierdzono mutacji c.189C>G w genie *T-Box*. Wszystkie osobniki mają długi ogon zgodny ze wzorcem rasy https://www.zkwp.pl/wzorcowe/1002_PL.pdf..).

W pracy Hytönen i wsp. (2008) przedstawione zostały badania o rozpowszechnieniu mutacji c.189C>G w genie *T-Box* w populacjach różnych ras psa domowego. Autorzy wskazują, że 17 ras, u których stwierdzili obecność mutacji można zaliczyć do dwóch grup: psów pasterskich i myśliwskich. U ras takich jak: spaniel bretońskich i szwedzki vallhund częstość allelu z mutacją c.189C>G wynosiła 0,4, u teriera brazylijskiego, polskiego owczarek nizinnych i schipperke była niewiele mniejsza bo na poziomie 0,3, u owczarków australijskich i bourbonnais pointer 0,2 oraz u owczarka pirenejskiego 0,05. Z kolei w badaniach Gruszczyńskiej i wsp.(2013) frekwencja allelu z mutacją oszacowana została na poziomie 0,35 dla polskiego owczarka nizinnych, a więc podobnie do badań Hytönen i wsp.(2008).

11. Wnioski

1. Wyniki analizy badanych cech fenotypowych wykazały dużą ich zmienność w rasie polski spaniel myśliwski, jednakże wartości te były zgodne z wartościami opisanymi w standardzie rasy. Dalsza praca hodowlana w rasie PSM powinna skupiać się na wyrównaniu cech fenotypowych i utrzymaniu ich na odpowiednim poziomie.
2. Wyniki analizy rodowodowej badanej populacji PSM wskazują na to, że populacja ta została utworzona przez niewielką liczbę osobników, udział poszczególnych założycieli był wysoce nierównomierny, ponad połowa analizowanych osobników (55,8%) była zinbredowana, co wskazuje na stosowanie kojarzeń między spokrewnionymi osobnikami.
3. Dwóch przodków odpowiadało za 50% zmienności genetycznej, pozostali założyciele wnieśli niewielki wkład lub na przestrzeni lat ich linie wygasły. Pomimo tego, średnie spokrewnienie kształtowało się na poziomie 21,65%, a średni współczynnik inbredu (F) w populacji wynosił 7,38% i był niższy od wartości oczekiwanej (8,02%) oszacowanej na podstawie udziału założycieli.
4. Wartość efektywnej wielkości populacji kształtowała się na poziomie $N_e = 296,87$, a symulacja wykonana zgodnie z wytycznymi FCI dla populacji referencyjnej (osobniki urodzone w latach 2019–2024) wykazała efektywną wielkość sięgającą $N_e = 115,6$, co oznacza, że w tym zakresie rasa PSM spełnia kryteria FCI do wstępnego uznania rasy.
5. W wyniku analizy mitochondrialnego DNA w badanej populacji PSM wyodrębniono dwa haplotypy, natomiast w przypadku sekwencji mikrosatelitarnych zlokalizowanych w chromosomie Y zidentyfikowano cztery haplotypy, co jest znacznie mniejszą liczbą linii niż wynikało to z prześledzenia rodowodów. Należy jednak podkreślić, że w niniejszych badaniach analizowany był dosyć krótki fragment pętli D mtDNA (ok. 165 pz), dlatego w późniejszych badaniach wskazane byłoby, wykorzystanie dłuższego fragmentu regionu kontrolnego pętli D, co być może pozwoliłoby na wyodrębnienie większej liczby haplotypów mtDNA w badanej populacji.
6. Na podstawie wyników analizy sekwencji mikrosatelitarnych wykazano wysoki poziom zmienności genetycznej badanej populacji PSM.
7. Zastosowanie wybranych markerów genetycznych umożliwiło wykrycie pewnych błędów w zapisach rodowodowych.

8. W populacji PSM nie stwierdzono obecności zmutowanych alleli w badanych sekwencjach genów: *RPGRIP1*, *PFKM* i *T-box*. Jedynie w przypadku analizowanego fragmentu genu *PRCD*, odpowiedzialnego za postępujący zanik czopkowo-pręcikowy (*prcd*), zidentyfikowano w populacji polskiego spaniela myśliwskiego heterozygoty (nosicieli) i jedną homozygotę recesywną. Powyższy wynik jest wskazaniem konieczności monitorowania rasy PSM w kierunku nosicielstwa zmutowanych alleli genu *PRCD*, aby zapobiec utrwaleniu się tego allelu w populacji.

9. Poziom zmienności genetycznej populacji polskiego spaniela myśliwskiego wskazuje na możliwość starania się przez ZKwP o status „wstępnego uznania rasy” przez FCI.

12 Bibliografia

1. Acland G. M., Ray, K., Mellersh C. S., Gu, W., Langston A. A., Rine J., Ostrander E. A., Aguirre G. D. 1998. Linkage analysis and comparative mapping of canine progressive rod-cone degeneration (prcd) establishes potential locus homology with retinitis pigmentosa (RP17) in humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(6), 3048–3053. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.6.3048>.
2. Aguirre G., Alligood J., O'Brien P., Buyukmihci N. 1982. Pathogenesis of progressive rod-cone degeneration in miniature poodles. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 23:610-630.
3. Aguirre G.D., Acland G.M. 1988. Variation in retinal degeneration phenotype inherited at the prcd locus. *Experimental Eye Research* 46:663-687.
4. Alvarez C.E., Akey J.M. 2012. Copy number variation in the domestic dog. *Mamm. Genome* 23, 144–163. <https://doi.org/10.1007/s00335-011-9369-8>.
5. Angleby H., Savolainen P. 2005. *Forensic informativity of domestic dog mtDNA control region sequences*. *Forensic Science International*, 151(2–3), 125–133. doi: 10.1016/j.forsciint.2004.09.132.
6. Andrade L. R., Caceres A. M., Trecenti A. S., Brandão C. V. S., Gandolfi M. G., Aguiar E. V., Andrade D. G. A., Borges A. S., Oliveira-Filho J. P. 2019. Allele Frequency of the C.5G>A Mutation in the PRC D Gene Responsible for Progressive Retinal Atrophy in English Cocker Spaniel Dogs. *Animals*, 9(10), 844. <https://doi.org/10.3390/ani9100844>.
7. Bannasch D., Famula T., Donner J., Anderson H., Honkanen L., Batchner K., Safran N., Rebhun R. 2021. The effect of inbreeding, body size and morphology on health in dog breeds. *Canine Genet. Epidemiol.* 8, 12. <https://doi.org/10.1186/s40575-021-00111-4>.
8. Barker J.S.F. 1994. A global protocol for determining genetic distance among domestic livestock breeds. *Proc. 5th World Congr. Genet. Appl. Livest. Prod.*, Guelph, Ontario, Canada. Univ. Guelph: 501-508.
9. Bartusiak E. R., Barrabes M., Rymbekova A., Gimbernát-Mayol J., Lopez C., Barberis L., Montserrat D. M., Giro-I-Nieto X., Ioannidis A. G. 2022. Predicting Dog Phenotypes from Genotypes. *Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society. IEEE Engineering in Medicine and*

- Biology Society. Annual International Conference, 3558–3562.
<https://doi.org/10.1109/EMBC48229.2022.9870905>.
10. Belkhir K., Borsa P., Chikhi L., Raufaste N., Bonhomme F. 2001. GENETIX 4.02, logiciel sous Windows TM pour la génétique des populations. Laboratoire Génome, Populations, Interactions, CNRS UMR 5000, Université de Montpellier II, Montpellier (France).
 11. Bell J., Cavanagh K., Tilley L., Smith F. W. K. 2012. Veterinary Medical Guide to Dog and Cat Breeds, Teton New Media. 188-198.
 12. Benzécri J.P. 1973. L'Analyse des Données: T2, l'Analyse des correspondances Paris: Dunod.
 13. Boichard D., Maignel L., Verrier E. 1997. The value of using probabilities of gene origin to measure genetic variability in a population. Genetic Selection Evolution 29, 5-23.
 14. Botstein D., White R.L., Skolnick M., Davis R.W., 1980: Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. Am. J. Hum. Genet. 32: 314-331.
 15. Boyko, A. R. 2011. The domestic dog: man's best friend in the genomic era. *Genome Biology*, 12, 216.
 16. Brooks M., Sargan D. R. 2001. Genetic aspects of disease in dogs. [in] Ruvinsky A., Sampson J. (eds) The genetics of the dog . 191-266, CABI Publishing, London.
 17. Bruford M. W., Bradley D. G., Luikart G. 2003. DNA markers reveal the complexity of livestock domestication. Nature reviews. Genetics, 4(11), 900–910.
<https://doi.org/10.1038/nrg1203>.
 18. Busse C., Barnett K.C., Mellersh C.S., Adams V.J. 2011. Ophthalmic and cone derived electrodiagnostic findings in outbred Miniature Long-haired Dachshunds homozygous for a RPGRIP1 mutation. .Vet. Ophthalmol. 14:146-52. DOI: 10.1111/j.1463-5224.2010.00848.x.
 19. Calboli F.C., Sampson J., Fretwell N., Balding D.J. 2008. Population structure and inbreeding from pedigree analysis of purebred dogs. Genetics. 179(1), 593-601. doi: 10.1534/genetics.107.084954.
 20. Cervantes I., Goyache F., Molina A., Valera M., Gutiérrez J. P. 2011. Estimation of effective population size from the rate of coancestry in pedigreed populations. Journal of animal breeding and genetics. 128(1), 56–63.
<https://doi.org/10.1111/j.1439-0388.2010.00881.x>.

21. Cole J. B., Franke D. E., Leighton E. A. 2004. Population structure of a colony of dog guides. *Journal of Animal Science*, 82(10), 2906–2912.
22. Conlon F.L., Fairclough, L., Price, B.M.J., Casey, E.S., Smith, J.C. 2001. Determinants of T box protein specificity. *Development*, 128, 3749-3758
23. Curtis R., Barnett K.C. 1993. Progressive retinal atrophy in miniature longhaired dachshund dogs. *British Veterinary Journal* 149:71-85. DOI: 10.1016/S0007-1935(05)80211-8.
24. Donner J., Mellersh C. 2024. Frequency of RPGRIP1 and MAP9 genetic modifiers of canine progressive retinal atrophy, in 132 breeds of dog. *Animal Genetics*, 55(4), 687–691. <https://doi.org/10.1111/age.13443>.
25. Dostal J., Palánová A., Horak P. 2011. Progressive rod-cone degeneration (PRCD) in selected dog breeds and variability in its phenotypic expression. *Veterinární Medicína* 56:243-247, 2011. DOI: 10.17221/1564-VETMED.
26. Dryja T. P., Adams S. M., Grimsby J. L., McGee T. L., Hong D. H., Li T., Andréasson, S., Berson, E. L. 2001. Null RPGRIP1 alleles in patients with Leber congenital amaurosis. *American journal of human genetics*, 68(5), 1295–1298. <https://doi.org/10.1086/320113>.
27. Dunaway G. A., Kasten T. P., Sebo T., Trapp R. (1988). Analysis of the phosphofructokinase subunits and isoenzymes in human tissues. *The Biochemicaljournal*, 251(3), 677–683. <https://doi.org/10.1042/bj2510677>.
28. Evanno G., Regnaut S., Goudet J. 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular ecology* 14 (8), s. 2611–2620.
29. Falconer D. S., Mackay T. F. C. 1996. *Introduction to Quantitative Genetics* (4th ed.). Longman Group Ltd. 85-103, 129-150.
30. Falush D., Stephens M., Pritchard J. K. 2003. Inference of population structure using multilocus genotype data: linked loci and correlated allele frequencies. *Genetics* 164 (4), s. 1567–1587.
31. Felsenstein J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap, *Evolution*, 39, 4, 783–791, <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.1985.tb00420.x>
32. Forman O.P., Hitti R.J., Boursnell M., Miyadera K., Sargan D., Mellersh C. 2016. Canine genome assembly correction facilitates identification of a MAP9 deletion as

- a potential age of onset modifier for RPGRIP1-associated canine retinal degeneration. *Mamm. Genome*. 27:237-45. DOI: 10.1007/s00335-016-9627-x.
33. Frankham R., Ballou J. D., Briscoe D. A. 2002. *Introduction to Conservation Genetics*. 239-250. Cambridge: Cambridge University Press.
 34. Frąckowiak H., Kiryk E., Graczyk S., Zdun M. 2021. Preliminary biometric characteristics of Border Collies and their dependence on sport activity. *Animal Science And Genetics*, 17(4), 25-36. <https://doi.org/10.5604/01.3001.0015.6860>.
 35. Gerber K., Harvey J. W., D'Agorne S., Wood J., Giger U. 2009. Hemolysis, myopathy, and cardiac disease associated with hereditary phosphofructokinase deficiency in two Whippets. *Vet Clin Pathol* 38:46-51, 19228357. DOI: 10.1111/j.1939-165X.2008.00089.x.
 36. Giger U., Reilly M. P., Asakura T., Baldwin C. J., Harvey J. W. 1986. Autosomal recessive inherited phosphofructokinase deficiency in English springer spaniel dogs. *Animal Genetics*, 17(1), 15–23. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2052.1986.tb03184.x>
 37. Giger U, Smith BF, Woods CB, Patterson DF, Stedman H. 1992. Inherited phosphofructokinase deficiency in an American cocker spaniel. *J Am Vet Med Assoc*. 15;201(10):1569-71.
 38. Głazewska I. 2008. Genetic diversity in Polish hounds estimated by pedigree analysis. *Livest. Sci.*, 113: 296–301.
 39. Głazewska I. Prusak B. 2012. Evaluation of the effectiveness of introducing new alleles into the gene pool of a rare dog breed: Polish Hound as the example. *Czech Journal of Animal Science*. 57. 248-254. 10.17221/5923-CJAS.
 40. Goldberg A. F., Moritz O. L., Williams D. S. 2016. Molecular basis for photoreceptor outer segment architecture. *Prog. Retin. Eye Res*. 55, 52–81.
 41. Goldstein O., Zangerl B., Pearce-Kelling S., Sidjanin D.J., Kijas J.W., Felix J., Acland G.M., Aguirre G.D. 2006. Linkage disequilibrium mapping in domestic dog breeds narrows the progressive rod-cone degeneration interval and identifies ancestral disease-transmitting chromosome. *Genomics* 88:541-50. DOI: 10.1016/j.ygeno.2006.05.013.
 42. Goleman M., Balicki I., Radko A. Jakubczak A., Bieniek A. 2019. Genetic diversity of the Polish Hunting Dog population based on pedigree analyses and molecular studies. *Livestock Science*. 10.1016/j.livsci.2019.09.017.
 43. Goyache F., Gutiérrez J.P., Fernández I., Gómez E., Álvarez I., Díez J., Royo L.J. 2003. Using pedigree information to monitor genetic variability of endangered

- populations: the Xalda sheep breed of Asturias as an example. *J Anim Breed Genet* 120, 95-103.
44. Graphodatsky R.F., Ripoll A.S., Felix D., Stone J.S., Acland E.M., Aguirre G.M., GD. 2006. Identical mutation in a novel retinal gene causes progressive rod-cone degeneration in dogs and retinitis pigmentosa in humans. *Genomics* 88:551-563. DOI: 10.1016/j.ygeno.2006.07.007.
 45. Gresky C., Hamann H., Distl O. 2005. Einfluss von Inzucht auf die Wurfgrösse und den Anteil tot geborener Welpen beim Dackel [Influence of inbreeding on litter size and the proportion of stillborn puppies in dachshunds]. *Berliner und München tierärztliche Wochenschrift*. 118(3-4), 134–139.
 46. Gruszczyńska, Joanna, and Agata Czapla 2011. A Molecular Test for the Detection of the C295G Mutation in the T Gene Responsible for Shortened Tail and Taillessness in the Pembroke Welsh Corgi. *Annals of Warsaw University of Life Sciences – SGGW Animal Science*.
 47. Gruszczyńska J., Haska A., Grzegorzówka B. 2013. Detection of C295G mutation T gene in Polish Lowland Sheepdog. *Animal Science and Genetics*, 9(4), 9-16.
 48. Gutiérrez J.P., Altarriba J., Díaz C., Quintanilla A.R., Cañón J., Piedrafita J. 2003. Genetic analysis of eight Spanish beef cattle breeds. *Genet Sel Evol* 35, 43-64.
 49. Gutiérrez J.P., Goyache F. 2005. A note on ENDOG: a computer program for analysing pedigree information. *Journal of Animal Breeding and Genetics*, 122, 172-176.
 50. Gutiérrez J.P., Cervantes I., Molina A., Valera M., Goyache F. 2008. Individual increase in inbreeding allows estimating realised effective sizes from pedigrees. *Genet. Sel. Evol.*, 40, 359-378.
 51. Gutiérrez J.P., Cervantes I., Goyache F. 2009. Improving the estimation of realised effective population sizes in farm animals. *Journal of Animal Breeding and Genetics.*, 126, 327-32. 10.1111/j.1439-0388.2009.00810.x.
 52. Hall T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* 41:95-98.
 53. Haworth K., Putt W., Cattanaach B., Breen M., Binns M., Lingaas P., Edwards Y.H. 2001. Canine homolog of the T-box transcription factor T. failure of the protein to bind to its DNA target leads to a short-tail phenotype *Mammalian Genome* 12:212-218, 2001. DOI: 10.1007/s003350010253.

54. Hedrick P., Kalinowski S. 2000. Inbreeding Depression in Conservation Biology. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 25. 139-62. [10.1146/annurev.ecolsys.31.1.139](https://doi.org/10.1146/annurev.ecolsys.31.1.139).
55. Henson E.L., 1990. The organization of live animal preservation programmes. *FAO Anim. Prod. Health Paper* 80: 103–117.
56. Hillström A., Tvedten H., Rowe A., Giger U. 2011. Hereditary phosphofructokinase deficiency in Wachtelhunds. *Journal of the American Animal Hospital Association*, 47(2), 145–150. <https://doi.org/10.5326/JAAHA-MS-5619>.
57. Horoszewicz E., Król M., Niedziółka R., Sweklej E. 2015. Preliminary analysis of biometrics of Siberian Husky dogs. *Acta Sci. Pol. Zootechnica*, 14(2), 109–120.
58. Hytönen M.K., Grall A., Hédan B., Dréano S., Seguin S.J., Delattre D., Thomas A., Galibert F., Paulin L., Lohi H., Sainio K., André C. 2009. Ancestral T-box mutation is present in many, but not all, short-tailed dog breeds. *J.Hered.* 100:236-40,. DOI: [10.1093/jhered/esn085](https://doi.org/10.1093/jhered/esn085).
59. Inal Gultekin G., Raj K., Lehman S., Hillström A., Giger U. 2012. Missense mutation in PFKM associated with muscle-type phosphofructokinase deficiency in the Wachtelhund dog. *Mol. Cell. Probes.* 26:243-7, DOI: [10.1016/j.mcp.2012.02.004](https://doi.org/10.1016/j.mcp.2012.02.004).
60. Indrebø, A., Langeland, M., Juul, H.M., Skogmo, H.K., Rengmark, A.H., Lingaas, F. 2008. A study of inherited short tail and taillessness in Pembroke Welsh corgi. *J. Small Anim. Pract.* 49:220-4.. DOI: [10.1111/j.1748-5827.2007.00435.x](https://doi.org/10.1111/j.1748-5827.2007.00435.x).
61. James J.W., 1977. A note on selection differentials and generation length when generations overlap. *Anim. Prod.* 24:109-112.
62. Janeczek M., Wojnar M., Chrószcz A., Pospieszny N. 2004. Charakterystyka morfologiczna psów rasy americanstaffordshire terier na terenie Dolnego Śląska i Wielkopolski na podstawie wybranych parametrów morfometrycznych. *Acta Scientiarum Polonorum. Seria Medicina Veterinaria*.3, 29-35.
63. Jarne P., Lagoda P. J. 1996. Microsatellites, from molecules to populations and back. *Trends in ecology & evolution*, 11(10), 424–429. [https://doi.org/10.1016/0169-5347\(96\)10049-5](https://doi.org/10.1016/0169-5347(96)10049-5).
64. Jarausch A., von Thaden A., Sin T., Corradini A., Pop M. I., Chiriac S., Gazzola A., Nowak C. 2023. Assessment of genetic diversity, population structure and wolf-dog hybridisation in the Eastern Romanian Carpathian wolf population. *Scientific reports*, 13(1), 22574. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-48741-x>.

65. Kaelin C. B., Barsh G. S. 2010. Genetics of pigmentation in dogs and cats. *Annual Review of Animal Biosciences*, 1, 125–156.
66. Kalinowski S.T., Taper M.L., Marshall T.C. 2007. Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. *Molecular Ecology*, 16(5), 1099–1106. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2007.03089.x>.
67. Kania-Gierdziewicz J., 2006. Analiza struktury genetycznej – udział założycieli w puli genów populacji. *Wiadomości Zootechniczne*, R.XLIV, 2, 27-34.
68. Klub-Komisja Polskiego Spaniela Myśliwskiego przy ZG ZKwP, 2021a, Biuletyn newsletter poświęcony rasie polski spaniel myśliwski, *Spis Hodowli Polskich Spanieli Myśliwskich*, 1.
69. Klub-Komisja Polskiego Spaniela Myśliwskiego przy ZG ZKwP, 2021b, Biuletyn newsletter poświęcony rasie polski spaniel myśliwski, *Spis Hodowli Polskich Spanieli Myśliwskich*, 29.
70. Klub-Komisja Polskiego Spaniela Myśliwskiego przy ZG ZKwP, 2022, Biuletyn newsletter poświęcony rasie polski spaniel myśliwski, *Spis Hodowli Polskich Spanieli Myśliwskich*, 9.
71. Klub-Komisja Polskiego Spaniela Myśliwskiego przy ZG ZKwP, 2023, Biuletyn newsletter poświęcony rasie polski spaniel myśliwski, *Spis Hodowli Polskich Spanieli Myśliwskich*, 55.
72. Kobryńczuk F., Borkowski T. 1999. Biometria jako dodatkowe kryterium w ocenie wartości rasowej psa, *Pies*, 4 (275): 4–5.
73. Kopaliani N., Shakarashvili M., Gurielidze Z., Qurkhuli T., Tarkhnishvili D. 2014. Gene flow between wolf and shepherd dog populations in Georgia (Caucasus). *The Journal of heredity*, 105(3), 345–353. <https://doi.org/10.1093/jhered/esu014>.
74. Kopelman N.M., Mayzel J., Jakobsson M., Rosenberg N.A., Mayrose I. 2015. Clumpak: a program for identifying clustering modes and packaging population structure inferences across K. *Molecular ecology resources*, 15(5), 1179–1191. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12387>.
75. Kuznetsova T., Iwabe S., Boesze-Battaglia K., Pearce-Kelling S., Chang-Min Y., McDaid K., Miyadera K., Komaromy A., Aguirre G.D. 2012. Exclusion of RPGRIP1 ins44 from primary causal association with early-onset cone-rod dystrophy in dogs. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 53:5486-501. DOI: 10.1167/iovs.12-10178.

76. Lacy R.C., 1989. Analysis of founder representation in pedigrees: Founder Equivalents and Founder Genome Equivalents. *Zoo Biology* 8, 111-123.
77. Lacy R.C. 1995. Clarification of genetic terms and their use in the management of captive populations. *Zoo Biology*, 14(6), 565–578.
78. Letko A., Minor K.M., Jagannathan V., Seefried F., Mickelson J., Oliehoek P., Drögemüller C. 2020. Genomic diversity and population structure of the Leonberger dog breed. *Genet SelEvol* 52, 61 (<https://doi.org/10.1186/s12711-020-00581-3>).
79. Leroy G. 2011. Genetic diversity, inbreeding and breeding practices in dogs: Results from pedigree analyses, *The Veterinary Journal*, 189(2), 177-182, <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2011.06.016>.
80. Leroy G. 2014. Inbreeding depression in livestock species: Review and meta-analysis. *Animal Genetics*, 45(5), 618–628. <https://doi.org/10.1111/age.12178>
81. Leroy G., Phocas F., Hedan B., Verrier E., Rognon X. 2015. Inbreeding impact on litter size and survival in selected canine breeds, *The Veterinary Journal*, 203, 1, 74-78, <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2014.11.008>.
82. Lewis T.W., Abhayaratne B., Blott S.C. 2015. Trends in genetic diversity for all Kennel Club registered pedigree dog breeds. *Canine Genet Epidemiol* 2, 13. <https://doi.org/10.1186/s40575-015-0027-4>.
83. Lhériveau E., Libeau L., Stieger K., Deschamps J.Y., Mendes-Madeira A., Provost N., Lemoine F., Mellersh C., Ellinwood N.M., Cherel Y., Moullier P., Rolling F. 2009. The RPGRIP1-deficient dog, a promising canine model for gene therapy. *Mol. Vis.* 15:349-61.
84. Lhériveau E., Petit L., Weber M., Le Meur G., Deschamps J. Y., Libeau L., Mendes-Madeira A., Guihal C., François A., Guyon R., Provost N., Lemoine F., Papal S., El-Amraoui A., Colle M. A., Moullier P., Rolling F. 2014. Successful gene therapy in the RPGRIP1-deficient dog: a large model of cone-rod dystrophy. *Molecular therapy: the journal of the American Society of Gene Therapy*, 22(2), 265–277. <https://doi.org/10.1038/mt.2013.232>.
85. Li YL, Liu JX. 2018. StructureSelector: A web based software to select and visualize the optimal number of clusters using multiple methods. *Molecular Ecology Resources*, 18:176–177.
86. Łakomik-Kaszuba G. 2016. Polski płochacz. *Łowiec Polski*, 12, 36-39.

87. Łakomik-Kaszuba G. 2021. Płochacz z Polski rodem cz.I; Biuletyn newsletter poświęcony rasie polski spaniel myśliwski. 4-5.
88. Łakomik-Kaszuba G. 2022. Płochacz z Polski rodem cz.II; Biuletyn newsletter poświęcony rasie polski spaniel myśliwski. 4-5.
89. Maijala K. 1990. Establishment of a World Watch List for Endangered Livestock Breeds. *FAO Anim. Prod. Health Paper* 80: 167–184.
90. Malécot, G. 1948. *Les mathématiques de l'hérédité*. Masson, Paris.
91. MacCluer J., Boyce B., Dyke L., Weitzkamp D., Pfenning A., Parsons C. (1983). Inbreeding and pedigree structure in Standardbred horses. *Journal of Heredity*, 74, 394-399.
92. McCully K., Chance B., Giger U. 1999. In vivo determination of altered hemoglobin saturation in dogs with M-type phosphofructokinase deficiency. *Muscle Nerve*. May;22(5):621-7. doi: 10.1002/(sici)1097-4598(199905)22:5<621::aid-mus11>3.0.co;2-d.
93. Marshall T. C., Slate J., Kruuk L. E., Pemberton J. M. 1998. Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. *Molecular ecology*, 7(5), 639–655. <https://doi.org/10.1046/j.1365-294x.1998.00374.x>.
94. Mellersh C.S., Bourns M.E., Pettitt L., Ryder E.J., Holmes N.G., Grafham D., Forman O.P., Sampson J., Barnett K.C., Blanton S., Binns M.M., Vaudin M. 2006. Canine RPGRIP1 mutation establishes cone-rod dystrophy in miniature longhaired dachshunds as a homologue of human Leber congenital amaurosis. *Genomics* 88:293-301. DOI: 10.1016/j.ygeno.2006.05.004.
95. Mhaskar Y., Harvey J.W., Dunaway G.A., 1992. Developmental changes of 6-phosphofructo-1-kinase subunit levels in erythrocytes from normal dogs and dogs affected by glycogenstorage disease type VII. *Comp BiochemPhysiol* 101B:303,
96. Miyadera K., Kato K., Aguirre-Hernández J., Tokuriki T., Morimoto K., Busse C., Barnett K., Holmes N., Ogawa H., Sasaki N., Mellersh C.S., Sargan D.R. 2009. Phenotypic variation and genotype-phenotype discordance in canine cone-rod dystrophy with an RPGRIP1 mutation. *Mol. Vis.* 15:2287-305.
97. Miyadera K., Acland G.M., Aguirre G.D. 2012 a. Genetic and phenotypic variations of inherited retinal diseases in dogs: the power of within- and across-breed studies. *Mamm. Genome* 23, 40–61. <https://doi.org/10.1007/s00335-011-9361-3>.

98. Miyadera K., Brierley I., Aguirre-Hernández J., Mellersh C.S., Sargan D. 2012b. Multiple mechanisms contribute to leakiness of a frameshift mutation in canine cone-rod dystrophy. *PLoS One* 7:e51598, DOI: 10.1371/journal.pone.0051598.
99. Miyadera K. 2014. Inherited retinal diseases in dogs: advances in gene/mutation discovery. *Dobutsu. Iden. Ikushu. Kenkyu.* 42:79-89, 2. DOI: [10.5924/abgri.42.79](https://doi.org/10.5924/abgri.42.79).
100. Molday R. S., Moritz O. L. 2015. Photoreceptors at a glance. *Journal of cell science*, 128(22), 4039–4045. <https://doi.org/10.1242/jcs.175687>.
101. Narfström K., Jeong M., Hyman J., Madsen R. W., Bergström, T. F. 2012. Assessment of hereditary retinal degeneration in the English springer spaniel dog and disease relationship to an RPGRIP1 mutation. *Stem cells international*, 685901. <https://doi.org/10.1155/2012/685901>.
102. Nicholas F.W., Tammen I. 2025. Sydney Informatics Hub. Mendelian Inheritance online in Animals (OMIA) <https://omia.org/>. <https://doi.org/10.25910/2AMR-PV70>.
103. Ott J. 1992. Strategies for characterizing highly polymorphic markers in human gene mapping. *Am. J. Hum. Genet.* 51: 283-290.
104. Östrander E. A., Sprague Jr. G.F., Rine J. 1993. Identification and characterization of dinucleotide repeat (CA)_n markers for genetic mapping in dog. *Genomics* 16(1):207-13. doi: 10.1006/geno.1993.1160.
105. Papaioannou V. E. 2001. T-box genes in development: from hydra to humans. *Int. Rev. Cytol.* 207, 1-70 10.1016/S0074-7696(01)07002-4.
106. Patnaik S. R., Raghupathy R. K., Zhang X., Mansfield D., Shu X. 2015. The Role of RPGR and Its Interacting Proteins in Ciliopathies. *Journal of ophthalmology*, 2015, 414781. <https://doi.org/10.1155/2015/414781>.
107. Perfilyeva A., Bessalova K., Bessalov S., Begmanova M., Kuzovleva Y., Zhaniyazov Z., Vishnyakova O., Nazarenko I., Perfilyeva Y., Khamdiyeva O., Bekmanov B. 2023. Kazakh national dog breed Tazy: What do we know?. 10.1371/journal.pone.0282041.
108. Pérez-Enciso M. 1995. Use of the uncertain relationship matrix to compute effective population size, *J. Anim. Breed. Genet.* 112: 333-340.
109. Pritchard J. K., Stephens M., Donnelly P. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155 (2), 945–959.
110. Polski Spaniel Myśliwski - Biuletyn Newsletter poświęcony rasie Polski Spaniel Myśliwski. 2021. Klub-Komisja Polskiego Spaniela Myśliwskiego, 29.

111. Polski Spaniel Myśliwski - Biuletyn Newsletter poświęcony rasie Polski Spaniel Myśliwski. 2022. Klub- Komisja Polskiego Spaniela Myśliwskiego, 9.
112. Polski Spaniel Myśliwski - Biuletyn Newsletter poświęcony rasie Polski Spaniel Myśliwski. 2023. Klub- Komisja Polskiego Spaniela Myśliwskiego, 55.
113. Polski Spaniel Myśliwski - Biuletyn Newsletter poświęcony rasie Polski Spaniel Myśliwski. 2024. Klub- Komisja Polskiego Spaniela Myśliwskiego, 90.
114. Polski Związek Hodowców Koni. 2020. Program hodowli koni rasy polski koń zimnokrwisty. Warszawa, 26-28.
115. Pullig, T. 1957. Brachyury in Cocker Spaniels Journal of Heredity. 48:75-76.
116. Radko A., Rubiś D., Szumiec A. 2017. Analysis of microsatellite DNA polymorphism in the Tatra Shepherd Dog. Journal of Applied Animal Research. 46. 1-3. 0.1080/09712119.2017.1292912.
117. Remans K., Bürger M., Vetter I. R., Wittinghofer A. 2014. C2 domains as protein-protein interaction modules in the ciliary transition zone. Cell reports, 8(1), 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.05.049>.
118. Ripolles-Garcia A., Murgiano L., Ziolkowska N., Marinho F.P., Roszak K., Iffrig S., Aguirre G.D., Miyadera K.. 2023. Natural disease history of a canine model of oligogenic RPGRIP1-cone-rod dystrophy establishes variable effects of previously and newly mapped modifier loci. Hum. Mol. Genet. 32:2139-2151. DOI: 10.1093/hmg/ddad046.
119. Saitou N., Nei M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. Molecular biology and evolution, 4(4), 406–425. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040454>
120. Sasimowski E., 1959. Technika pomiarów biometrycznych koni. Med. Weter. 15 (8), 530-534.
121. Schoenebeck J. J., Ostrander E. A. 2014. The genetics of canine skull shape variation. *Genetics*, 197(3), 795–808.
122. Sechrest E. R., Murphy J., Senapati S., Goldberg A. F. X., Park P. S., Kolandaivelu S. 2020. Loss of PRCD alters number and packaging density of rhodopsin in rod photoreceptor disc membranes. ScientificReports, 10(1), 17885. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-74628-2>.
123. Serres-Armero A., Davis B. W., Povolotskaya I. S., Morcillo-Suarez C., Plassais J., Juan D., Ostrander E. A., Marques-Bonet T. 2021. Copy number variation underlies complex phenotypes in domestic dog breeds and other canids. Genome

- research, 31(5), 762–774. <https://doi.org/10.1101/gr.266049.120>.
124. Slavney A. J., Kawakami T., Jensen M. K., Nelson T. C., Sams A. J., Boyko A. R. 2021. Five genetic variants explain over 70% of hair coat pheomelanin intensity variation in purebred and mixed breed domestic dogs. *PloSone*, 16(5), e0250579. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0250579>.
125. Skrzyński G., Szymik B., 2024. Ocena wartości użytkowej buhajów ras mięsnych. *PZHiPBM, Ocena wartości użytkowej bydła ras mięsnych wyniki za rok 2023*, 64-69.
126. Smetanová M., Černá Bolfíková B., Randi E., Caniglia R., Fabbri E., Galaverni M., Kutal M., Hulva P. 2015. From Wolves to Dogs, and Back: Genetic Composition of the Czechoslovakian Wolfdog.
127. Smith B.F., Stedman H., Rajpurohit Y., Henthorn P.S., Wolfe J.H., Patterson D.F., Giger, U. 1996. Molecular basis of canine muscle type phosphofructokinase deficiency. *Journal of Biological Chemistry* 271:20070-20074, 8702726.
128. Snow D.H., Billeter R., Mascarello F., Carpena E., Rowleron A., Jenny E. 1982. No classical type IIB fibres in dog skeletal muscle. *Histochemistry*. 75(1):53–65. doi: 10.1007/BF00492533.
129. Spencer W. J., Pearing J. N., Salinas R. Y., Loiselle D. R., Skiba N. P., Arshavsky V. Y. 2016. Progressive Rod-Cone Degeneration (PRCD) Protein Requires N-Terminal S-Acylation and Rhodopsin Binding for Photoreceptor Outer Segment Localization and Maintaining Intracellular Stability. *Biochemistry*, 55(36), 5028–5037. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.6b00489>.
130. Spencer W.J., Arshavsky V.Y. 2019. PRCD is a small disc-specific rhodopsin-binding protein of unknown function. *Adv Exp Med Biol* 1185:531-535. DOI: 10.1007/978-3-030-27378-1_87.
131. Spencer W.J., Ding J.D., Lewis T.R., Yu C., Phan S., Pearing J.N., Kim K.Y., Thor A., Mathew R., Kalnitsky J., Hao Y., Travis A.M., Biswas S.K., Lo W.K., Besharse J.C., Ellisman M.H., Saban D.R., Burns M.E., Arshavsky V.Y. 2019. PRCD is essential for high-fidelity photoreceptor disc formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 116:13087-13096. DOI: 10.1073/pnas.1906421116.
132. Stach K., Kwiatkowska D. 2004. Ludzki izoenzym fosfofruktokinazy mięśniowej (PFK-M) i schorzenia związane z jego niedoborem. *Adv. Clin. Exp. Med.*, 13, 4, 663–668.

133. Sundqvist A.K., Ellegren H., Olivier M., Vilà C. 2001. Y chromosome haplotyping in Scandinavian wolves (*Canis lupus*) based on microsatellite markers. *Molecular Ecology* 10(8):1959-66 DOI: 10.1046/j.1365-294X.2001.01326.x
134. Sutter N. B., Mosher D. S., Gray M. M., Ostrander E. A. 2008. Morphometrics within dog breeds are highly reproducible and dispute Rensch's rule. *Mammalian Genome: official journal of the International Mammalian Genome Society*, 19(10-12), 713–723. <https://doi.org/10.1007/s00335-008-9153-6>.
135. Ściesiński K. 2002. Charakterystyka współczesnej populacji polskiego owczarka podhalańskiego [cz.II], *Przegląd Hodowlany*, 70 (07), 20-25.
136. Takahasi S., Miyahara K., Ishikawa H., Ishiguro N., Suzuki M. 2002. Lineage classification of canine inheritable disorders using mitochondrial DNA haplotypes. *The Journal of veterinary medical science*, 64(3), 255–259. <https://doi.org/10.1292/jvms.64.255>.
137. Takanosu M. 2017. Different allelic frequency of progressive rod-cone degeneration in two populations of Labrador Retrievers in Japan. *J Vet Med Sci* 79:1746-1748, 2017. DOI: 10.1292/jvms.17-0243.
138. Tamura K., Stecher G., Kumar S. 2021 MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 11. *Molecular Biology and Evolution* 38:3022-3027.
139. Tarui S., Okuno G., Ikura Y.T., Tanaka Y., Suda M., Nishikawa M., 1965, Phosphofructokinase deficiency in skeletal muscle. A new type of glycogenosis. *BiochemBiophys Res Com Biochemical and Biophysical Research Communications*, 19, 14; 517–523 [https://doi.org/10.1016/0006-291X\(65\)90156-7](https://doi.org/10.1016/0006-291X(65)90156-7).
140. Tereba Z., Tereba A., 2005: ALFREQ soft-ware.
141. Thompson J. D., Higgins D. G., Gibson T. J. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic acids research*. 22(22), 4673–4680. <https://doi.org/10.1093/nar/22.22.4673>
142. Tkaczyk A., Kowal K., Ślaska B. 2020. Mitochondrial D-loop informative SNPs in identification of dog's breed. *Medycyna Weterynaryjna*, 76(05), 6394-2020. <https://doi.org/10.21521/mw.6394>.
143. Turney C., Chong N.H., Alexander R.A., Hogg C.R., Fleming L., Flack D., Barnett K.C., Bird A.C., Holder G.E., Luthert P.J. 2007. Pathological and electrophysiological features of a canine cone-rod dystrophy in the miniature

- longhaired dachshund. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 48:4240-9. DOI: 10.1167/iovs.04-0737.
144. Wayne R. K., Ostrander E. A. 1999. Origin, genetic diversity, and genome structure of the domestic dog. *BioEssays*, 21(3), 247–257.
 145. Wellmann R., Pfeiffer I. 2009. Pedigree analysis for conservation of genetic diversity and purging. *Genetics Research.* 91(3):209–19. doi:10.1017/S0016672309000202.
 146. Wilson V., Conlon F. L. 2002. The T-box family. *Genome biology*, 3(6),. <https://doi.org/10.1186/gb-2002-3-6-reviews3008>.
 147. Wrigth S. 1922. Coefficients of inbreeding and relationship. *The American Naturalist*, 6(645), 330–338. <https://doi.org/10.1086/279872>.
 148. Wright S. 1931. Evolution in mendelian populations. *Genetics.* 16, 97-159.
 149. van Boom K.M., Schoeman J.P., Steyl J.C.A., Kohn T.A. 2023. Fiber type and metabolic characteristics of skeletal muscle in 16 breeds of domestic dogs. *Anat. Rec. (Hoboken)*.306(10):2572-2586. doi: 10.1002/ar.25207
 150. Vaysse A., Ratnakumar A., Derrien T., Axelsson E., Rosengren Pielberg G., Sigurdsson S., Fall T., Seppälä E. H., Hansen M. S., Lawley C. T., Karlsson E. K., Lupa Consortium, Bannasch D., Vilà C., Lohi H., Galibert F., Fredholm M., Häggström J., Hedhammar A., André C., Webster M. T. 2011. Identification of Genomic Regions Associated with Phenotypic Variation between Dog Breeds using Selection Mapping. *PLOS Genetics* 7(10): e1002316. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002316>.
 151. Verscheure S., Backeljau T., Desmyter S. 2013. Reviewing population studies for forensic purposes: Dog mitochondrial DNA. *ZooKeys*, (365), 381–411. <https://doi.org/10.3897/zookeys.365.5859>
 152. Vilà C. Savolainen P., Maldonado J., Amorim I., Rice J., Honeycutt R., Crandall K., Lundeberg J., Wayne R.. 1997. Multiple and Ancient Origins of the Domestic Dog. *Science (New York, N.Y.)*. 276. 1687-9. 10.1126/science.276.5319.1687.
 153. Vladimir D., Marko R., Ljubodrag S., Darko D., Milivoje U., Umit O., Zoran S. 2020. Use of Microsatellites in Genetic Diversity Assessment, Parentage Testing and Individual Identification of the Kangal Shepherd Dog. *Acta Veterinaria*, 70(2), 2020. 170-181. <https://doi.org/10.2478/acve-2020-0012>.
 154. Vora S. 1983. Isozymes of human phosphofructokinase: biochemical and genetic aspects. *Isozymes*, 11, 3–23.

155. Yoo D., Kim K., Kim H., Cho S., Kim J.N., Lim D., Choi S.G., Choi B.H., Kim H. 2017. The genetic origin of short tail in endangered Korean dog, Dong Gyeong. *Sci Rep* 7:10048, 2017. DOI: 10.1038/s41598-017-10106-6.
156. Zangerl, B., Goldstein, O., Philp, AR., Lindauer, SJ., Pearce-Kelling, SE., Mullins R.F., Graphodatsky A.S., Ripoll D., Felix J.S., Stone E.M., Acland G.M., Aguirre G.D. 2006. Identical mutation in a novel retinal gene causes progressive rod-cone degeneration in dogs and retinitis pigmentosa in humans. *Genomics*. 88:551-563. DOI: 10.1016/j.ygeno.2006.07.007.
157. Zierath S., Hughes A. M., Fretwell N., Dibley M., Ekenstedt K. J. 2017. Frequency of five disease-causing genetic mutations in a large mixed-breed dog population (2011-2012). *PloS one*, 12(11), e0188543. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0188543>.
158. Związek Kynologiczny w Polsce. 2028. *Pies*, 1, 58.
159. Związek Kynologiczny w Polsce. 2019. *Pies*, 1, 58.
160. Związek Kynologiczny w Polsce. 2020. *Pies*, 1, 57.
161. Związek Kynologiczny w Polsce. 2021. *Pies*, 2, 58.
162. Związek Kynologiczny w Polsce. 2022. *Pies*, 1, 57.
163. Związek Kynologiczny w Polsce. 2023. *Pies*, 1, 58.
164. Związek Kynologiczny w Polsce. 2024. *Regulaminu Hodowli Psów Rasowych*, 5-6.
165. Związek Kynologiczny w Polsce. 2025. *Paryż – doroczna konferencja Komisji FCI do spraw Hodowli*, 21-23.02.2025. 48-49.

Akty prawne:

1. Uchwała nr 233/220 ZG PZŁ z dn. 15.09.2020 <https://klubpsmpzl.pl/wp-content/uploads/2022/12/statut-klubu-psm-pzl.pdf> data dostępu 10.07.2025
2. Uchwała ZG ZKwP z dn. 14.09.2016 <http://www.zkwp.pl/1.tmp/index.php/aktualnosci.html> data dostępu 20.05.2021
3. Uchwała ZG ZKwP z dn. 01.12.2016 <https://www.zkwp.pl/aktualnosci.php?a=uzg> data dostępu 20.05.2022
4. Uchwała ZG ZKwP z dn. 09.08.2022 <https://www.zkwp.pl/aktualnosci.php?a=uzg> data dostępu 1.12.2022
5. Uchwała ZG ZKwP z dn. 18.02.2023 <https://www.zkwp.pl/aktualnosci.php?a=uzg> data dostępu 07.07.2025

6. Uchwała ZG ZKwP z dn. 02.07.2024 <https://www.zkwp.pl/aktualnosci.php?a=uzg> data dostępu 07.07.2025
7. Uchwała ZG ZKwP z dn. 31.10.2024 <https://www.zkwp.pl/aktualnosci.php?a=uzg> data dostępu 07.07.2025
8. Uchwała ZG ZKwP z dn. 04.04.2025 <https://www.zkwp.pl/aktualnosci.php?a=uzg> data dostępu 07.07.2025

Strony internetowe i program komputerowe:

1. <https://embarkvet.com> data dostępu: 10.09.2025
2. <https://omia.org/home/> data dostępu: 14.06.2025
3. <https://www.isag.us/Docs/AppGenCompAnim2019.pdf> data dostępu: 10.09.2025
4. <https://www.klubspaniela.pl/polski-spaniel-mysliwski> data dostępu: 28.06.2025
5. <https://www.omim.org/entry/610681> data dostępu: 05.06.2025
6. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/403849> data dostępu : 05.06.2025
7. <https://www.thekennelclub.org.uk/about-us/campaigns/150-years-of-the-kennel-club/the-kennel-club-timeline-1800s/> data dostępu: 15.09.2025
8. <https://www.uniprot.org/uniprotkb/P52784/entry> data dostępu : 05.06.2025
9. <https://www.zkwp.pl/wzorce/5.pdf> data dostępu: 28.06.2025
10. <https://www.zkwp.pl/wzorce/95.pdf> data dostępu: 28.06.2025
11. <https://www.zkwp.pl/wzorce/104.pdf> data dostępu: 28.06.2025
12. <https://www.zkwp.pl/wzorce/125.pdf> data dostępu: 28.06.2025
13. https://www.zkwp.pl/wzorce/1002_PL.pdf data dostępu: 28.06.2025
14. Chromas version 2.6.6 (2018), Technelysium Pty Ltd, South Brisbane, Queensland, Australia.
15. FCI Model Standard General Committee 2016, <https://www.fci.be/medias/FCI-REG-RGT-STA-MOD-ANN-006-en-12533.docx> data dostępu: 21.09.2025
16. FCI Procedure for the international recognition of a breed (provisional & definitive). 2019. FCI, Internal Rules of the FCI, Enclosure 5. (<https://www.fci.be/en/FCI-Internal-Rules-4774.html>), data dostępu 10.07.2025
17. FCI Procedure for the international recognition of a breed (provisional & definitive). 2019. FCI, Internal Rules of the FCI, Enclosure 5a. (<https://www.fci.be/en/FCI-Internal-Rules-4774.html>), data dostępu 10.07.2025
18. FCI Procedure for the international recognition of a breed (provisional & definitive). 2019. FCI, Internal Rules of the FCI, Enclosure 5b. (<https://www.fci.be/en/FCI-Internal-Rules-4774.html>) data dostępu 10.07.2025

19. Genetics Committee of the American College of Veterinary Ophthalmologists. 2023. The Blue Book: Ocular disorders presumed to be inherited in purebred dogs. 15th Edition <https://ofa.org/wp-content/uploads/2024/05/ACVO-Blue-Book-2023.pdf>.
20. GenoPro 2020, *GenoPro genealogy software*,
21. <http://www.genopro.com/> data dostępu: 10.10.2025
22. StatSoft, Inc. (2015). *STATISTICA (data analysis software system), version 13*. Tulsa, OK: StatSoft, Inc.

13. Aneks

Załącznik I.

Kwestionariusz zdrowia. Druk FCI - Regulamin Wewnętrzny FCI załącznik 5a

HEALTH ISSUES	
for the provisional and definitive international recognition by the FCI of a new breed	
(Breed name in the country of origin)	
<i>This questionnaire must be filled in as one of the pre-requisites for the provisional and definitive international recognition of a new breed by the FCI.</i> <i>The following questions aim at describing prevalence of diseases and causes of death in a population of dogs considered for provisional and final international recognition as a breed.</i>	
Are there any published reports on health and diseases in the population?	
☐ No	
☐ Yes (please <u>ATTACH</u> report)	
Are there any population-based data available on morbidity and or mortality?	
☐ No	
☐ Yes (please <u>ATTACH</u> data from health surveys or insurance claims)	
Are there any results available on programmes for the detection and/or control of hereditary, congenital and acquired diseases based on phenotype and on the recording of such results?	
Hip Dysplasia	☐ No
	☐ Yes (please <u>ATTACH</u> any reports/data available)
Elbow Dysplasia	☐ No
	☐ Yes (please <u>ATTACH</u> any reports/data available)
Hereditary eye defects	☐ No
	☐ Yes (please <u>ATTACH</u> any reports/data available)
Patellar Luxation	☐ No
	☐ Yes (please <u>ATTACH</u> any reports/data available)
Cardiovascular diseases	☐ No
	☐ Yes (please <u>ATTACH</u> any reports / data available)
Brachycephalic Obstructive Airway Syndrome (BOAS)	☐ No
	☐ Yes (please <u>ATTACH</u> available data, and the report adding the classification/scheme with which said evaluation was performed)
Any other Orthopaedic diseases (e.g. Osteochondritis dissecans, transitional lumbosacral vertebrae, and spondylosis)	☐ No
	☐ Yes (please <u>ATTACH</u> available data, and the report adding the classification/scheme with which said evaluation was performed)
Any other inherited diseases	☐ No
	☐ Yes (please describe and <u>ATTACH</u> any reports / data available)
Are there any data available on molecular genetic testing (and their results) concerning hereditary malformations?	
Inherited diseases	☐ No
	☐ Yes (please <u>ATTACH</u> any reports/data available)
Are there any other information about diseases affecting individuals in the population?	
☐ No	
☐ Yes (please <u>ATTACH</u>)	

Załącznik II.

Kwestionariusz oceny zachowania i charakteru. Druk FCI Regulamin Wewnętrzny
FCI - załącznik 5b

Evaluation on BEHAVIOUR /TEMPERAMENT and UTILIZATION for the international provisional and definitive recognition of a new breed by FCI <i>(Breed name in the country of origin)</i>		
<i>This questionnaire must be filled in as one of the pre-requisites for the provisional and definitive international recognition of a new breed by the FCI.</i> <i>The following questions aim at describing the expected behaviour/temperament, working skills, etc., in a population of dogs considered for provisional and definitive international recognition as a breed.</i>		
Give a verbal description of the expected <u>BEHAVIOUR/TEMPERAMENT</u> and <u>UTILIZATION</u> of the breed:		
BEHAVIOUR/TEMPERAMENT:		
<i>(Text must not state aggressiveness / acute wariness of people or severe aloofness as a breed feature. Breeds must behave calmly and not present any threat to the judge or to any person or dog in public areas.)</i>		
UTILIZATION:		
<i>(What the breed is - or has been - used for. Should be a short presentation, only on utilization. Behaviour/Temperament should be described separately under the appropriate heading)</i>		
What is the expected use of the breed?		
☐ Family dog	☐ Hunting dog	
☐ Sledge dog	☐ Guarding dog	
☐ Sheepdog	☐ Cattle dog	
☐ Working dog	☐ Water dog	
☐ Sighthound		
☐ Other (please describe)		
Are there any <u>published reports on behaviour/temperament</u> in the population?		
☐ No		
☐ Yes (please report)		
Are there any <u>results available about behaviour/temperament tests</u> in the population?		
☐ No		
☐ Yes (please report)		
Are there any <u>results available about working tests</u> in the population?		
☐ No		
☐ Yes (please report)		

Załącznik III.

Wzorzec rasy polski spaniel myśliwski (https://www.zkwp.pl/wzorcowe/1002_PL.pdf).

Zachowano oryginalny układ wzorcu rasy (z wyjątkiem kilku rycin, które zmniejszono i ułożono obok siebie), oraz pogrubioną czcionkę, która ma wskazywać na zmiany zatwierdzone uchwałą Zarządu Głównego ZKWP z dn. 2 lipca 2024r.

„Nazwa rasy: POLSKI SPANIEL MYŚLIWSKI

(Polish Hunting Spaniel, Epagneul du Chasse Polonais, Polnische Jagd Spaniel, Spaniel de Caza Polaco)



Ilustracji nie należy uznawać za przedstawienie idealnego egzemplarza rasy

Kraj pochodzenia: Polska.

Data publikacji obowiązującego standardu: 01.12. 2016.

Data publikacji pierwszej aktualizacji standardu: 02.07.2024 r.

Klasyfikacja FCI: propozycja - Grupa VIII: Aportery, płochacze i psy dowodne.

Sekcja: 2: Płochacze.

Podlega próbom pracy*

Użytkowanie: Średniej wielkości, żywy, zrównoważony pies, wspaniały towarzysz spacerów, trzyma się właściciela, chętnie buszuje w szuwarach, trawach i zaroślach utrzymując kontakt z przewodnikiem. W łowiectwie wykorzystywany jako płochacz.

Krótki rys historyczny: Pierwsze wzmianki w polskiej literaturze o polowaniu ze spanielami pochodzą z XIX wieku. Spaniele polowały z pieszym myśliwym, towarzyszyły w spacerach i tzw. polowaniu na upatrzonego, bobrowały za kaczkami i aportowały zdobycz. Różne rasy spanieli były sprowadzane na tereny ówczesnej Polski, przy okazji importów gończych francuskich i angielskich do polowań par force. Były to głównie użytkowe springery, cockery, pojedyncze sussexy i field spaniele.(...)

W programie hodowlanym, prowadzonym od lat **80-tych** XX wieku polskie spaniele selekcionowano pod względem zdolności do pracy **węchowej, wytrzymałości (również w strumieniach, rzekach i zbiornikach wodnych)**, temperamentu i pasji łowieckiej oraz eksterieru.

Wygląd ogólny: Są to psy średniej wielkości o zwartej budowie świadczącej o dużej ruchliwości oraz odporności na trudne warunki pracy głównie na polach, łąkach, w szuwarach, na błotach i wodzie. Pies o dość grubym kośćcu kończyn, zwisających uszach pokrytych frędzlami dłuższych włosów a także piórem na ogonie, brzuchu i z tyłu nóg. Charakterystyczny jest **różnej długości biały koniec ogona**.



Sylwetka psa



Sylwetka suki

Ważne proporcje: Pies **średniego** wzrostu (co pozwala mu poruszać się niepostrzeżenie w gęstych krzakach i wysokich trawach), o sylwetce prostokątnej, wysokość w kłębie do długości tułowia jest 9:10 - 12. Suki mogą być nieco dłuższe. Stosunek długości kufy do długości czaszki wynosi jak 1:1. Długość kończyn od podłoża do łokcia równa się połowie wysokości w kłębie. Średniej długości szyję optycznie przedłuża wyraźnie widoczny kłęb.



Młoda suka sylwetka

Zachowanie/ temperament: Zrównoważony i opanowany. Jest psem odważnym, aktywnym w pracy. Doskonale, niezmordowanie pracuje w trudnym terenie i w wodzie. Jest inteligentny i łatwy w szkoleniu. Przykuca, czołga się i podpełza, gdy zwęszy ptaki, które respektuje, aż myśliwy da znak. Wypłasza je szczekaniem i skokiem. Nie jest agresywny, ale może być nieufny w stosunku do obcych. Jest doskonałym psem myśliwskim, **rodzinnym**, dobrym kompanem na spacerach i dobrym stróżem. Bardzo lubi obcować z ludźmi i ze znanymi dziećmi.

Głowa: Szlachetna, dość duża, ale proporcjonalna do ciała

Mózgoczaszka: Tej samej długości co kufa, tylko lekko wypukła. Guz potyliczny dobrze wyrażony.

Stop: Występuje ale jest słabo zaznaczony.

Trzewioczaszka:

Nos: **Brązowy** o dużej trufli nosa wystającej przed wargę. Nozdrza ruchliwe i szeroko otwarte.

Kufa: Pełna, głęboka i dość tępo zakończona. Grzbiet nosa prosty. Okolica podoczołowa dobrze wypełniona i ładnie wymodelowana.

Wargi: Górna mięsista, lekko obwisła, całkowicie pokrywająca dość suchą dolną wargę. Kąt wargowy dobrze wyrażony, z wyraźną fałdą.

Szczęki/ uzębienie: Zęby białe, dość duże, szczęki dość szerokie o prawie równoległych odpowiadających sobie szeregach zębów przedtrzonowych i trzonowych, przy siekaczach ustawionych w lekko zaokrąglonym łuku. Zgryz naturalny (nożycowy i dopuszczalny cęgowy). Pożądane, ale niewymagane pełne uzębienie.

Policzki: Dość suche, wypełnione z widoczną rzeźbą pod oczami, łagodnie przechodzące w dalszą część mózgowioczaski.

Oczy: Średniej wielkości, niezbyt głęboko osadzone w oczodole o kształcie trójkątnym lub migdałowym i przyjaznym wyrazie, bez widocznych białówek. W różnych odcieniach orzecha od ciemnego do jaśniejszego. Dość grube powieki ściśle przylegają do oczu.

Uszy: Zwisające, niezbyt szerokie u podstawy (równoległej do sklepienia czaszki), o **umiarkowanej** długości małżowiny sięgającej najczęściej do nosa, przylegają do policzków.

Osadzone są na wysokości zewnętrznego kąta oka lub nieco powyżej. Od podstawy małżowina się lekko poszerza do łagodnie zaokrąglonego końca. Ucho pokryte jest dość długim, miękkim, tworzącym frędzle włosem. Podczas pracy i nasłuchiwania uszy są ruchliwe i noszone nieco wyżej.



Głowa psa widok w przodu



Głowa psa widok z profilu



Głowa suki widok z przodu



Głowa suki widok z profilu

Szyja: Średniej długości, muskularna, o owalnym przekroju, dobrze wpasowana w klatkę piersiową o górnej linii przedłużonej kłębem. Skóra na szyi jest sucha, nie tworzy fałd ani łałoku w okolicy podgardla.

Tułów:

Górna linia: Płynna, bez załamań ani wyraźnych wzniesień.

Kłęb: Wyraźnie wyrażony, łagodnie przechodzący w szyję i grzbiet. U samców wyższy i bardziej zaznaczony **niż u suk.**

Grzbiet: Prosty, bez wklęśnięć ani wyniesień, dość szeroki i dobrze umięśniony.

Lędźwie: Szerokie, muskularne, dopuszczalne lekko wysklepione, średniej długości. U psów starszych, intensywnie **pracujących** grzbiet może być nieznacznie wklęsły.

Zad: Dość szeroki i muskularny, prosty lub bardzo łagodnie opadający do nasady ogona.

Klatka piersiowa: Głęboka (u dorosłych psów często sięgająca poniżej łokcia), o dość długim mostku, wyraźnie poszerzająca się do tyłu, bardzo pojemna o żebrach długich i skośnych. Długość tułowia wynika z długości klatki piersiowej **a nie z długości lędźwi.**

Linia dolna: Linia brzucha tylko lekko podkasana, boki wypełnione, słabizny

Ogon: Średniej długości, osadzony niezbyt wysoko, sięgający co najmniej do stawu skokowego, pokryty niezbyt gęstym włosem. **Charakterystyczny jest różnej długości biały koniec ogona.** Od spodu nieco dłuższa chorągiew tworząca rzadkie i niezbyt długie frędzle. W spokoju opuszczony i lekko wygięty w górę; w akcji **noszony nieco** powyżej linii grzbietu.

Kończyny:

Kończyny przednie: Oglądane od przodu są proste i równoległe względem siebie. Odległość od łokcia do podłoża równa połowie wysokości w kłębie

Łopatki: Dość krótkie i skośnie ustawione, dobrze umięśnione, dokładnie przylegają do ciała. Łopatki z ramieniem od frontu tworzą kąt lekko rozwarty.

Ramiona: Kości ramienne podobnej długości co łopatki lub krótsze, ustawione skośnie do tyłu. Wraz z łopatkami łagodnie zamykają boki klatki piersiowej.

Łokcie: Luźno przylegają do tułowia, nie są wciśnięte ani odstające, równoległe względem siebie i osi pośrodkowej ciała, stanowią początek równoległe ustawionych kości przedramion.

Przedramiona: Proste, suche, dość grube, bez zgrubień o owalnym przekroju, dłuższe od kości ramiennych.

Nadgarstki: Suche, zwarte i gładkie, bez nadmiernych zgrubień i śladów zniekształceń.

Śródrećza: Suche o grubości odpowiadającej nadgarstkom i kości przedramion, widziane z profilu są proste lub jedynie lekko nachylone do przodu.

Łapy: Palce **wyraźnie** długie, sprężyste, mało wysklepione z dużymi grubymi, elastycznymi i jędrnymi opuszkami. **Pazury grube, krótkie**. Na palcach i między nimi dłuższy włos tworzy „kapcie”.



Kończyny tylne: Widziane od tyłu proste, ustawione równoległe do siebie (linie łączące guz siedzeniowy i skokowy odpowiedniej strony). Oglądane z profilu są lekko odstawione do tyłu „za psem”, dobrze ukątowne.

Uda: Niezbyt długie, względem siebie i ciała ustawione szeroko, bardzo umięśnione.

Kolana: Stawy kolanowe suche i dobrze widoczne, kąt między udem a podudziem zaznaczony.

Podudzia: Długości kości odpowiadają udowym lub są krótsze, są dobrze umięśnione.

Stawy skokowe: Wyraźnie zaznaczone, suche, bez zgrubień. Kąt między podudziem a śródstopiem dobrze wyrażony.

Śródstopia: Średniej długości, suche, gładkie i sprężyste, prostopadle ustawione do podłoża.

Łapy: Zwarte, lekko owalne o palcach krótszych niż w kończynach przednich, tylko lekko wysklepionych i podobnie jak tamte sprężystych. Pazury grube, krótkie. Opuszki duże, grube, elastyczne i jędrne. Między palcami dłuższe włosy **tworzą „kapcie”**.

Chody: Ruch kończyn w kłusie powinien być swobodny, elastyczny w stawach, zwinny i równoległy. Kończyny poruszają się w sposób nieskrępowany stawiając dość długie kroki, ale nie powinny być wysoko unoszone nad ziemią. Ruch ma być ekonomiczny. Przy pracy z **przewodnikiem** pies ma zdolność poruszania się sprawnie i szybko nisko

nad ziemią na zgiętych nogach, również pełzając i przysiadając na ziemi w połączeniu z nagłymi zmianami kierunku, hamowaniem czy sprężystym skokiem.

Skóra: Niezbyt gruba, bez fałd i zmarszczek, nie tworzy podgardla, ściśle przylega do ciała i na całej swej powierzchni pokryta jest włosiem o różnej długości.

Szata:

Włos: Średniej długości z podszerstkiem, ale nie za długi na głowie i tułowiu. Włos jest prosty miękki, **dopuszczalny lekko falowany**, odporny na niepogodę, pokrywający całe ciało psa, przy czym jest dłuższy na uszach, zewnętrznych i tylnych stronach kończyn, przedpiersiu, dolnej stronie brzucha, fałdzie kolanowym i ogonie tworząc frędzle i odpowiednio „pióro”. Brak jest tendencji włosa do skręcania się czy tworzenie fal. **Niepożądany jest włos kędzierzawy.**

Umaszczenie: Ubarwienie okrywy włosowej to przesiane z różnej wielkości i kształtu łatami –kolor czekoladowy **przesiany, czekoladowy podpalany przesiany. Kolor czekoladowy** o różnym odcieniu. Psy czekoladowe z przewagą białych łat i niewielkim przesianiem są rzadziej spotykane, ale typowe. Przez podpalania rozumie się znaczenia płowe w określonych miejscach tj. nad oczami, na kufie, przedpiersiu, spodzie ogona oraz w dolnych partiach przednich i tylnych łap i przy odbycie. Podpalania rozlewające się na inne części ciała są wysoce niepożądane. Charakterystyczny jest biały koniec



Wzrost i ciężar:

Wysokość w kłębie: psy: 43 - 48 cm +/- 2 cm

suki: 42 - 44 cm +/- 2 cm

Ciężar: **Masa ciała proporcjonalna do wzrostu i budowy**

Wady: Wszelkie odchylenia od podanego wzorca powinny być uznawane za wady i oceniane w zależności od stopnia nasilenia oraz wpływu na zdrowie, komfort życia psa i jego zdolności użytkowe.

Wady dyskwalifikujące:

- nieuzasadniona agresja lub nadmierna lękliwość, - deformacje budowy lub zaburzenia charakteru, - brak typu wymaganego we wzorcu rasy.

Uwagi: - samce muszą mieć dwa, prawidłowo rozwinięte jądra, całkowicie opuszczone do moszny, - do hodowli mogą być użyte jedynie sprawne fizycznie i zdrowe psy, o budowie typowej dla rasy.”



Załącznik IV.

Wyszczególnienie wszystkich psów, które miały potomstwo wraz z ich liczbą.

Lp.	Nr osobnika według bazy rodowodowej	Liczba potomstwa (szt)	Lp.	Nr osobnika według bazy rodowodowej	Liczba potomstwa (szt)
1	31	63	18	55	5
2	67	36	19	348	5
3	79	28	20	2	4
4	54	25	21	94	3
5	98	22	22	153	3
6	77	12	23	200	3
7	102	10	24	290	3
8	157	10	25	322	3
9	15	9	26	402	3
10	59	8	27	73	2
11	122	8	28	91	2
12	132	8	29	426	2
13	66	7	30	47	1
14	313	7	31	84	1
15	133	6	32	87	1
16	362	6	33	99	1
17	9	5	34	282	1

Załącznik V.

Wyszczególnienie wszystkich suk, które miały potomstwo wraz z ich liczbą.

Lp.	Nr osobnika według bazy rodowodowej	Liczba potomstwa (szt)	Lp.	Nr osobnika według bazy rodowodowej	Liczba potomstwa (szt)	Lp.	Nr osobnika według bazy rodowodowej	Liczba potomstwa (szt)
1	25	23	33	50	6	65	195	3
2	14	17	34	101	6	66	196	3
3	116	17	35	121	6	67	204	3
4	109	16	36	37	5	68	218	3
5	28	14	37	78	5	69	242	3
6	61	14	38	141	5	70	295	3
7	13	13	39	148	5	71	300	3
8	36	13	40	167	5	72	315	3
9	104	12	41	186	5	73	356	3
10	24	11	42	199	5	74	1	2
11	57	11	43	223	5	75	18	2
12	21	10	44	280	5	76	53	2
13	56	10	45	292	5	77	83	2
14	75	10	46	386	5	78	127	2
15	80	10	47	7	4	80	326	2
16	27	9	48	26	4	81	376	2
17	142	9	49	113	4	82	4	1
18	22	8	50	119	4	83	8	1
19	39	8	51	143	4	84	11	1
20	71	8	52	151	4	85	60	1
21	120	8	53	305	4	86	82	1
22	138	8	54	6	3	87	85	1
23	154	8	55	38	3	88	111	1
24	17	7	56	42	3	89	117	1
25	64	7	57	62	3	90	147	1
26	74	7	58	63	3	91	175	1
27	128	7	59	88	3	92	227	1
28	161	7	60	89	3	93	239	1
29	176	7	61	92	3	94	245	1
30	181	7	62	103	3	95	310	1
31	232	7	63	135	3	96	329	1
32	19	6	64	166	3	97	435	1