

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: **Biologie**

Studijní obor: **Zoologie**



Bc. Lucie Buchtová

Příbuzenské vztahy a genový tok mezi plemeny kura domácího

Relatedness and gene flow between chicken breeds

Diplomová práce

Školitel: RNDr. Michal Vinkler Ph.D.

Konzultant: doc. Mgr. Pavel Munclinger Ph.D.

Praha 2016

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Plzni, 9. 8. 2016

.....
Lucie Buchtová

Abstrakt:

Kur domácí patří mezi druhy domácích zvířat s ohromnou hospodářskou a ekonomickou hodnotou. Vzhledem k těmto hodnotám je větší důraz kladen na jeho vysokoprodukční linie, které se svou produkcí jen těžko dají srovnávat se zájmovými liniemi či rurálními populacemi. Postupně díky upřednostňování většího výnosu zájmová plemena upadají do pozadí a zvyšuje se riziko ztráty genetické variability, kterou tato plemena disponují. Této problematice je však naštěstí v poslední době věnována poměrně velká pozornost, která vede ke snaze tyto zdroje genetické variability zachovat. Na vybraném vzorku 272 jedinců reprezentujících 33 zájmových plemen jsem hodnotila jejich míru variability pomocí analýzy dvaceti vybraných neutrálních markerů (kontrolní oblast mtDNA a 19 mikrosatelitových lokusů) a čtyř imunitních genů (TLR3, TLR4, TLR5, TLR7). U vybraných plemen bylo cílem zmapovat hrubý rámec původu moderních plemen mezi starobylými plemeny, identifikovat jejich možný geografický původ, porovnat míru neutrální a funkční variability mezi plemeny s mírou variability uvnitř plemen samotných a následně srovnat míru sdíleného polymorfismu (genového toku / ancestrálního polymorfismu) na neutrálních znacích a imunitních genech. Výsledky ukázaly, že je možné plemena geneticky rozlišit a pomocí detekce sdílených znaků identifikovat, z okruhu kterých starobylých plemen moderní plemena vychází, a jak jsou si vlastně jednotlivá plemena navzájem příbuzná. Všechna studovaná plemena náležela ke čtyřem mitochondriálním haplotypovým rodinám, z nichž nejběžnější byla rodina E1, jejímž předkem je pravděpodobně *G. g. murghi* ze severovýchodní Indie. Některá plemena nesla více mitochondriálních haplotypů. Genetická variabilita imunitních genů a mikrosatelitů byla vysoká. Asijská plemena vykazovala oproti evropským plemenům vyšší míru variability. Tento výsledek byl shodný jak na základě analýzy imunitních genů, tak neutrálních znaků. Porovnání genetické variability starobylých a moderních plemen nepřineslo jednoznačné výsledky. Variabilita mezi plemeny byla jen lehce vyšší v neutrálních markerech (32%) než v imunitních genech (27%), což nejspíše souvisí buďto s podobnou mírou ancestrálního polymorfismu anebo genovým tokem mezi plemeny. Míra sdíleného polymorfismu však byla výrazně vyšší u neutrálních markerů. Z celkového počtu 163 alel bylo pouze 41 alel mikrosatelitů privátních. Z tohoto výsledku vyplývá, že 74,8% alel bylo mezi plemeny sdíleno. Naopak u TLR bylo ze 154 detekovaných alel 101 privátních. Mezi plemeny tudíž bylo sdíleno pouze 34,4 % alel, což patrně vyplývá z vyšší genetické variability TLR v rámci jednotlivých lokusů.

klíčová slova: kur domácí, mikrosatelity, mitochondriální DNA, D-loop, příbuznost, genový tok, genetická variabilita, ancestrální polymorfismus

Abstract:

Domestic chickens are domestic animals with tremendous economic value. Due to this value, high-production lines have more important role for humans than fancy breeds and rural populations. Production traits of these high-production lines are not comparable with traditional breeds. The preference for larger profit gradually diminishes the importance of the traditional breeds, which leads to their replacement increasing the risk of loss of their genetic variability. Despite this trend, general awareness of this problem increases providing hope in saving these rich sources of genetic variation. We selected sample of 272 individuals representing 33 traditional (fancy) breeds. I evaluated the degree of variability through the analysis of twenty selected neutral markers (mtDNA control region and 19 microsatellite loci) and four immune genes (TLR3, TLR4, TLR5, TLR7). The main aims were: to map the origin of modern breeds between ancient breeds, identify the possible geographic origin of the breeds, to compare the rate of neutral and functional variation between breeds with the level of variation within breeds and to compare the degree of shared polymorphism (gene flow / ancestral polymorphism) of neutral markers and immune genes. The results show that we can genetically differentiate breeds and identify from the range of which ancient breeds modern chicken originate and how they are related to each other. All studied breeds belonged to four mitochondrial families, the most common family was E1, with a likely ancestor *G. g. murghi* from north-eastern India. Some breeds carry more mitochondrial haplotypes. Genetic variability of immune genes and microsatellites was high. Asian breeds showed a higher degree of variability than European breeds. We gained similar results by the analysis of immune genes and neutral markers. Differences in genetic variability of ancient and modern breeds were non-conclusive. Genetic variability among breeds was only slightly higher in neutral markers (32%) than in immune genes (27%). This result is most probably related either with a similar degree of ancestral polymorphism or gene flow between breeds. Rate of shared polymorphism was significantly higher in neutral markers. From a total of 163 alleles only 41 were private alleles. This result shows that 74.8% of alleles were shared between breeds. On the contrary, the TLR had 154 alleles in total and 101 alleles were private. Thus, the breeds shared only 34.4% of alleles, which likely results from higher genetic diversity of the TLR loci.

Keywords: chicken, microsatellites, mitochondrial DNA, D-loop, relatedness, gene flow, genetic variability, ancestral polymorphism

Obsah

1. Úvod.....	5
1.1 Studium genetiky a evoluce kura domácího.....	5
1.2 Domestikace kura domácího	7
1.2.1 Druhy kurů rodu <i>Gallus</i> žijící ve volné přírodě	7
1.2.2 Původ současných plemen kura domácího (<i>Gallus gallus f. domestica</i>)	8
1.2.3 Lokalizace domestikáčního centra kura domácího a stanovení doby, kdy k domestikáčnímu procesu došlo.....	9
1.2.4 Plemena kura domácího	11
1.3 Molekulární markery používané při studiu příbuzenských vztahů mezi plemeny	11
1.3.1 Mikrosatelity jako neutrální markery pro studium příbuzenských vztahů mezi populacemi kura domácího	12
1.3.2 Fylogeografická odlišnost poddruhů kura na mitochondriální DNA	13
1.3.3 Toll-like receptory a jejich adaptivní evoluce u ptáků	14
2. Cíle diplomové práce.....	16
3. Metody	17
3.1 Výběr datasetu a izolace DNA	17
3.2 Neutrální markery: Mikrosatelity	18
3.2.1 Fragmentační analýza mikrosatelitů a postup její optimalizace	18
3.2.2 Úprava dat v programu GeneMarker.....	21
3.2.3 Analýza příbuznosti mezi populacemi a jedinci.....	22
3.2.3.1 Odvození populační struktury	22
3.2.3.2 Vizualizace příbuznosti jedinců	22
3.2.3.3 Analýza genetické variability	22
3.2.3.4 Vizualizace vzájemné podobnosti plemen	23
3.3 Neutrální markery: Mitochondriální DNA (D-loop, cytochrom B)	23
3.3.1 Optimalizace PCR a sekvenování	23
3.3.2 Analýza příbuzenských vztahů mezi plemeny	24
3.3.2.1 Detekce variabilních pozic	24
3.3.2.2 Konstrukce haplotypových sítí	24
3.4 Imunitní geny – Toll Like Receptory (TLR).....	25
3.4.1 Optimalizace PCR a sekvenování vybraných TLR	25
3.5 Neutrální jaderné geny	31
4. Výsledky.....	35
4.1 Obecná charakteristika genetické variability studovaných plemen.....	35

4.2 Zmapování hrubého rámce původu moderních plemen mezi starobylými plemeny	37
4.3 Identifikace možného geografického původu námi vybraných starobylých a moderních plemen kura domácího na základě analýzy kontrolního regionu mtDNA	42
4.4 Srovnání míry neutrální a funkční variability mezi plemeny	46
4.5 Srovnání míry sdíleného polymorfismu (genového toku / ancestrálního polymorfismu) na neutrálních znacích a imunitních genech.	50
5. Diskuse	51
5.1 Cíl 1: Zmapování hrubého rámce původu moderních plemen mezi starobylými plemeny	51
5.2 Cíl 2: Identifikace možného geografického původu námi vybraných starobylých a moderních plemen kura domácího na základě analýzy kontrolní oblasti mtDNA	53
5.3 Cíl 3: Srovnání míry neutrální a funkční variability mezi plemeny	55
5.4 Cíl 4: Srovnání míry sdíleného polymorfismu (genového toku / ancestrálního polymorfismu) na neutrálních znacích a imunitních genech.	57
6. Závěr	58
7. Poděkování	60
8. Seznam tabulek	61
9. Seznam zkratk	61
10. Seznam obrázků	62
11. Literatura	63
12. Přílohy	69
12.1 Seznam použitých vzorků	69

1. Úvod

1.1 Studium genetiky a evoluce kura domácího

Kur domácí je jedním z nejvýznamnějších zástupců zvířat, která kdy prošla domestikačním procesem. Jako zdroj potravy slouží miliardám lidí po celém světě. Jen v České republice se v roce 2015 podle odhadu Ministerstva zemědělství spotřebovalo v přepočtu na jednoho obyvatele 275 vajec a 24,9 kg drůbežního masa (Odbor živočišných komodit MZe ČR, ČSÚ, leden 2016). Obrovská ekonomická a hospodářská hodnota tohoto druhu vedla v průběhu 20. století ke zvýšenému zájmu zejména o studium jeho komerčních linií a vysokoprodukčních plemen. Až v posledních letech se pozornost zaměřila také na jeho dříve opomíjené rurální populace (Chen et al., 2004) a tradiční zájmová plemena, která mohou být důležitým zdrojem genetické variability (Wright et al., 2009), a tudíž i novým přínosem informací pro genetický a evoluční výzkum (Lyimo et al., 2014). Právě zájmová plemena jsou s vysokou pravděpodobností nositeli ancestrálního polymorfismu a představují tedy ideální materiál pro studium celého domestikačního procesu od lokalizace místa vzniku plemen, přes genový tok mezi jednotlivými plemeny až po vzájemné porovnání jejich míry variability (Tixier-Boichard et al., 2011; Granevitze et al., 2007; Hillel et al., 2003).

Na počátku vzniku plemen hrál roli efekt zakladatele, následovaný postupnou izolací populací v různých oblastech (Lyimo et al., 2014; Tixier-Boichard et al., 2011). Zvyšování genetické diverzity u těchto populací a jejich celkové odlišení probíhalo postupně právě vlivem genetického driftu, dále pak díky umělému a přírodnímu výběru během celého domestikačního procesu souvisejícímu s postupnou snahou o zlepšení produkčních vlastností a později také s vytvořením plemenných standardů. Obzvláště starobylá domácí plemena slepic si často zachovala genetickou variabilitu podstatnou pro adaptaci v konkrétním prostředí (Chen et al., 2004). Tato plemena mají oproti současným komerčním liniím výrazně vyšší odolnost vůči různým chorobám a celkově vzato je jejich maso mnohem kvalitnější (Niu et al., 2002). Oproti komerčním liniím jsou však starobylá domácí plemena značně znevýhodněna svým pomalejším růstem a nižšími produkčními vlastnostmi.

Vzácná zájmová plemena jsou aktuálně zachovávána pouze díky aktivitě drobných chovatelů. Na základě historie selekce lze identifikovat 4 typy domestikovaných kurů – tradiční plemena selektovaná pro exteriérové znaky, standardizovaná plemena selektovaná pro přesně dané fenotypové znaky, komerční linie selektované pro zvýšenou produkci masa (brojleři) či vajec (nosnice) a experimentální linie využívané pro výzkum (Tixier-Boichard et al., 2011). Také uvnitř tradičních plemen pak můžeme identifikovat specializovaná plemena, která jsou primárně nosná, masná, okrasná či bojovná. Díky domestikaci a šlechtění celosvětově existují desítky plemen. Skoro každá země má svá národní plemena, která jsou buďto krajově specifická anebo jsou naopak navzájem sdílána

různými zeměmi. Bohužel však právě národní povaha udržování plemenných standardů způsobuje, že nelze jednoznačně zmapovat a dopočítat se konečného počtu plemen. Plemenné standardy se pro jednotlivá plemena mohou mezi zeměmi různit. Proto nelze některá plemena na základě morfologie přesně definovat, popř. lze stejně pojmenovaná plemena v různých zemích v podstatě chápat jako plemena odlišná.

Důsledkem domestikace, kterou provázely různé demografické a selekční události, došlo nejen ke vzniku většiny současných asijských a evropských plemen, nýbrž i k výrazným změnám v jejich genomu (Hillel et al., 2003; Elferink et al., 2012). Silný umělý výběr postupně vedl v některých populacích až k redukci genetické variability. Obzvláště v průběhu 20. století vedla umělá selekce ke vzniku vysokoprodukčních komerčních linií, u kterých však za nedlouhou dobu začalo docházet k postupné ztrátě diverzity a vzniku velkého množství homozygotů s rizikem následného inbreedingu (Hillel et al. 2003; Tadano et al. 2014). Tyto komerční linie selektované buď pro produkci masa či vajec se ukázaly jako ekonomicky výnosný zdroj. Jen v porovnání s volně žijícím předkem dnešního kura domácího, který vyprodukoval přibližně 10 – 15 vajec ročně, hybridy z komerčních linií vyprodukují ročně více než 20 x tolik (Romanov a Weigend, 2001). Se vzestupem těchto komerčních linií však došlo k postupnému úpadku tradičních zájmových plemen, z nichž některá se dostala až na pokraj vymizení. Úbytek zájmových plemen je přitom spojen s redukcí a potenciálním zánikem genetické diverzity ancestrálních populací. Dochází k hybridizaci volně žijících druhů s domestikovanými populacemi, což může vést až k následné extinkci ancestrální populace (Peterson a Brisbin, 1998; Brisbin a Peterson, 2007). Vzhledem k tomuto faktu se tak volně žijící předek stává ohroženým a chráněným druhem, u kterého hrozí vážné riziko narušení diverzity a struktury původního genofondu. Zvýšená genetická variabilita u zájmových plemen s vysokou pravděpodobností vyplývá primárně zejména z původního křížení mezi domestikovanými potomky několika poddruhů volně žijícího předka. Variabilitu pak zvyšovalo také křížení mezi různými plemeny. I samotná domestikace dále vedla k výraznému zvyšování fenotypové variability (Tixier-Boichard et al., 2011).

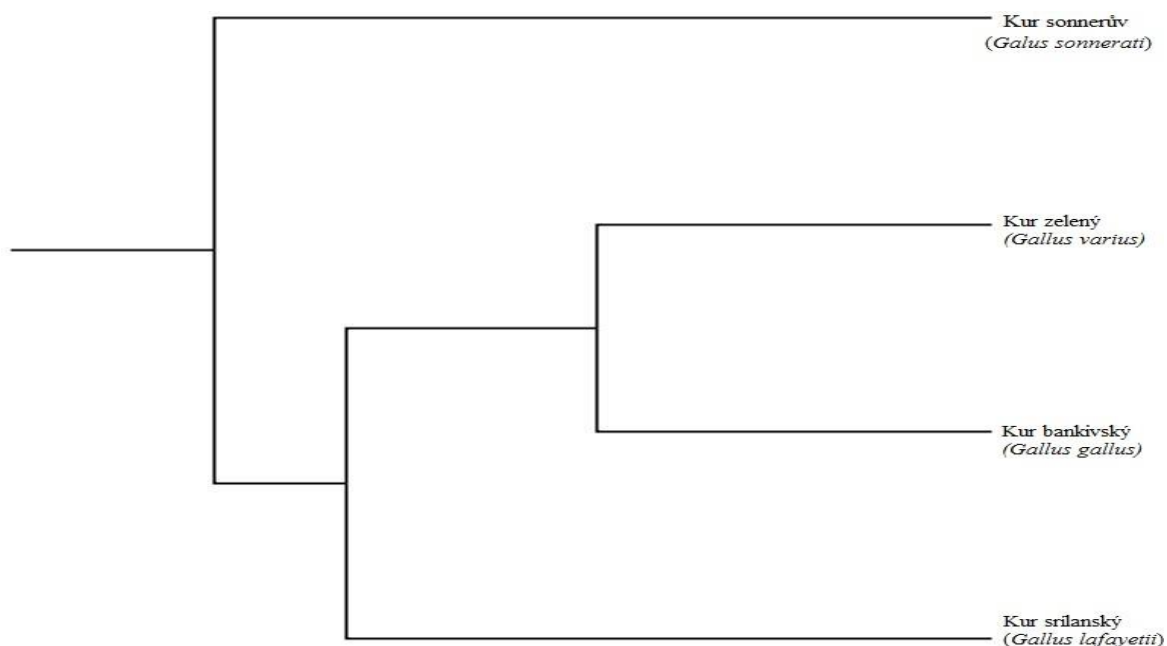
Oproti svému volně žijícímu předku došlo u kura domácího vlivem umělé selekce k podchycení mnoha mutací, které se výrazně odrazily na jeho výsledném vzhledu. Jelikož tato plemena skýtají obrovské množství genetické variability, roste v posledních letech snaha o jejich záchranu a zachování. Pro pochopení role, kterou hraje genetická diverzita zájmových plemen, má právě nyní velký význam jejich molekulárně-genetický evolučně-orientovaný výzkum. Výstupem z mé práce je interpretace získaných informací o variabilitě mezi analyzovanými plemeny. Na základě výsledků hodnotím příbuznost starobylých a moderních plemen a odhaluji jejich historii původu. Dále se pak zaměřuji na srovnání míry sdíleného polymorfismu neutrálních znaků a imunitních genů.

1.2 Domestikace kura domácího

Domestikace je evolučním procesem, v němž určitá populace reaguje na selekční tlak ze strany člověka a přizpůsobuje se novému prostředí života v jeho blízkosti (Larson a Fuller, 2014). Historie domestikace kura domácího je celkově vzata pozoruhodná. Ačkoliv jsou v současné době otázky ohledně předka dnešních plemen, místa a času domestikace považovány za již skoro dořešené, stále se objevují nejasnosti či neshody, z nichž některé dokonce zásadním způsobem narušují již skoro ustálená a zaběhlá dogmata. Obzvláště diskutabilním tématem je stále primární místo a čas domestikace kura, ohledně kterého se v posledních letech opět rozpoutala bouřlivá diskuze (viz dále).

1.2.1 Druhy kurů rodu *Gallus* žijící ve volné přírodě

Rod *Gallus* celkem zahrnuje 4 druhy, které se od sebe navzájem liší zejména svým geografickým rozšířením a morfologickou stavbou (Tixier-Boichard et al., 2011; Sawai et al., 2010; Fumihito et al., 1996; Flink et al., 2014). Kur srílanský (*Gallus lafayetii*) pochází ze Srí Lanky a je geneticky nejbližší. Kuru zelenému (*Gallus varius*) nacházejícímu se na Jávě a kuru bankivskému (*G. gallus*). Kur Sonnerův (*Galus sonnerati*) z oblasti centrální a jihozápadní Indie tvoří sesterskou větev všem ostatním druhům.



Obrázek č. 1 – Fylogenetický strom druhů rodu *Gallus* (vytvořeno v Birdtree; Hackett et al., 2008)

Kur bankivský má celkem 5 poddruhů, které mají různé areály rozšíření:

- *G. g. bankiva* (Sumatra, Jáva)
- *G. g. gallus gallus* (Thajsko, Laos, Kambodža, jižní Vietnam)
- *G. g. jabouillei* (jižní Čína a severní Vietnam)
- *G. g. murghi* (severovýchodní Indie)
- *G. g. spadiceus* (Malajsie, Barma, Thajsko, Čína)

Z těchto poddruhů jsou si nejpříbuznější *G. g. gallus* a *G. g. spadiceus*, které ve fylogenetickém stromě ani nevytvářejí oddělené klastry (Fumihito et al., 1996). *G. g. gallus* zahrnuje dvě oddělené populace – ostrovní a kontinentální. Právě kontinentální populace je nejvíce příbuzná poddruhu *G. g. spadiceus*. Od těchto dvou poddruhů se značně liší *G. g. bankiva*, což naznačuje probíhající speciaci (Kanginakudru et al., 2008). Další poddruh *G. g. murghi* je stejně jako *G. g. spadiceus* geneticky velice těžko rozlišitelný od *G. g. gallus*. *G. g. jabouillei* je zase blízkým příbuzným *G. g. spadiceus* (Liu et al., 2006).

1.2.2 Původ současných plemen kura domácího (*Gallus gallus f. domestica*)

Původ kura domácího byl dlouho diskutovaným tématem. Autoři se neshodovali zejména v tom názoru, zdali má kur domácí původ monofyletický (Fumihito et al., 1994; Fumihito et al., 1996) či polyfyletický (Liu et al., 2006; Miao et al., 2013). Všechny výsledky však nasvědčují tomu, že autoři přiklánějící se k monofyletickému původu vycházeli z nedostatečného množství vzorků a dat, a tudíž jejich výsledky nelze v závěru považovat za opravdu relevantní. Polyfyletický původ kura domácího je podle všeho nejpravděpodobnější.

Již s jistotou lze dnes říci, že přímým předkem je kur bankivský (Hillel et al., 2003; Kanginakudru et al., 2008; Miao et al., 2013). Na základě analýzy mitochondriální DNA byly jako předci kura domácího identifikovány celkem jeho 4 poddruhy (Liu et al., 2006; Miao et al., 2013). *G. g. gallus* a *G. g. spadiceus* se nacházejí na Malajském poloostrově a jsou si, jak již bylo zmíněno, geneticky velice blízkými poddruhy. Jejich haplotypové skupiny jsou i nejčastějšími haplotypovými skupinami plemen kura domácího (Liu et al., 2006). V těchto haplotypových skupinách byly nalezeny i alely *G. g. jabouillei* pocházejícího z jižní Číny a severního Vietnamu, a tudíž ho lze též zařadit mezi předky. Čtvrtým poddruhem, který předal své geny dnešním plemenům kura domácího, je *G. g. murghi* ze severovýchodní Indie (Kanginakudru et al., 2008). Poslední z poddruhů Indonéský *G. g.*

bankiva je od ostatních poddruhů odlišen výraznými sekvenčními rozdíly a kuru domácímu je jen vzdáleně příbuzný (Oka et al., 2007). Vyskytuje se pouze v jedné haplotypové skupině, kde je pouze minimální množství plemen kura domácího. Je sice možné, že též patří mezi předky, avšak literatura se o tomto poddruhu nikterak více nezmiňuje.

V nedávné době se objevila studie se zajímavým zjištěním, že by svými geny mohl přispět i kur Sonnerův (Eriksson et al., 2008). Indicií, která vedla k této hypotéze, bylo nalezení lokusu způsobujícího žluté zbarvení kůže. Alela zodpovědná za žluté zbarvení kůže některých dnešních plemen musela být v minulosti zděděna od kura Sonnerova. Ačkoliv většina jaderné a mitochondriální DNA dnešního kura domácího pochází od kura bankivského, právě alela způsobující žluté zbarvení kůže s vysokou pravděpodobností pochází od kura Sonnerova neboť se u kura bankivského nevyskytuje. V souladu s tímto zjištěním však byla navržena i možnost hybridizace kura bankivského a kura Sonnerova ještě dříve před tím, než došlo k domestikacní události. Toto zjištění je však značně nepravděpodobné. V přírodě se hybridizace těchto dvou druhů nevyskytuje a pokusy v zajetí vedly pouze ke vzniku neplodného sterilního potomstva. Tudíž by reálnější hypotézou byla introgrese alely od kura Sonnerova způsobující žluté zbarvení kůže spíše až po domestikaci, která mohla sterilitu hybridů prolomit. Introgrese alely zodpovědné za žluté zbarvení byla usnadněna díky své výhodné poloze na mikrochromozomu, který je známý zejména svou neobvykle vysokou rekombinační rychlostí zodpovědnou za snížení množství genetického materiálu ovlivněného vazbou. Ke vzniku dnešního kura domácího přispěl tudíž pravděpodobně nejen kur bankivský, nýbrž zde svou roli hrála i introgrese genů kura Sonnerova (Eriksson et al., 2008; Rubin et al., 2010).

1.2.3 Lokalizace domestikacního centra kura domácího a stanovení doby, kdy k domestikacnímu procesu došlo

Identifikace domestikacních center je spojena s mapováním fylogeografie původních předků a dnešních plemen kura domácího (Storey et al., 2014). To, jak se z těchto původních oblastí výskytu kur domácí rozšířil po světě, úzce souvisí s lidskou migrací. Jako primární domestikacní centrum kura domácího je brána jižní a jihovýchodní Asie. S vysokou pravděpodobností v těchto oblastech v minulosti vzniklo nezávisle na sobě více domestikacních center (West a Zhou, 1988; Liu et al., 2006; Kanginakudru et al., 2008). S jistotou lze za domestikacní centrum například považovat Indii, ve které došlo k domestikaci z poddruhu *G. g. murghi* (Kanginakudru et al., 2008). Dále pak jižní a jihovýchodní Čínu i s jejich přilehlými oblastmi (Vietnam, Barma, Thajsko; Fumihito et al. 1994; Fumihito et al., 1996; Liu et al., 2006) Potencionálním domestikacním místem však může být i severní Čína, která byla jako domestikacní centrum navržena na základě archeologických nálezů kostí (Xiang et al. 2014).

Souhrnně vzato lze zrekapitulovat a zmínit, že výsledky hledání předka kura domácího přinesly informace o jeho jednoznačně polyfyletickém původu. Díky tomu je zcela reálná existence většího počtu míst, kde došlo k primárním domestikacím. Již zmíněná místa navrhovaná jako potenciální domestikací centra jsou povětšinou v souladu s geografickými podmínkami, ve kterých se nachází volně žijící předci kura domácího. Místem, které se však naprosto vymyká původním představám o lokalizaci původu, je severní Čína (Xiang et al., 2014).

Xiang et al. (2014) se pokusili existenci tohoto domestikací centra potvrdit. Z oblasti Žluté řeky (Cishan, Nanzhuangtou, a Wangyin) a oblasti řeky Yangtze (Jiuliandun Chu Tombs) vybrali 39 archeologických nálezů kostí, reprezentujících nejranější nálezy kostí jedinců rodu *Gallus*. Následovala analýza DNA a osekvenování podjednotky cytochromu c - cytochromoxidázy I. Pomocí radiokarbonové hmotnostní spektrofotometrie byla odhadnuta doba stáří až na 12 000 let. Hypotéze podle Xianga nahrávají i predikované tehdejší přírodní podmínky ve zmíněných místech při této dataci. Ty by nejspíše kuru domácímu vyhovovaly.

V rozporu s touto studií je však zejména fakt, že velikost kostí neodpovídá velikosti kostí domestikovaného kura, a je otázkou, zdali tyto kosti vůbec nějakému jedinci rodu *Gallus* náležejí (Peters et al., 2015; Peng et al., 2015; Eda et al., 2016). Eda et al. (2016) analyzovali vzorky nalezených kostí v diskutovaných oblastech a došli k závěru, že tyto kosti rozhodně nepatří žádnému jedinci rodu *Gallus*. Podle Penga et al. (2015) je navíc fragment 326 bp použitý ve studii Xiang et al. (2014) nedostatečný pro jistou identifikaci druhu. Jako domestikací centrum bývá severní Čína zpochybňována i z dalšího podstatného důvodu – semiaridní stepi, které jsou její dominantou, rozhodně nejsou vhodným habitatem pro jakéhokoliv zástupce rodu *Gallus*. Přírodní podmínky v paleolitu sice byly odlišné, avšak podle dostupné studie Wang et al. (2014), která se zabývá klimatem a prostředím zahrnujícím i zmíněné oblasti, není možné, aby byl rod *Gallus* v této době a v této oblasti přítomen. Ani klima se tedy nezdá být adekvátním faktorem. Ačkoliv se Xiang et al. (2014) snažili obhájit své postoje a zjištění, nelze pro výše uvedené argumenty a související nevyjasněné otázky zařadit severní Čínu do potenciálních primárních domestikacích center.

Archeologické nálezy kostí pocházejících ze severní Číny (oblast Cishan) byly terčem zájmu již dříve. West a Zhou (1988) na základě těchto nálezů určili tato archeologická naleziště jako místa primární domestikace a odhadli jejich stáří na přibližně 8000 let. Avšak z těchto nálezů rozhodně není patrné, jestli kosti opravdu patří kuru domácímu či jeho volně žijícímu předkovi. Jako další nejznámější místo nálezů jsou oblasti Harappa a Mohenjo-Daro v Pákistánu (Zeuner, 1963). Tyto nálezy mají odhadované stáří až 4500 let. Všechny tyto nejasnosti vedou až k domněnkám, že by domestikací událost, která dala za vznik dnešnímu kuru domácímu, mohla být recentní, tj. cca 4500 let stará (Miao et al., 2013).

Komplikacím ohledně lokalizace se nevyhnulo ani Thajsko. Fumihito et al. (1996) určili Thajsko jako primární centrum zejména kvůli tomu, že jsou v této oblasti původní dva z poddruhů kura bankivského – *G. g. gallus* a *G. g. spadiceus*. Tato hypotéza byla zpochybněna na základě výsledků studie, kterou provedli Storey et al. (2014). Konstatovali, že identifikace domestikálního centra v oblasti Thajska není vzhledem k velikosti vyšetřovaného vzorku relevantní. Dále jsou jasné evidence o obchodních vztazích Indie, Thajska a Číny, což vede i k myšlence možné introdukce kura domácího do Thajska z jiných oblastí, které naopak domestikálními centry skutečně byly.

1.2.4 Plemena kura domácího

V průběhu času plemena procházela výraznou umělou selekcí. Starobylá plemena jsou známá již z dob, kdy byla tato selekce na počátku. V té době samozřejmě dosud nebyly určeny konkrétní plemenné standardy a křížení probíhalo zejména s ohledem na účelnost daného plemene. Postupně vznikala plemena šlechtěná pro produkční vlastnosti, exteriérové znaky či bojové vlastnosti. Moderní plemena pak vznikala křížením a šlechtěním starších plemen až na přelomu 19. – 20. století, kdy již došlo ke stanovení identifikačních plemenných znaků pro jednotlivá plemena a stejnou standardizací fenotypu prošla i plemena starobylá.

1.3 Molekulární markery používané při studiu příbuzenských vztahů mezi plemeny

Historie molekulárních metod a variabilních typů markerů, které kdy byly pro zkoumání příbuzenských vztahů u kura domácího použity, je opravdu rozsáhlá. První průkopnické studie v této oblasti využívaly proteinových markerů. Například alozymy byly ve své době úspěšně využívány pro výzkum populační variability (Zhang et al., 2002). S postupem času a vývojem metod zaměřujících se na analýzu rozmanitých markerů na úrovni DNA bylo však od jejich používání upuštěno. Markerů na úrovni DNA byla zkoumána celá řada. Některé se ukázaly jako vysoce variabilní a vzhledem k době, jakou jsou již používány, až nadčasové. Mezi ně patří hlavně mikrosatelity (Hillel et al., 2003; Granevitze et al., 2007) a mitochondriální DNA (Liu et al., 2006, Miao et al., 2013), které jsou unikátní pro své jedinečné vlastnosti. Ukázaly se jako ideální nástroj zejména pro výzkum původu plemen, příbuzenských vztahů mezi plemeny a jejich vzájemné variability. V minulosti se však objevily a testovaly i jiné metody zaměřené na další typy markerů, které se ve výsledku ukázaly jako špatně použitelné, složité, drahé nebo z jiného důvodu nevhodné. Mezi méně používané markery se řadí RAPD (polymorfismus náhodně amplifikované DNA; Yap et al., 2010; Zhang et al., 2002), CNV (variabilita počtu kopií; Wang et al., 2012; Jia et al., 2013); delece a inserce v tandemových duplikovaných sekvencích (Brandström a Ellegren, 2007) a míry rekombinace chromozomů a mikrochromozomů (Rao et al., 2011).

V této práci jsem použila mikrosatelity jako markery neutrální evoluce, selekčně neutrální sekvence mitochondriální DNA jako markery maternálního původu populací a Toll-like receptory jako pozitivně selektované funkční geny potenciálně odrážející adaptivní diverzitu plemen. V následujících kapitolách se budu detailněji věnovat právě těmto genetickým znakům.

1.3.1 Mikrosatelity jako neutrální markery pro studium příbuzenských vztahů mezi populacemi kura domácího

Mikrosatelity jsou krátké tandemové repeticity o velikosti 2 – 6 bp, které jsou náhodně distribuovány po celém genomu (Crooijmans et al., 1996; Zima et al., 2004). Díky těmto vlastnostem jsou právě mikrosatelity vděčným nástrojem pro mnoho studií, zaměřených na výzkum genetické variability a fylogeneze. Vzhledem k jejich vysoké početnosti, kodominantní dědičnosti a vysoké míře polymorfismu představují ideální zdroj pro výzkum genetické diverzity mezi plemeny. Za pozornost dále stojí jejich obrovská variabilita. Ke vzniku takové variability vedla vysoká mutační rychlost mikrosatelitů, která ovlivňovala jejich délku (Kruglyak et al., 1998). Za změnou délky mikrosatelitů konkrétně stojí sklouznutí polymerázy, ke kterému může dojít v době replikace tandemových oblastí (Kruglyak et al., 1998). Nesprávné spojení DNA vláken může vést k inzerci či delecii uvnitř mikrosatelitů. Důsledkem silné selekce variabilita výrazně klesá u komerčních linií, a to obzvláště u nosnic (Crooijmans et al., 1996). Vysokou variabilitu naopak vykazují zájmová plemena a volně žijící druhy rodu *Gallus* (Hillel et al., 2003).

K osekvenování genomu kura domácího došlo již v roce 2004 (International Chicken Polymorphism Map Consortium, 2004). Díky tomu bylo vzápětí objeveno celkem 1 650 000 mikrosatelitních lokusů o velikosti dvou až pěti nukleotidů a o četnosti tří a více opakujících se jednotek (Brandström a Ellegren, 2008).

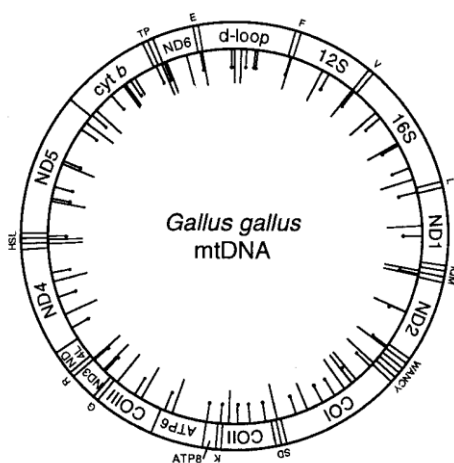
Na základě analýzy vztahu mezi stupněm polymorfismu a délkou mikrosatelitů se ukázalo, že s délkou opakování roste počet polymorfních lokusů (Brandström a Ellegren, 2008). Při množství 10 opakování bylo polymorfních celkem 50 % lokusů. V případě 15 - 20 opakování bylo 75 – 80 % lokusů polymorfních. U di-nukleotidových repetitiv nejvyšší variabilitu vykazovalo (AT)_n (Brandström a Ellegren, 2008). U tetra-nukleotidových repetitiv se též jako nejvariabilnější ukázaly ty, které nenesly žádné GC. Oproti nim však tri-nukleotidové repeticity ukázaly naprosto jiné preference pro zvýšení variability. Již dlouho je známo, že mnohé tri-nukleotidové repeticity při syntetizování dceřiného řetězce během replikace nabývají vlásenkovité struktury. I tak však lze tri-nukleotidové repeticity rozdělit na ty, které mají tendenci tyto vlásenky tvořit a poté na ty, které je netvoří. Ty repeticity, které

netvořily vlásenky, se ukázaly jako variabilnější v přítomnosti AT bází, naopak tomu bylo u repetitivních vlásenek. Ty největší variability dosahovaly v přítomnosti GC bází.

1.3.2 Fylogeografická odlišnost poddruhů kura na základě mitochondriální DNA

Mitochondriální DNA (mtDNA) je jedním z nejvyužívanějších genetických markerů u molekulárně-genetických studií (Lan et al. 2015; Miao et al. 2013; Liu et al. 2006; Yacoub a Fathi, 2013; Toro et al., 2009). Důvodem k tomu je zejména její rychlost evoluce, která je oproti jaderným markerům skoro až 15x vyšší, a dědičnost po maternální linii. Dále pak absence rekombinace, díky čemuž lze rozdíly v počtu nukleotidů mezi jednotlivými mitochondriálními genomy připisovat na vrub přímo jednotlivým mutačním událostem v genomu (Toro et al., 2009). Všechny tyto vlastnosti jsou často směrodatné nejen při výběru markerů pro fylogenetické a taxonomické studie, ale v dalším případě je lze použít ke studiu divergence mezi domestikovanými a volně žijícími populacemi.

MtDNA je cirkulární dvouřetězcová DNA molekula přibližně o velikosti 16 784 bp (Huang et al., 2014; Liu et al., 2016a; Liu et al., 2016b). Má schopnost samostatné replikace nezávisle na jádře, což z ní činí vysoce autonomní strukturu (Nicholls a Minczuk, 2014; Lan et al. 2015). Stejně jako u savců se skládá celkem ze 13 protein-kódujících genů, 22 tRNA genů, 2 rRNA genů a 1 nekódujícího kontrolního regionu (Liu et al., 2016). Zajímavostí je, že na rozdíl od savců a obojživelníků však mají ptáci jiný iniciační kodon v cytochromoxidáze I (COI; Liu et al., 2016a). U kura je iniciační kodon GTG, zatímco u savců ATG. Mutační rychlost mtDNA kura domácího je přibližně $3,3 \times 10^{-7}$ mutací za rok (Alexander et al., 2015). Toto číslo je výsledkem studie, která zrekonstruovala rodokmen založený na informacích o maternální mitochondriální linii u více než 50 generací plemene Bílá Plymutka (White Plymouth Rock). Přesně podle předpokladu se ukázalo, že v krátké časové periodě je mutační rychlost opravdu vysoká.



Obrázek č. 2 - Mitochondriální DNA kura domácího (Sorenson et al. 1999)

Zásadními oblastmi pro výzkum jsou cytochrom b (cyt b) a součást kontrolního regionu – D-loop. D-loop se v mitochondriální DNA nachází mezi geny tRNA^{Glu} a tRNA^{Phe} a má velikost 1231 bp (Liu et al., 2016a). Cytochrom b má velikost 1143 bp a je lokalizován mezi genem tRNA^{Thr(ACH)} a protein-kódujícím genem ND5 (Liu et al., 2016b). Jednotlivá plemena kura domácího disponují různými haplotypy, díky kterým je můžeme úspěšně zařazovat do haplotypových rodin. Mitochondriální DNA je tudíž výborným vodítkem pro odhalení geografického původu předků těchto plemen (Miao et al., 2013; Lyimo et al., 2015).

1.3.3 Toll-like receptory a jejich adaptivní evoluce u ptáků

Toll-like receptory (TLR) představují strukturně vysoce konzervovanou skupinu transmembránových receptorových proteinů zodpovědných za detekci patogenů a následnou imunitní odpověď organismu (Kannaki et al., 2010). Jednotlivé TLRs mohou detekovat různé patogenní struktury, a to například lipopolysacharidy, flagelin, peptidoglykany, bakteriální DNA či dvouřetězcovou virovou DNA. Aktivace TLR vazbou ligandu spouští expresi prozánětlivých cytokinů, reaktivního kyslíku a meziproduktů dusíku. Ačkoliv jsou TLR považovány za receptory vrozené imunity, svou důležitou funkci plní i jako zprostředkovatelé signálů pro vyvolání a regulaci adaptivní imunitní odpovědi (Iqbal et al., 2005). TLR jsou tvořeny extracelulární N-terminální doménou, která obsahuje repetice bohaté na leucin (LRRs), transmembránovou doménou, jedním nebo dvěma regiony bohatými na cystein a vysoce konzervovanou cytoplasmatickou Toll/IL-1 receptorovou doménou (TIR; Brownlie a Allan, 2011).

U kura domácího bylo identifikováno celkem 10 TLR, a to receptory TLR1A, TLR1B, TLR2A, TLR2B, TLR3, TLR4, TLR5, TLR7, TLR15 a TLR21 (Ruan et al., 2012; Temperley et al., 2008). Receptory TLR 3, 4, 5 a 7 jsou ortology stejných genů, které se nachází u ostatních obratlovců (Temperley et al., 2008). TLR21 je ortologní k TLR21 u ryb a obojživelníků. TLR1A a TLR1B jsou ortology receptorů TLR1 a TLR6 u savců. TLR15 je receptor unikátní pro ptáky. TLR2A a 2B jsou oba ortology TLR2 u savců. TLR 1, 2, 4, 5 a 15 se nacházejí na povrchové membráně buněk a jsou specializovány zejména na detekci produktů tvořených bakteriemi (Iwasaki a Medzhitov, 2004). TLRs 3, 7 a 21 jsou naopak zaměřeny na rozpoznání nukleových kyselin typických zejména pro viry a lze je lokalizovat na membráně pozdních endozomů.

Pro naši studii byly vybrány pouze receptory TLR3, TLR4, TLR5 a TLR7 zejména z toho důvodu, že svou strukturou a funkcí představují odlišné buněčné obranné systémy. TLR3 je zaměřený na rozpoznávání dvouřetězcové virové RNA (dsRNA; Huang et al., 2012); TLR4 rozpoznává lipopolysacharid nacházející se v buněčné stěně gram negativních bakterií (Kogut et al., 2005); TLR5

je specializován na detekci bakteriálního flagelinu (Keestra et al., 2008); TLR7 hraje významnou roli při rozpoznávání jednořetězcové virové RNA (Philbin et al., 2005). Genetické analýzy dále ukázaly, že lze u TLR pozorovat nadbytek nesynonymních mutací nad synonymními (Alcaide a Edwards, 2011; Vinkler et al., 2014). Tento fakt nasvědčuje tomu, že jsou TLR pod pozitivní selekcí. Zvláště díky této vlastnosti lze dobře zjistit, jestli se plemena na základě své adaptivní imunity liší.

2. Cíle diplomové práce

Hlavním cílem mé diplomové práce bylo objasnit příbuzenské vztahy mezi starobylými a moderními plemeny kura domácího a v rámci vybraných kategorií znaků (imunitní geny a neutrální markery) určit míru sdílení alel mezi plemeny. Pro tento účel jsme záměrně vybrali soubor jedinců reprezentující co nejširší škálu v Evropě chovaných plemen. Za neutrální markery jsme si zvolili kontrolní oblast mtDNA a 19 mikrosatelitových lokusů. Vybranými imunitními geny byly Toll-like receptor (TLR) 3, TLR4, TLR5, TLR7.

Díličními cíli práce bylo:

Cíl 1: Zmapovat hrubý rámec původu moderních plemen mezi starobylými plemeny.

Hypotéza 1: Moderní plemena sdílejí se starobylými plemeny genetické znaky, na jejichž základě můžeme vytipovat, z okruhu kterých starších plemen byla patrně odvozena.

Cíl 2: Na základě analýzy kontrolní oblasti mtDNA identifikovat možný geografický původ námi vybraných plemen kura domácího.

Hypotéza 2: Plemena v našem souboru sdílejí mitochondriální haplotypy s referenčními populacemi (Miao et al., 2013), což umožňuje jejich následné přiřazení k již identifikovaným haplotypovým skupinám a tím i pravděpodobným geografickým oblastem rozšíření předků.

Cíl 3: Porovnat míru neutrální a funkční variability mezi plemeny s mírou variability uvnitř plemen samotných a v tomto ohledu porovnat moderní a starobylá plemena.

Hypotéza 3: Moderní plemena jsou geneticky uniformnější než plemena starobylá, asijská plemena jsou variabilnější než plemena evropská.

Cíl 4: Srovnat míru sdíleného polymorfismu (genového toku / ancestrálního polymorfismu) na neutrálních znacích a imunitních genech.

Hypotéza 4: Sdílený polymorfismus vycházející z genového toku či udržujícího se ancestrálního polymorfismu je vzhledem k funkci silnější u imunitních genů.

3. Metody:

3.1 Výběr datasetu a izolace DNA

Pro analýzu byl vybrán soubor 272 jedinců reprezentujících poměrně širokou škálu starobylých a moderních plemen (viz tabulka č. 21 v příloze). Konkrétně bylo vybráno 33 plemen, a to plemena: Araukana, Asilka, Australka, Bantamka, Barneveldka, Barneveldka zdrobnělá, Bojovnice šamo, Brahmánka, Brahmánka zdrobnělá, Češka, Fénixka, Fénixka zdrobnělá, Hedvábnička, Holandská chocholatá zdrobnělá, Holokrčka, Holokrčka zdrobnělá, Japonka čabo, Jokohamka, Kadeřavá slepice, Kočinka, Kočinka zakrslá, Lafleška, Malajka, Maranska, Minorka, Orlovka, Paduánka zdrobnělá, Plymutka, Rousná zakrslá, Sebritka, Velsumka, Vlaška a Wyandotka.

Tabulka č. 1 – Seznam analyzovaných plemen, jejich původ, užitkovost a zařazení (Pavel a Tuláček, 2006).

Plemeno	Zkratka	Zařazení	Užitkovost	Původ
Araukany	AR	starobylé	nosné	Chile
Asilky	A	starobylé	bojové	přední Indie
Australky	AU	moderní	kombinovaná užitkovost	Austrálie
Bantamky	BN	starobylé	zájmové	Jáva
Barneveldky	BA	moderní	kombinovaná užitkovost	Holandsko
Barneveldky zdrobnělé	BAz	moderní	zájmové	Německo
Bojovnice šamo	BSA	starobylé	bojové	Thajsko
Brahmánky	BH	starobylé	kombinovaná užitkovost	Asie
Brahmánky zdrobnělé	BHz	starobylé	zájmové	Anglie, Německo
České slepice	CZ	moderní	kombinovaná užitkovost	Čechy
Fénixky	FX	starobylé	okrasné	Japonsko
Fénixky zdrobnělé	FXz	starobylé	okrasné	Německo
Hedvábničky	HE	starobylé	okrasné	Čína
Holandské chocholaté zdrobnělé	HDz	starobylé	okrasné	Holandsko; Německo
Holokrčky	HK	starobylé	kombinovaná užitkovost	Indie
Holokrčky zdrobnělé	HKz	moderní	zájmové	Německo
Japonky čabo	JPC	starobylé	okrasné	Japonsko
Jokohamky	JK	starobylé	okrasné	Japonsko
Kadeřavé slepice	KR	starobylé	kombinovaná užitkovost	jižní Asie

Kočinky	KC	starobylé	zájmové	Čína
Kočinky zakrslé	KCz	starobylé	okrasné	Čína
Laflešky	LF	starobylé	kombinovaná užítkovost	Francie
Malajky	MA	starobylé	bojové	Indie
Maransky	MR	moderní	kombinovaná užítkovost	Francie
Minoroky	MI	starobylé	nosné	Španělsko
Orlovky	OL	starobylé	kombinovaná užítkovost	Rusko
Paduánky zdobnělé	Paz	starobylé	okrasné	Anglie
Plymutky	PL	moderní	kombinovaná užítkovost	USA
Rousné zakrslé	RZ	starobylé	zájmové	Evropa
Sebritky	SE	moderní	okrasné	Anglie
Velsumky	VE	moderní	kombinovaná užítkovost	Holandsko
Vlašky	V	moderní	nosné	Itálie; Německo
Vyandotky	W	moderní	kombinovaná užítkovost	USA

Při navrhování datasetu bylo hlavním cílem vybrat ke každému plemeni minimálně 6 jedinců od 3 chovatelů. Z velké části byl tento cíl splněn, pouze u 7 obtížně sehnatelných plemen jsme se museli spokojit s méně než 6 jedinci. Vzorky peří a krve byly odebrány zejména na výstavách či přímo u zájmových chovatelů z České republiky, Slovenska a Německa. Vzorky tkání se podařilo získat z usmrcených embryí z násadových vajec též poskytnutých zájmovými chovateli. V současné době je veškerá použitá DNA uložena v Genetické bankce Katedry zoologie Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy v Praze a je skladována v jejím hlubokomrazícím boxu při teplotě -80°C .

Izolováno bylo celkem 171 vzorků tkáně, 78 vzorků krve a 23 vzorků peří (spodní část brku) kitem DNeasy 96 Blood & Tissue Kit (Qiagen). Izolace probíhala podle protokolu výrobce kitu (DNeasy 96 Blood & Tissue Handbook, Protocol: Purification of Total DNA from Animal Tissues (Spin-Column Protocol, str. 28 – 30, 07/2006).

3.2 Neutrální markery: Mikrosatelity

3.2.1 Fragmentační analýza mikrosatelitů a postup její optimalizace

Pro následnou analýzu jsme vybrali 19 mikrosatelitových lokusů - ADL0020, ADL0123, ADL0142, LEI0120, LEI064, MCW0178, MCW0219, MCW0230, ADL0315, ADL0112, ADL0191, ADL0247, ADL0262, ADL0306, COL1A1, MCW0005, MCW0083, MCW0217 a ROS0302

(Groenen et al., 1998; Groenen et al., 2000; Tab. 1). Jelikož byly lokusy analyzovány kapilární elektroforézou, jeden z dvojice speciálně navržených primerů byl vždy fluorescenčně značený.

Tabulka č. 2 – Mikrosatelitové lokusy - Vybrané primery a jejich sekvence.

	Lokus	F	R
1.	ADL0020	TAGATAAAAATCCTTCCCTT	GCACTCAAAGAAAACAAAT
2.	ADL0123	GCTGTGTCAAGATTAGAATCAC	AACAATGAAAAACACTACCTGA
3.	ADL0142	CAGCCAATAGGGATAAAAGC	CTGTAGATGCCAAGGAGTGC
4.	LEI0120	CGTAACACATGCAACTCAATG	TTAGAATGAAAAGGCTGTTCC
5.	LEI064	TGGTTGTCTCAATACAACGTC	CTGTAAAGATTTCTCAGAAACAG
6.	MCW0178	ACTGGAATTTTAGGGCAACAG	AACTGTTAGCTAATATGACCTG
7.	MCW0219	CCACAGCTATAAATGCTATAGC	GACATGACTTACTGAAAACACTAG
8.	MCW0230	TGCACAGAGCCAAGCTGCTTC	GATCCTCTGATGGCTGCCG
9.	ADL0315	TCCTTGGGCAGTAGTTTCAA	CTCCCATGTTGCTTCTTTAG
10.	ADL0112	ATCTCAAATGTAATGCGTGC	GGCTTAAGCTGACCCATTAT
11.	ADL0191	AAAGGAAAGCCTATGTGAAT	AAAGCACCAAGCGAGATACA
12.	ADL0247	CTCTTGTTGTCTGTCTTGTG	TGCATGTTGTCAGTTTTTCAG
13.	ADL0262	GTGCAGACACAGAGGGAAAG	TCACATGCACACAGAGATGC
14.	ADL0306	GTTACTGTATCTTGGCTCAT	TCAGTTTGACTTTCCTTCAT
15.	COL1A1	CGGACCATGAATTTGGCATT	TTACTCTCTCCTGTCACGCG
16.	MCW0005	ACCTCCTGCTGGCAAATAAATTGC	TCACTTTAGCTCCATCAGGATTCA
17.	MCW0083	GCCTTTCACCCATCTTACTGT	TACATTTCAGAAGGAATGTTGC
18.	MCW0217	GATCTTTCTGGAACAGATTTTC	CTGCACTTGGTTTCAGGTTCTG
19.	ROS0302	CACAGACACCCCGTACAG	ACACAGCGGTTGGTTATGCC

Optimalizace PCR u všech těchto lokusů probíhala celkem na 8 jedincích (Fénixka, Velsumka, Holokrčka, Bojovnice šamo, Hedvábnička, Maranska, Plymutka a Rodajlendka). Nejprve jsem hledala nejvhodnější teplotu, při které během PCR reakce probíhá dosednutí primerů (annealing). V termocykleru Eppendorf AG, No. 5345 probíhala PCR při různých teplotních gradientech. Celkem bylo testováno 8 teplot, přičemž PCR nejlépe probíhala při teplotách 56° C a 57° C. Jako výchozí jsem zvolila teplotu 57° C, jelikož se nakonec ukázala jako nejlepší.

Následným krokem bylo sestavení multiplexů. Jako první jsem vyzkoušela rozdělení námi vybraných lokusů do dvou multiplexů. Oba multiplexy jsem se snažila složit tak, aby se do nich vybrané lokusy co nejvíce lišily v rozsahu alel, a aby se v jejich blízkosti nevyskytovaly lokusy značené stejnou fluorescenční barvou. Bohužel se ukázalo, že sestavení jednoho z multiplexů nebude funkční. Tento multiplex jsem tedy byla nucena rozdělit do dvou nových multiplexů, což se následně ukázalo jako úspěšné řešení (Tab. č. 3). Poslední fází bylo upravení poměru primerů přidávaných do PCR reakce. Množství přidávaných primerů jsem upravovala podle výšky peaků v jednotlivých mikrosatelitových lokusech.

Tabulka č. 3 – Sestavené multiplexy

Multiplex 1	Multiplex 2	Multiplex 3
MCW0178	ADL0020	MCW0219
ADL0112	ADL0191	ADL0315
MCW217	ADL0123	LEI0064
ADL0142	ADL0262	ADL0247
MCW0230	LEI120	ADL0306
MCW0005		
MCW0083		
ROS0302		
COL1A1		

Pro PCR reakci byl použit již kompletní mastermix TypeIt (Qiagen). Prvním krokem bylo smíchání jednotlivých multiplexů (H₂O; primery v odpovídajícím množství – dle předchozí optimalizace). Do připravené destičky na PCR jsem do každé jamky napipetovala 1 µl multiplexu (MPX) a 4 µl mastermixu (MM). Vzhledem ke snaze co nejvíce minimalizovat chyby jsem poté z předem připravené destičky obsahující DNA analyzovaných jedinců nanasla pipetovacím robotem epMotion (Eppendorf) do každé jamky PCR destičky (s připraveným MPX a MM) 1 µl DNA. PCR reakce probíhala v termocykleru Mastercycler®Eppendorf AG, No. 5345. Nastavené podmínky pro PCR – iniciační denaturace při teplotě 95 °C po dobu 5 minut. Dále denaturace při teplotě 95 °C/ 0,5 minuty, nasedání primerů při teplotě 57 °C/1,5 minuty, amplifikace při teplotě 72 °C/1 minutu – všechny tyto podmínky se opakovaly v každém z 30 cyklů. Závěrečné dosyntetizování řetězce probíhalo po dobu 30 minut při teplotě 60 °C.

Po PCR následovala příprava destičky na fragmentaci. Do každé jamky jsem napipetovala 9 µl formamidu a 0,3 µl žebříku LIZ 500 (Genescan Liz Size Standard; Applied Biosystems). Následně jsem pipetovacím robotem do každé z jamek přidala 1 µl PCR produktu. Destičku na fragmentaci jsem stočila na centrifuze a poté jsem reakce denaturovala dvě minuty při teplotě 95° C (MJ Research PTC-200 Thermal Cycler). Finálním krokem byla samotná fragmentační analýza, která probíhala v Laboratoři sekvenace DNA Přírodovědecké fakulty, Univerzity Karlovy jako servis.

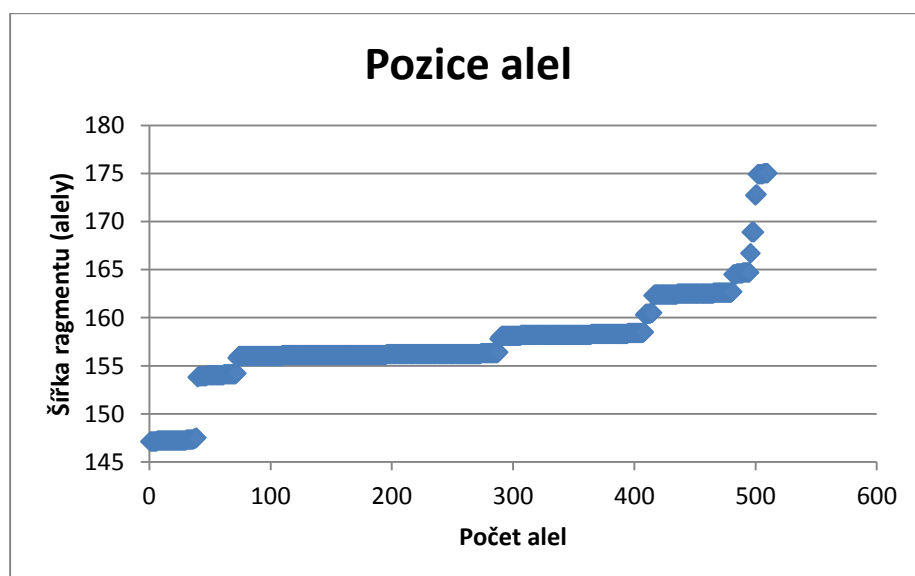
Tabulka č. 4 – Mikrosatelity – velikost PCR produktů a fluorescenční značení.

	Primer	velikost PCR produktu (bp)	fluorescenční barva	chromozom
1.	MCW0083	83 – 92	PET	3
2.	MCW0178	71 – 93	NED	7
3	ADL0020	97 - 112	PET	1

4	ADL0262	100 - 107	6-FAM	23
5	ROS0302	96 - 111	VIC	24
6	ADL0306	115 - 133	NED	3
7	COL1A1	112 - 118	NED	27
8	ADL0112	123 - 132	VIC	10
9.	ADL0123	102 - 141	VIC	11
10	ADL0191	133 - 143	6-FAM	9
11	MCW0217	147 - 175	PET	18
12	ADL0247	163 - 170	VIC	5
13.	MCW0005	210 - 253	VIC	4
14.	ADL0142	227 - 237	6-FAM	6
15.	MCW0219	222 - 239	NED	18
16.	ADL0315	245 - 249	6-FAM	7
17.	LEI0120	274 - 316	VIC	15
18.	MCW0230	260 - 298	NED	11
19.	LEI064	285 - 307	PET	7

3.2.2 Úprava dat v programu GeneMarker

V programu GeneMarker jsem pracovala odděleně s jednotlivými multiplexy. Nejprve bylo nutné do tohoto programu nahrát všechny vzorky daného multiplexu a následně pro tento multiplex vytvořit panely. Pro lepší nastavení rozsahu alel jsem pro jednotlivé mikrosatelitové lokusy vytvořila v programu Microsoft Excel grafy, podle nichž jsem následně upravovala šířku panelů pro jednotlivé alely (Obr. č. 3). Po automatické detekci pomocí panelu proběhla ještě manuální kontrola přechtení každé alely.



Obrázek č. 3 – Příklad grafu mikrosatelitového lokusu MCW0217 - Body tvoří kontinuální bloky, které s velkou pravděpodobností odpovídají jednotlivým alelám. Na základě těchto pozic lze nastavit rozmezí šířky panelu. Na ose Y je zaznamenána délka fragmentů identifikovaných jako alely.

3.2.3 Analýza příbuznosti mezi populacemi a jedinci

3.2.3.1 Odvození populační struktury

Pro odvození populační struktury jsem použila program Structure, který je založen na modelu bayesiánského klastrování na základě dat z multilokusových genotypů (Pritchard et al., 2000; Evanno et al., 2005). S jeho pomocí lze jedince postupně zařadit do skupin (K). Jedinci jsou do těchto skupin tříděni na základě genotypu. Nejlepší počet skupin je detekován pomocí hodnoty delta K. Existují celkem dva modely možného zařazení. Buď lze jedince zařadit pouze do jedné populace (no admixture model) nebo naopak do více populací (admixture model). Pro analýzu jsem použila právě admixture model, ve kterém podle předem určeného počtu skupin, do kterých měli být jedinci řazeni, běžela série nezávislých běhů.

V programu Structure jsem analyzovala nejprve všech 272 jedinců. Všichni tyto jedinci byli pomocí tohoto programu postupně rozdělováni od 2 do 33 skupin (K). Pro každou skupinu běželo 10 běhů zahrnujících 500 000 iterací s délkou burn-in periody 100 000 iterací. V dalším běhu jsem poté analyzovala menší vzorek 110 jedinců, kteří byli potřební pro následnou srovnávací analýzu s imunitními geny (TLR). Jejich potenciální populační struktura byla počítána pro 1 - 25 skupin (K). Výsledná data jsem dále analyzovala v programu Structure Harvester (<http://taylor0.biology.ucla.edu/structureHarvester/>), který nám pomohl odhalit nejlepší počet genetických skupin, do kterých lze naše jedince roztrdit (Earl a vonHoldt, 2011). Práce s daty dále probíhala v programu Clumpak (Kopelman et al., 2015), díky kterému jsme mohli populační strukturu graficky znázornit. Pro každé K běželo 10 nezávislých běhů. Běhy, které si byly nejpodobnější, následně vytvořily graf znázorňující jednotlivá plemena a jejich rozložení v analyzovaných skupinách.

3.2.3.2 Vizualizace příbuznosti jedinců

Program Genetix počítá korespondenční faktoriální analýzu dat (Belkhir et al., 2004). Výstupem z něj je 3D graf, ve kterém jsou zachyceni námi zkoumaní jedinci. Plemena jsou zde rozlišena pomocí barev, a tudíž je dobře viditelné, jak k sobě jejich jednotliví zástupci klastrují. Program lze použít zejména na zjištění populační struktury.

3.2.3.3 Analýza genetické variability

Program Genalex funguje jako přídatný doplněk pro Microsoft Excel (Peakall a Smouse, 2006). Po úpravě dat, kterou tento program vyžaduje, bylo možné vypočítat analýzu molekulární

variance (AMOVA) a zjistit tak, jaký je podíl vysvětlené variability mezi plemeny, uvnitř plemen a mezi jedinci navzájem. Dále bylo pomocí tohoto programu možné detekovat privátní alely a určit celkovou variabilitu jednotlivých plemen.

3.2.3.4 Vizualizace vzájemné podobnosti plemen

Splitstree (Huson a Bryant, 2006) byl výchozím programem pro vizualizaci vzájemné podobnosti plemen. Jako vstupní soubor pro tento program jsem použila genetické distance získané programem Genalex. Na základě nich jsem zkonstruovala strom znázorňující příbuznost starobyklých a moderních plemen.

3.3 Neutrální markery: Mitochondriální DNA (D-loop, cytochrom B)

Dalším vybraným neutrálním markerem byla mitochondriální DNA, a to konkrétně dvě z jejích oblastí – cytochrom B a kontrolní oblast D-loop. V první fázi bylo vybráno 110 jedinců, kteří byli osekvenováni pro oba tyto úseky. Cílem bylo zjistit, jak jsou plemena v těchto oblastech variabilní. Při následné analýze se ukázalo, že osekvenovaný cytochrom B nevykazuje dostatečnou variabilitu. Pro další účely byla tudíž použita pouze data získaná analýzou kontrolní oblasti D-loop. Velikost PCR produktu cytochromu B byla 656 bp a primery navržené pro amplifikaci byly použity podle studie Sorenson et al. (1999). U kontrolního regionu měl PCR produkt velikost 591 bp a primery byly navrženy na referenční sekvenci - GenBank: GQ293096.1, výchozí pro nás byla studie Miao et al. (2013).

3.3.1 Optimalizace PCR a sekvenování

Optimalizace PCR probíhala na 14 jedincích spadajících do 7 různých plemen (Fénixka zakrslá, Japonka čabo, Hedvábnička, Rousná zakrslá, Bojovnice šamo, Holokrčka a Asilka). Použitými reagensy pro PCR bylo 5 µl již kompletního mastermixu Qiagen Multiplex PCR Kit (Qiagen, Cat. No. /ID 206143, Valencia, USA) se všemi potřebnými přísadami (HotStar Taq DNA polymeráza, MgCl₂, PCR pufr a dNTPs) pro správný průběh reakce, 0,6 µl primerů (viz tabulka č. 5); 3,4 µl ddH₂O, primery a 1 µl DNA. PCR reakce probíhala při následujících podmínkách: iniciační denaturace 95° C/15 min, následovalo 35 cyklů denaturace při 94 °C/30 s, nasedání primerů při 60 °C/45 s a extenze při 72 °C/60 s. Závěrečná extenze trvala 10 minut při teplotě 72 °C. Po proběhnutí reakce jsem u všech vzorků následně provedla elektroforetickou detekci PCR produktu, která byla nezbytnou kontrolou správnosti amplifikace. Elektroforéza probíhala na 2% agarózovém gelu po dobu 30 minut, při napětí 120 V. Gel byl připraven z práškové agarózy, pufru TBE a fluorescenčního barviva GoldView (Guangzhou Geneshun Biotech Ltd., Guangdong, China).

S nanášenými vzorky byl do jedné z jamek nanesen i 100 bp žebřík (Thermo Fisher Scientific) pro odhad velikosti PCR produktů.

Tabulka č. 5 – Amplifikační primery pro cytochrom B a D-loop

Primery	F	R
cytochrom B	AACATCTCTGCTTGATGAAA	GGGGTGAAGTTTTCTGGGTCTCC
D-loop	AGGACTACGGCTTGAAAAGC	ATGTGCCTGACCGAGGAACCAG

Po úspěšné optimalizaci jsem stejným způsobem provedla PCR u 110 vybraných jedinců. Po ověření přítomnosti PCR produktů probíhalo jejich přečištění pomocí nukleáz EXOI a CIP (New England Biolabs). Do sekvenační destičky jsem napipetovala 5 µl PCR produktu, 0,05 µl nukleázy EXOI, 0,1 µl fosfatázy CIP a 0,1 µl ddH₂O. Takto připravenou destičku s přečištěnými PCR produkty jsem posléze zaslala do Biogenu, kde probíhala sekvenační reakce pomocí primeru L16750 a finální sekvenování Sangerovou metodou. Sekvenační primer L16750 jsem použila stejný jako studie Miao et al. (2013). Dále byl použit sekvenační primer H522 ze studie Liu et al. (2006).

Tabulka č. 6 – Sekvenační primery pro D-loop

Primer	Sekvence primeru	Orientace
L16750	AGGACTACGGCTTGAAAAGC	F
H522	ATGTGCCTGACCGAGGAACCAG	R

3.3.2 Analýza příbuzenských vztahů mezi plemeny

3.3.2.1 Detekce variabilních pozic

V programu Bioedit (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>) probíhala primární kontrola získaných dat ze sekvenování. Tato data jsem dále analyzovala v internetovém programu Fabox (<http://users-birc.au.dk/biopv/php/fabox/>; Villesen, P. 2007). Bylo zapotřebí provést alignment všech sekvencí a následně zjistit, kolik je v těchto sekvencích variabilních pozic.

3.3.2.2 Konstrukce haplotypových sítí

Program Network (Bandelt et al., 1999) jsem použila pro vizualizaci námi získaných sekvencí do formy haplotypové sítě. Následné grafické úpravy probíhaly v programu Network Publisher. Ve výsledné analýze byla využita i data z článku, který pro nás byl původní inspirací (Miao et al.

2013). Sestrojila jsem díky nim i takový typ haplotypové sítě, který odrážel naše data klastrující k již detekovaným haplotypovým rodinám v tomto zmiňovaném článku.

3.4 Imunitní geny – Toll Like Receptory (TLR)

Na vybraném datasetu 110 jedinců reprezentujících 25 zájmových plemen jsme analyzovali celkem 4 Toll-like receptory, a to konkrétně receptory intracelulární TLR3 a TLR7, dále pak receptory extracelulární TLR4 a TLR5. Cílem bylo osekvenovat protein-kódující regiony u těchto čtyř imunitních genů, odhalit veškeré přítomné nukleotidové varianty (SNVs) a zjistit, jaká je vlastně u těchto genů alelická variabilita.

Primery pro amplifikaci (Tab. č. 7, 9, 11, 13) byly navrženy na referenčních sekvencích (pod přístupovými čísly: TLR3 - NM_001011691.3, TLR4 - NM_001030693.1, TLR5 - NM_001024586.1, TLR7 - NM_001011688.2) najitých na Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>).

3.4.1 Optimalizace PCR a sekvenování vybraných TLR

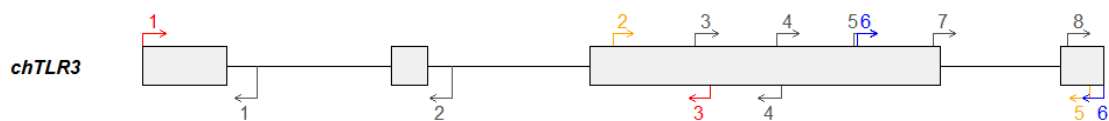
PCR sekvencí jednotlivých TLR prošla složitou, pracnou a dlouhotrvající optimalizací, na které se podílely zejména Mgr. Adéla Šmídová a Mgr. Zuzana Bainová v rámci projektu GAČR P502/12/P179. V následujícím textu shrnuji pouze stručně hlavní aspekty této práce. Při optimalizaci bylo testováno velké množství primerů, z nichž bylo posléze celkově vybráno 20 pro PCR amplifikaci a 38 pro sekvenaci PCR produktů (viz tabulky č. 7 – 14). Měnicími se faktory při PCR reakci byly zejména čas a teplota nasedání primerů, počet cyklů PCR reakce a čas extenze. Dále byla měněna μM koncentrace primerů. Konkrétně u dvou PCR reakcí byla snížena finální koncentrace primerů z $0,3 \mu\text{M}$ na $0,2 \mu\text{M}$. Obecné podmínky společné pro všechny PCR reakce byly: iniciační denaturace při $95 \text{ }^\circ\text{C}$ po dobu 15 minut, denaturace při $94 \text{ }^\circ\text{C}$ po dobu 30 s, extenze při teplotě $72 \text{ }^\circ\text{C}$, dále pak finální extenze $72 \text{ }^\circ\text{C}$ po dobu 5 minut. Pro PCR reakci byl použit Multiplex PCR Master Mix (Qiagen).

Po proběhnutí PCR reakce byly PCR produkty přečištěny pomocí nukleáz EXOI a CIP (New England Biolabs). Po přečištění byly vzorky zaslány do firem GATC Biotech a Macrogen ve kterých zajistili průběh vlastní sekvenační reakce s námi navrženými primery (popsány v následujícím textu).

TLR3

TLR3 byl rozdělen do 3 segmentů, které byly následně amplifikovány pomocí 3 různých párů primerů. Pro každou PCR reakci byl zvlášť vytvořen optimální cyklus zajišťující správnou a kvalitní

amplifikaci PCR produktů. Na sekvenaci bylo celkem využito 11 primerů, z nichž 3 byly původně navrženy jako amplifikační.



Obrázek č. 4 – Lokalizace použitých primerů. Amplifikační primery pro první segment chTLR3-A1 jsou zde zbarveny červeně, pro druhý segment chTLR3-A2 oranžově a pro třetí segment chTLR3-A3 modře. Sekvenační primery jsou zbarveny šedě (Bainová et al., in prep.).

Tabulka č. 7 - Amplifikační primery pro TLR3

Primery pro PCR reakci	Velikost PCR produktu		Primery
chTLR3-A1	2959 bp	F	ATGGGATGCTCTATTCCTTGCTGGA
		R	GGAGGAAAATGCCCACTTTC
chTLR3-A2	2481 bp	F	CTCACTGAGCCATGTGAAGC
		R	TGGCCAGTTCAAGATGCAGC
chTLR3-A3	1288 bp	F	GTACTCTGGTGTTCATTTTG
		R	TCAGCGCACTTTACTATTAGTT

Variabilní podmínky PCR reakce:

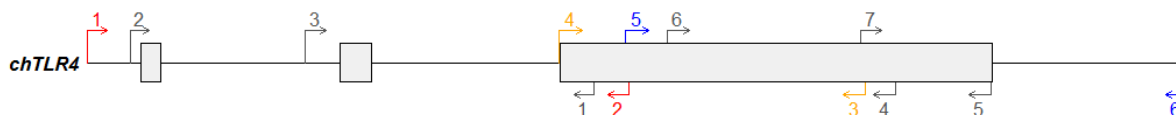
- **první segment a nastavené podmínky PCR reakce** – nasedání primerů při teplotě 62 °C/40 s; závěrečné dosyntetizování řetězce probíhá po dobu 2,5 minut; finální koncentrace primerů 0,2 μM; 35 cyklů.
- **druhý segment a nastavené podmínky PCR reakce**– nasedání primerů při teplotě 61 °C/40 s; závěrečné dosyntetizování řetězce probíhá po dobu 3 minut; finální koncentrace primerů 0,3 μM; 35 cyklů.
- **třetí segment a nastavené podmínky PCR reakce** – nasedání primerů při teplotě 58 °C/60 s; závěrečné dosyntetizování řetězce probíhá po dobu 3 minut; finální koncentrace primerů 0,3 μM; 35 cyklů.

Tabulka č. 8 – Sekvenační primery pro TLR3.

Sekvenační primery	Sekvence primeru	Orientace	Segment
chTLR3_R1	CTGACATAATAAGCCACTAGGCC	R	1
chTLR3_R2	GCAGGCTTGATCTTGATAGATGC	R	1
chTLR3_F3	GCTAATTCCAGCTTGCAGGTTCTC	F	2
chTLR3_F4	TTGGAAATGTGCAAACCCAGGAGG	F	2
chTLR3_R4	AGGTCCTCCTGGGTTTGCACATTT	R	2
chTLR3_F5	CCTAAATATCACGGTACTCTGG	F	2
chTLR3_F7	GTGACTGAACATCTCTTACAGGA	F	3
chTLR3_F8	GTCGAGACTCCATCATACTGATC	F	3
chTLR3_R3-A1	GGAGGAAAATGCCCCACTTTC	R	1
chTLR3_R5-A2	TGGCCAGTTCAAGATGCAGC	R	2
chTLR3_R6-A3	TCAGCGCACTTTACTATTAGTT	R	3

TLR4

TLR 4 byl stejně jako TLR3 rozdělen do 3 segmentů a následně amplifikován 3 páry speciálně navržených primerů. Optimalizace PCR u tohoto TLR se opět týkala hlavně času a teploty nasedání primerů, počtu cyklů PCR reakce, času extenze a μ M koncentrace primerů.



Obrázek č. 5 - Lokalizace použitých primerů. Amplifikační primery pro první segment chTLR4-A1 jsou zde zbarveny červeně, pro druhý segment chTLR4-A2 oranžově a pro třetí segment chTLR4-A3 modře. Sekvenační primery jsou zbarveny šedě (Bainová et al., in prep.).

Tabulka č. 9 – Amplifikační primery pro TLR4.

Primery pro PCR reakci	Velikost PCR produktu		Primery
chTLR4-A1	2830 bp	F	GGCATTCAAGTGACATCACAC
		R	ACGTGAGGTTGAGCCTGTTTGT

chTLR4-A2	1601 bp	F	GGTGCCACCTCCATACAATAGAAG
		R	TCATGTAGGCAGGTGTGTGGCATA
chTLR4-A3	2927 bp	F	AGGCTCAACCTCACGTTGGTACTT
		R	GCAAGCAAACACAGCATCCAG

Variabilní podmínky PCR reakce:

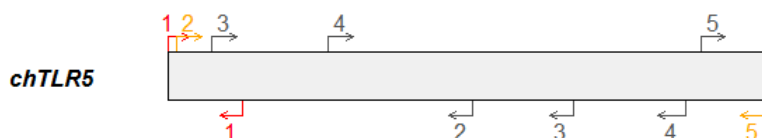
- **první segment a nastavené podmínky PCR reakce** – nasedání primerů při teplotě 61 °C/30 s; závěrečné dosyntetizování řetězce probíhá po dobu 2,5 minut; finální koncentrace primerů 0,3 μM; 35 cyklů.
- **druhý segment a nastavené podmínky PCR reakce** – nasedání primerů při teplotě 60 °C/40 s; závěrečné dosyntetizování řetězce probíhá po dobu 100 s; finální koncentrace primerů 0,3 μM; 35 cyklů.
- **třetí segment a nastavené podmínky PCR reakce** – nasedání primerů při teplotě 62 °C/30 s; závěrečné dosyntetizování řetězce probíhá po dobu 2,5 minut; finální koncentrace primerů 0,2 μM; 33 cyklů.

Tabulka č. 10 – Sekvenační primery pro TLR4.

Sekvenační primery	Sekvence primeru	Orientace	Segment
chTLR4_F2	GTCCTTTGCTCCGCATCCC	F	1
chTLR4_F3	GGTCCTATTAGAAGCAGGACAG	F	1
chTLR4_R1	GATGGGTAGGTCAGACAGAG	R	1
chTLR4_F6	CTCTTGAGTGGACTGTGTCAGG	F	2
chTLR4_F7	GATATGCCACACACCTGCCTAC	F	3
chTLR4_R4	CACTGAGCAGCACCAATGAGTAG	R	3
chTLR4_R5	GAGTTTTATCTCCTCGTGATTCC	R	3
chTLR4_F4-A2	GGTGCCACCTCCATACAATAGAAG	F	2
chTLR4_F5-A3	AGGCTCAACCTCACGTTGGTACTT	F	3
chTLR4_R6-A3	GCAAGCAAACACAGCATCCAG	R	3

TLR5

TLR 5 byl rozdělen do dvou segmentů a následně amplifikován pomocí 2 párů primerů. Optimalizace PCR u TLR5 se týkala hlavně času a teploty nasedání primerů a času extenze. Následná sekvenační reakce probíhala s 8 primery, z nichž 2 byly použity již v předešlé amplifikaci.



Obrázek č. 6 - Lokalizace použitých primerů. Amplifikační primery pro první segment chTLR5-A1 jsou zde zbarveny červeně, pro druhý segment chTLR5-A2 oranžově. Sekvenační primery jsou zbarveny šedě (Bainová et al., in prep.).

Tabulka č. 11 – Amplifikační primery pro TLR5.

Primery pro PCR reakci	Velikost PCR produktu		Primery
chTLR5-A1	327 bp	F	ATGATGTTACATCAACGGC
		R	GAATGTTATTGAACCCCAGG
chTLR5-A2	2554 bp	F	CACTAGCTGGAGATATATGTGC
		R	CATCAACTGTCAGTGTGAGAC

Variabilní podmínky PCR reakce:

- **první segment a nastavené podmínky PCR reakce** – nasedání primerů při teplotě 56 °C/60 s; závěrečné dosyntetizování řetězce probíhá po dobu 30 s; finální koncentrace primerů 0,3 μM; 35 cyklů.
- **druhý segment a nastavené podmínky PCR reakce** – nasedání primerů při teplotě 62 °C/60 s; závěrečné dosyntetizování řetězce probíhá po dobu 2,5 minut; finální koncentrace primerů 0,3 μM; 35 cyklů.

Tabulka č. 12 – Sekvenační primery pro TLR5.

Sekvenační primery	Sekvence primeru	Orientace	Segment
--------------------	------------------	-----------	---------

chTLR5_F3	GCAACTTCATTTCCACTGCTGG	F	2
chTLR5_F4	GGACGTTAGTGAGAATGGCTGG	F	2
chTLR5_R2	GGTCACCCAGATTTGCGAGCC	R	2
chTLR5_R3	GCACAGTCACAGACATACTTG	R	2
chTLR5_R4	CCAAATGGCATCACGAATATTGTTG	R	2
chTLR5_F5	GCCTTTAATTTTGCCAGAGC	F	2
chTLR5_R1-A1	GAATGTTATTGAACCCCAGG	R	1
chTLR5_R5-A2	CATCAACTGTCAGTGTGAGAC	R	2

TLR7

TLR7 byl stejně jako receptor TLR5 rozdělen do 2 segmentů a poté amplifikován pomocí 2 párů primerů. Jeho optimalizace se týkala hlavně teploty nasedání primerů, počtu cyklů a času extenze. Následná sekvenace probíhala celkem s 9 primery, z nichž 2 byly použity již v předešlé PCR reakci.



Obrázek č. 7 - Lokalizace použitých primerů. Amplifikační primery pro první segment chTLR7-A1 jsou zde zbarveny červeně, pro druhý segment chTLR7-A2 oranžově. Sekvenační primery jsou zbarveny šedě (Bainová et al., in prep.).

Tabulka č. 13 – Amplifikační primery pro TLR7.

Primery pro PCR reakci	Velikost PCR produktu		Primery
chTLR7-A1	4207 bp	F	AAAGCAGTGGTTGCTGCTGTTGTC
		R	GCCACTGAGATCAAGAATTTCTAGG
chTLR7-A2	3122 bp	F	TTGTGGAGATTGACTTCAGGTG
		R	GCTGCAAATGCTGAATGAGGTG

Variabilní podmínky PCR reakce:

- **první segment a nastavené podmínky PCR reakce** – nasedání primerů při teplotě 62 °C/40 s; závěrečné dosyntetizování řetězce probíhá po dobu 4 minut; finální koncentrace primerů 0,3 μM; 38 cyklů.

- **druhý segment a nastavené podmínky PCR reakce** – nasedání primerů při teplotě 61 °C/40 s; závěrečné dosyntetizování řetězce probíhá po dobu 2,5 minut; finální koncentrace primerů 0,3 μM; 38 cyklů

Tabulka č. 14 – Sekvenační primery pro TLR7.

Sekvenační primery	Sekvence primeru	Orientace	Segment
chTLR7_F3	TGCCCACGTTGCTATAACGC	F	2
chTLR7_F4	GGTCGAAGTTGCAAGTCCAAAG	F	2
chTLR7_F5	GATGGAAAGCCAATCTCTTCA	F	2
chTLR7_R2	CGGAGTATCAGTTCTTGGAGAG	R	2
chTLR7_F6	GTGATGCAGTATGGTTTGTGGG	F	2
chTLR7_F1-A1	AAAGCAGTGGTTGCTGCTGTTGTC	F	1
chTLR7_F2-A2	TTGTGGAGATTGACTTCAGGTG	F	2
chTLR7_R1-A1	GCCACTGAGATCAAGAATTTCTAGG	R	1
chTLR7_R3-A2	GCTGCAAATGCTGAATGAGGTG	R	2

3.5 Neutrální jaderné geny

Od počátku projektu byla plánována analýza příbuznosti plemen na základě variability sekvencí jaderných neutrálních markerů stanovených pomocí amplikonového sekvenování druhé generace (next generation sequencing, NGS, na platformě Illumina MiSeq). Plánována byla dvoukroková PCR, kdy v první PCR měly být amplifikovány zájmové úseky vybraných genů a ve druhé PCR měly být amplikony označeny indexy umožňujícími identifikaci sekvencí pocházejících z jednotlivých jedinců. S ohledem na požadavky zvolené sekvenační metody jsem pro první PCR navrhovala amplifikační fragmenty o velikosti 450 – 490 bp. Při volbě vhodných nukleárních markerů pod neutrální evolucí jsem vycházela ze tří studií: Borge et al. (2005); Backstrom et al. (2006) a Backstrom et al. (2007). Mým cílem bylo najít markery s co nejvyšší mírou genetické variability o vhodné velikosti rovnoměrně rozprostřené přes celý genom (snažila jsem se pokrýt všechny velké chromozomy, které se v genomu kura nacházejí). Celkem jsem navrhla primery pro 25 genů nacházejících se na 22 různých chromozomech (viz tabulka č. 15).

Tabulka č. 15 – Vybrané jaderné geny, místo lokalizace a seznam použitých primerů

	Gen	Chromozom	Orientace	Sekvence primerů
1	VLDL	Z	F	GCTACTTCATGTGGCGTAA
			R	ACTGGGATGGAGTAAACC

2	GLDC	Z	F	CGATGACATACTATGG
			R	GCTTTAGTCAGTTCTC
3	GLDC	Z	F	CCTGGGTGTATATCAAG
			R	GTGGCTCATTTACAGC
4	DLD	1	F	GCAAATCTGGGACTTGAAGAC
			R	GCAACTACATCACCAATAGCATAG
5	UCHL3	1	F	TTCCCTACGTCTCTGAGTCA
			R	TGGGTTTGGGCAGAATGGAA
6	PSMC2	1	F	CCTTTACAGGTTGCCAG
			R	GTCTGCGTTGATTATC
7	LAMA1	2	F	TCATGCGGAAGTCTGAGCTGTT
			R	AATGGAGGTGTGGCTCTGAG
8	LBR	3	F	TCTGTGAGTTACGTCCAGGA
			R	GCCAAGAGCATTGCCAAGTT
9	IGF2R	3	F	TGCAGTGTGACATCAGGGTT
			R	TCTCACTCAAGGAGGAATACAGT
10	CHMP1B	4	F	AATGGCAGATGAAGCAGGGT
			R	TCCATGTTTCAAGTCAAGACTACAGA
11	FTH	5	F	GCACTCATGAACAGCACTTTG
			R	GTCACACAAGTGGGAGGAGGA
12	FAS	6	F	GAAAGTGCTAGGCAGGAGGA
			R	GTGTAAAGCCAGAAGGG
13	FN1	7	F	TGTCTTTGACTACAGTAAAGCCAGA
			R	CACATGGGAAAAGAAGTGAA
14	ALAS1	12	F	AAAGCTCCGTGGTCATTGAG
			R	AGGAGGGCAGAGAGAAAGGA
15	ACTB	14	F	AGATTCCATGCCCCCTTCTGC
			R	TCATTGTGCTAGGTGCCAGG
16	RPL7A	17	F	TGGCATTGGTGAGTAAGGGG
			R	TCACGCTTGGGCTGGATATC
17	CHC	19	F	ATTGAAGAAGACTACCAGGTATGT
			R	ACGGGCTACAGACAGTACAAAA
18	ENO1	21	F	AGATCCCAACATGCAGAGTTCT
			R	GCTCGCTCTTAATAGGTACAA
19	ACL	2	F	ACTTCTCCTCAATGCCAGC
			R	TCATCAGGTTTGGATTCCGGAGA
20	EBF2	22	F	CAGGATTTACCATAGCATTG
			R	CTTTCTGATGGGCACCTG
21	HMGN2	23	F	GTGTTACATCAGCAAGTTACTG
			R	GTCACCAGAAGTACACAGTTATC
22	RPS10	26	F	GTTGTGAGACAGAGGAAAG
			R	GATAAAGGCAGAAGAGTGC
23	ANP32B	28	F	GTGAGGCTCTCTGTCATTAC
			R	CATCATCAGCTTCATCATCTTC

24	TM2D2	10	F	CTACTTCAGGGCAGCAG
			R	CAACACTCAGCACAGACTC
25	HARS	13	F	CGCTTTGGTCAGTGAGAG
			R	GGTTGAACAGCAAGGAGG

Sekvence jednotlivých jaderných genů jsem vyhledávala v databázi Ensembl (<http://www.ensembl.org/index.html>). Při volbě primerů jsem kladla důraz na minimalizaci rizika dimerizace navrhovaných primerů (posuzováno na základě vazebné energie), podobnost teploty tání a poměr CG bazí (40 – 60 %). Při navrhování primerů jsem se snažila navrhovat sekvence tak, aby se na koncích primerů (především na 3'konci) vyskytovaly báze C nebo G, které zajišťují lepší ukotvení primeru. Všechny tyto nezbytné aspekty pro správné fungování PCR reakce jsem ověřovala v programu Oligoanalyser (<http://eu.idtdna.com/calc/analyzer>).

Optimalizace první PCR reakce probíhala společně pro neutrální jaderné geny a imunitní geny TLR. Nejprve jsem zkoušela, zdali pro všechny vybrané geny fungují správně primery. Správnost PCR byla následně ověřena pomocí gelové elektroforézy. Dále bylo důležité vytvořit z jednotlivých genů multiplexy. U celkem 8 vytvořených multiplexů byla posléze též provedena PCR a následná kontrola PCR produktu na agarózovém gelu. U všech vybraných vzorků proběhla PCR reakce, při které byly amplifikovány všechny vybrané oblasti analyzovaných genů. Průběh PCR reakce: iniciační denaturace 95 °C/15 min, následovalo 10 cyklů denaturace při 94 °C/30 s, nasedání primerů při 60 °C/75 s a extenze při 72 °C/30 s. Závěrečná extenze trvala 10 minut při teplotě 68 °C. První PCR probíhala v malém počtu cyklů ve snaze minimalizovat riziko vzniku PCR artefaktů.

Pro analýzu bylo vybráno 192 vzorků reprezentujících 22 zájmových plemen, které jsem následně zaslala Dr. Vladimíru Benešovi do EMBLu v Heidelbergu, kde měla být provedena druhá PCR s indexy značenými primery a vzniklé amplikony měly být osekvenovány na přístroji Illumina MiSeq). Bohužel analýza ukázala, že při první PCR vznikaly v multiplexech krátké nespecifické produkty o délce 200 bp a ty po prvních deseti cyklech výrazně převažovaly nad požadovanými amplikony. Proto s těmito produkty nebylo možné dále pracovat. Snažili jsme se zjistit, kde přesně v celém procesu došlo k chybě. Nejdříve jsme zkoušeli správnou funkčnost primerů po první a druhé PCR. Naamplifikovali jsme PCR produkty s primery pro 1. a 2. PCR v počtu 15 a 25 cyklů a pomocí gelové elektroforézy ověřili, že primery fungují. Chybu bylo potřebahledat jinde. Zopakovali jsme tedy vše, co dělali v EMBLu. Naamplifikovali jsme všechny vytvořené multiplexy pro 2 vzorky a pustili obě kola PCR. Následně jsme se snažili najít nespecifity multiplexů po provedení 2. PCR. Až po tomto kroku jsme došli ke zjištění, co se stalo s naším 500 bp produktem. Při optimalizaci počtu PCR cyklů se ukázal počet cyklů 1. PCR mnohem zásadnějším, než se zprvu zdálo. Po 10 cyklech PCR reakce nám vzniklo příliš málo specifického templátu. Druhým problémem však zůstala

existence nesespecifického PCR produktu, který zabraňoval sekvenování (to bylo velmi výrazné zvláště u čtyř multiplexů). Tento problém se již bohužel nepodařilo vyřešit ani za použití klonování a sekvenování nesespecifických produktů. Mou domněnkou je, že chyba nejspíše spočívala v dimerizujících primerech. Přes veškerou snahu se mi však nepodařilo zjistit, o které dvojice primerů v multiplexu šlo. Je možné, že další optimalizace primerů a úplně nové sestavení multiplexů mohly přispět k úspěšné analýze. Časová kapacita na řešení tohoto problému však přesáhla mé možnosti a musela jsem proto tuto část projektu ukončit.

4. Výsledky

4.1 Obecná charakteristika genetické variability studovaných plemen

Variabilita plemen detekovaná na základě analýzy mikrosatelitů

Celkem jsem analyzovala 19 mikrosatelitových lokusů u 272 jedinců reprezentujících 33 zájmových plemen. Pro závěrečné srovnání s TLR však bylo použito pouze 110 vybraných jedinců, 25 plemen. Lokusy vykazovaly různé stupně variability (Tabulka č. 16). Jako nejméně variabilní byl shledán mikrosatelitový lokus ADL0315, u kterého byly detekovány pouze 3 alely. Největší variabilita byla naopak pozorována u lokusu MCW005, ve kterém bylo zjištěno 25 možných alel. Dalším faktorem, který jsem u všech lokusů sledovala, bylo procento heterozygotních jedinců. Nejvyšší počet heterozygotních jedinců byl zjištěn u lokusu LEI120. Naopak nejnižší podíl byl pro lokus MCW0219. Celkem bylo u porovnávaných 272 jedinců detekováno 37 privátních alel z celkového počtu 197 alel (tabulka č. 17). Nejvíce privátních alel bylo nalezeno v lokusu MCW005, kde mělo po jedné privátní alele 8 plemen. Jako plemeno nejbohatší na privátní alely se ukázaly Velsumky, které jich měly celkem 5 na pěti lokusech (tabulka č. 17).

Tabulka č. 16 – základní charakteristika mikrosatelitů

	Lokus	počet alel	heterozygotnost
1.	MCW0083	5	53,3 %
2.	MCW0178	8	33,5 %
3	ADL0020	8	43,8 %
4	ADL0262	7	40,4 %
5	ROS0302	8	48,2 %
6	ADL0306	7	57,4 %
7	COL1A1	7	50,7 %
8	ADL0112	4	38,6 %
9.	ADL0123	14	38,2 %
10	ADL0191	6	50,7 %
11	MCW0217	10	52,6 %
12	ADL0247	6	32,4 %
13.	MCW0005	18	51,5 %
14.	ADL0142	5	41,9 %
15.	MCW0219	9	30,9 %
16.	ADL0315	3	41,5 %
17.	LEI0120	16	64,0 %
18.	MCW0230	10	36,0 %
19.	LEI064	12	60,0 %

Tabulka č. 17 - Detekované privátní alely – analýza mikrosatelitových markerů.

	Lokus	Počet privátních alel	Plemena
1.	ADL0020	2	Kočinky zdrobnělé, Velsumky

2.	ADL0123	4	Asilky, Barneveldky, Orlovky, Velsumky
3.	ADL0142	1	Maransky
4.	LEI0120	4	Brahmánky, Maransky, Orlovky, Velsumky
5.	LEI064	-	-
6.	MCW0178	4	Asilky (2 alely), Australky, Plymutky
7.	MCW0219	1	Bojovnice šamo
8.	MCW0230	4	Bojovnice šamo, Fénixky, Hedvábničky, Japonky čabo
9.	ADL0315	-	-
10.	ADL0112	2	Plymutky, Velsumky
11.	ADL0191	2	Barneveldky, Paduánky zdrobnělé
12.	ADL0247	1	Australky
13.	ADL0262	-	-
14.	ADL0306	1	Plymutky
15.	COL1A1	-	-
16.	MCW0005	8	Araukany, Barneveldky, Hedvábničky, Jokohamky, Malajky, Paduánky zdrobnělé, Rousné zakrslé, Velsumky
17.	MCW0083	-	-
18.	MCW0217	1	Holokrčky
19.	ROS0302	2	Asilky, Japonky čabo

Variabilita plemen detekovaná na základě analýzy TLR

Analýza imunitních genů proběhla celkem u 110 jedinců spadajících do 25 plemen (Bainová et al., in prep.). V rámci tohoto souboru jedinců bylo detekováno 38 nukleotidových variant (SNV) v TLR3, 27 SNV v TLR4, 19 SNV v TLR5 a 20 SNV v TLR7. Z těchto nalezených nukleotidových variant se jich ve frekvenci vyšší než 1 % nacházelo celkem 90. Vzhledem k frekvenci jsou značeny již jako nukleotidové polymorfismy (SNP). TLR3 mělo z celkového množství detekovaných nukleotidových variant 34 SNP, TLR4 26 SNP, TLR5 15 SNP a TLR7 též 15 SNP. Z hlediska alelické variability se jako nejvariabilnější ukázal TLR4. Bylo u něj detekováno celkem 70 alel. Nejnižší alelickou variabilitu naopak vykazoval TLR5 s pouhými 22 alelami a TLR7 s 26 alelami. U TLR3 bylo nalezeno 36 alel. V analyzovaném souboru jedinců bylo dále detekováno 101 privátních alel z celkového počtu 154 alel (Tabulka č. 18).

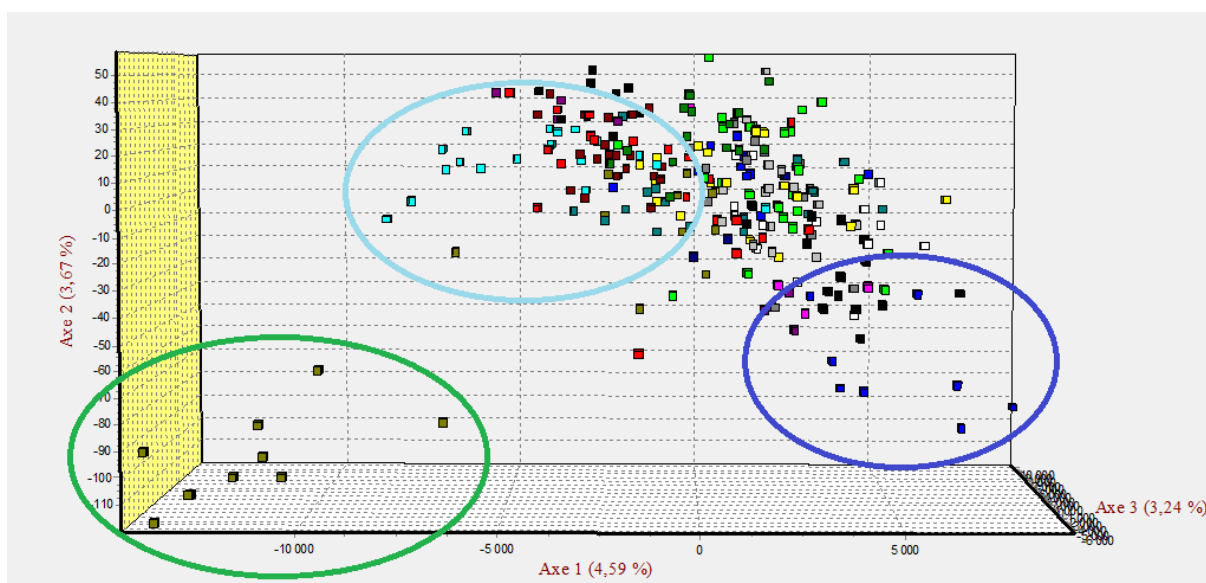
Tabulka č. 18 – Základní charakteristika TLR.

	Receptor	Počet alel	Heterozygotnost	Počet privátních alel	Plemena s nejvyšším počtem privátních alel
1.	TLR3	36	62,7 %	22	Bojovnice šamo, Japonky čabo
2.	TLR4	70	56,4 %	52	Araukany
3.	TLR5	22	51,8 %	12	Araukany, Bantamky, Barneveldky zdrobnělé, Bojovnice šamo, Češky
4.	TLR7	26	60,9 %	15	Hedvábničky

4.2 Zmapování hrubého rámce původu moderních plemen mezi starobylými plemeny

Výchozím předpokladem při mapování původu plemen bylo sdílení genetických znaků mezi starobylými a moderními plemeny. Analýza těchto znaků byla směřovaná zejména pro identifikaci jednotlivých plemen a odhalení jejich vzájemné příbuznosti. Analyzovala jsem data získaná fragmentační analýzou 19 mikrosatelitových lokusů u 272 jedinců reprezentujících jak starobylá, tak moderní plemena.

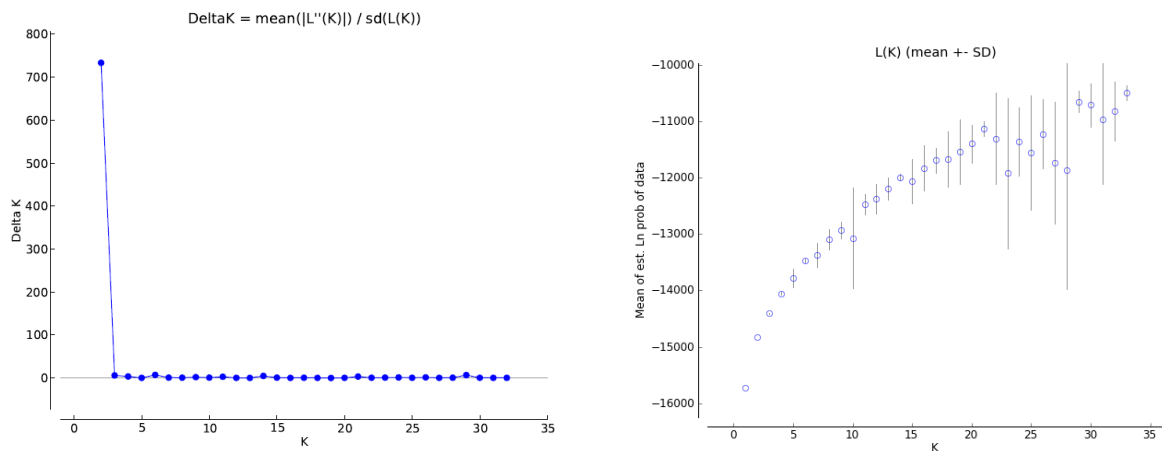
Nejprve jsem mikrosatelitová data analyzovala v programu Genetix, který mi poskytl první náhled na strukturu dat. Z 3D grafu je patrné, že většina jedinců klastruje blízko u sebe a to napříč plemeny. Pouze několik jedinců je viditelně vychýlených od hlavní skupiny. Většinou se ukazuje, že jedinci v rámci plemen jsou si příbuzní a nacházejí se ve stejné části grafu. Viditelně odlišné je plemeno Orlovka, které tvoří zcela osamocený shluk, a dále pak plemena Japonka čabo a Česka, která jsou distribuována na okrajích hlavního klastru.



Obrázek č. 8 – 3D model znázorňující příbuznost plemen na základě korespondenční faktoriální analýzy mikrosatelitních markerů v programu Genetix. Výrazně odchýlená jsou plemena Orlovka (zeleně), Česka (světle modře) a Japonka čabo (tmavě modře).

Data byla dále analyzována v programu Structure, kde došlo k jejich postupnému zařazování od 2 do 33 skupin (K; obrázek č. 28 v příloze). Při menších hodnotách K bylo dobře pozorovatelné, která plemena k sobě vzájemně klastrují. Zvětšující se K ukazuje, jak se jedinci postupně rozpadají

do jednotlivých plemen. Jako nejlepší K byly určeny $K = 2$, $K = 3$, $K = 6$, $K = 14$ a $K = 29$ (Obrázek č. 9). Na základě nich lze naše data nejlépe popsat a interpretovat.

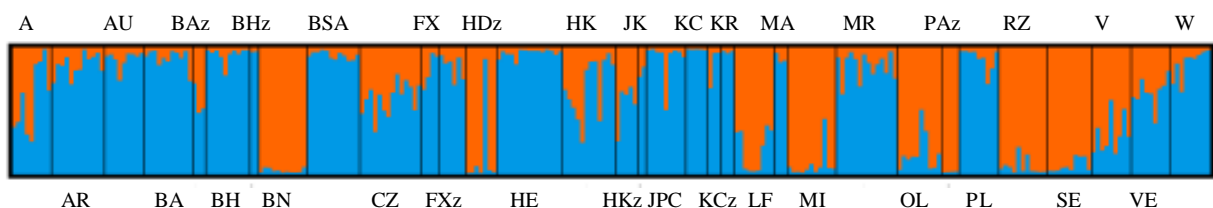


Obrázek č. 9 – Grafické zobrazení optimálních K, která nám mohou pomoci vysvětlit populační strukturu (Evanno et al., 2005). Na druhém obrázku je zobrazena pravděpodobnost běhů. Zohledněn zde není pouze nárůst pravděpodobnosti jednotlivých K, nýbrž i jejich rozptyl.

Tabulka č. 19 – Nejlepší nalezené K, do kterých mohou být analyzovaní jedinci rozděleni. Jako nejlepší byly určeny zejména $K = 2$, $K = 6$ a $K = 29$. Hodnota delta K slouží jako indikátor pravděpodobnosti daného K (Evanno et al., 2005).

Nejlepší skupiny	delta K
$K = 2$	733.552633
$K = 3$	5.985441
$K = 6$	7.128601
$K = 14$	4.805431
$K = 29$	6.713204

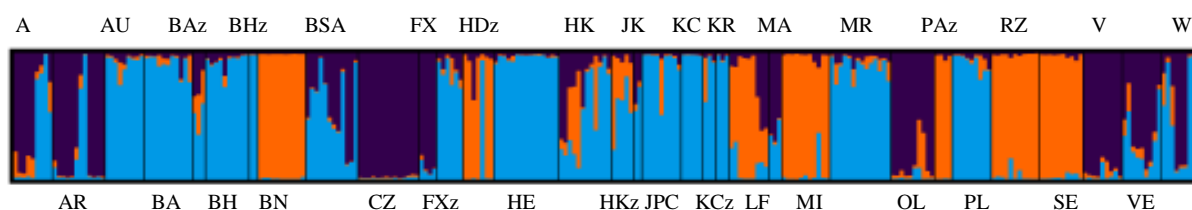
K = 2



Obrázek č. 10 – $K = 2$ – Detekce populační struktury při rozdělení plemen do 2 skupin.

Při $K = 2$ (Obrázek č. 10), které se ukázalo jako výrazně nejlepší pro popis populační struktury (Tab. č. 19), spolu do stejné skupiny zdatelně spadají Bantamky, Holandské chocholaté zdrobnělé, Laflešky, Minoroky, Orlovky, Paduánky zdrobnělé, Rousné zakrslé, Sebritky a Vlašky. Kromě Bantamek, které pocházejí z Jávy, byla zbylá plemena vyšlechtěna v Evropě. Do druhé skupiny pak patří Araukany, Australky, Barneveldky, Brahmánky, Brahmánky zdrobnělé, Bojovnice šamo, Fénixky, Fénixky zdrobnělé, Holandřanky zdrobnělé, Hedvábničky, Jokohamky, Japonky čabo, Kočinky, Kočinky zakrslé, Kadeřavé slepice, Malajky, Maransky, Plymutky a Wyandotky. Tato skupina je značně heterogenní, spadají do ní jak plemena starobylá, tak plemena moderní. Plemena Araukana, Češka, Holokrčka, Holokrčka zakrslá a Velsumka sdílejí intermediální alelické frekvence mezi oběma skupinami.

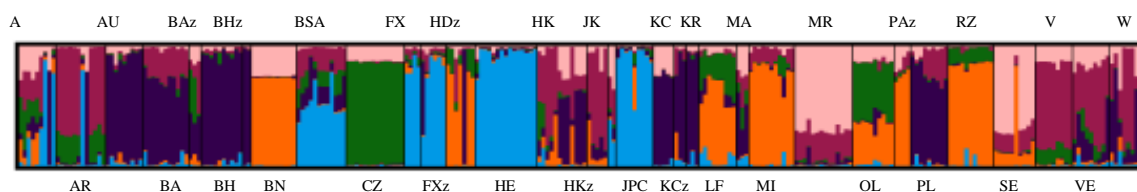
K = 3



Obrázek č. 11 – $K = 3$ - Detekce populační struktury při rozdělení plemen do 3 skupin.

V případě rozdělení analyzovaných jedinců do 3 skupin (Obr. č. 11) k sobě nejvíce spadají Bantamky, Holandské chocholaté zdrobnělé, Laflešky, Minoroky, Paduánky zdrobnělé, Rousné zakrslé a Sebritky. Kromě Orlovek, které se od této skupiny oddělily, spolu stále klastrují stejná plemena jako v předchozím běhu při $K = 2$. Orlovky nově spadají do skupiny s plemeny Araukana, Asilka, Češka, Fénixka, Velsumka a Vlaška. Lze pozorovat poměrně vyvážené zastoupení jak starobylých, tak moderních plemen. Do poslední skupiny se stejně jako v předchozím běhu jednoznačně zařadily Australky, Barneveldky, Brahmánky, Brahmánky zdrobnělé, Fénixky zdrobnělé, Kočinky, Kočinky zakrslé, Kadeřavé slepice, Maransky a Plymutky. Zbylá plemena měla sdílené znaky se všemi skupinami a nebylo možné je v tomto běhu s jistotou zařadit.

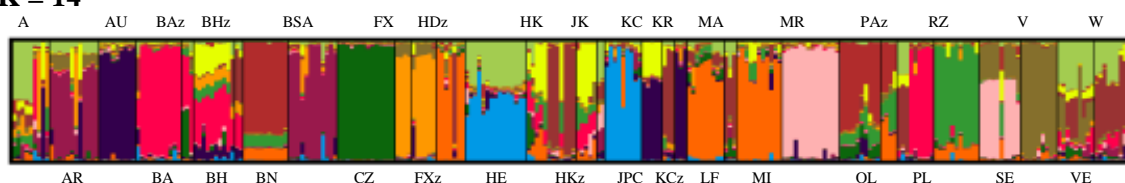
K= 6



Obrázek č. 12 – $K = 6$ - Detekce populační struktury při rozdělení plemen do 6 skupin.

V případě $K = 6$ se již mnohá plemena neshlukují do uniformních populací (Obr. č. 12). Přesto si Bantamky stále udržují nejvyšší podobnost s plemeny Holandská chocholatá zdrobnělá, Lafleška, Minorka, Paduánka zdrobnělá a Rousná zakrslá. Od této skupiny se oddělilo plemeno Sebritky, které utváří novou skupinu společně s Maranskami. Další skupinu tvoří Australky, Barneveldky, Brahmánky, Brahmánky zdrobnělé, Kadeřavé slepice, Kočinky, Kočinky zakrslé a Plymutky. Ve společné skupině se spolu stále udržují plemena Bojovnice šamo, Fénixka, Fénixka zdrobnělá, Hedvábnička a Japonka čabo. Od zbytku plemen se výrazně oddělují Česky. Poslední vytvořená skupina je složena z plemen Araukany, Holokrčky zdrobnělé, Vlašky a Velsumky.

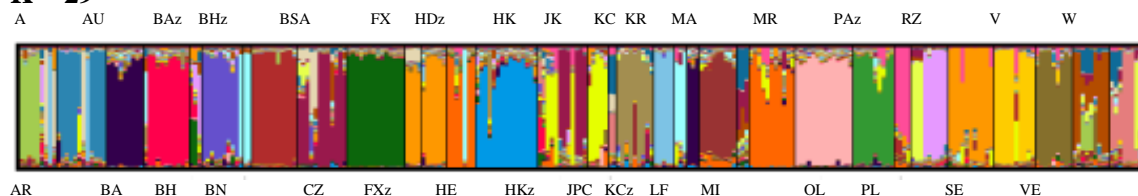
K = 14



Obrázek č. 13 – $K = 14$ - Detekce populační struktury při rozdělení plemen do 14 skupin.

Další rozdělení (Obr. č. 13) přináší ještě více změn než rozdělení předchozí. Plemena se začínají více lišit a objevuje se mnoho jasných nových vztahů. Mnohá z těchto plemen se již začínají rozpadat do vlastních skupin, což poukazuje na jejich vnitřní homogenitu. Svou skupinu si stále drží Holandské chocholaté zdrobnělé, Laflešky a Minorky. Dochází k oddělení Bantamek, které vytvářejí novou skupinu s Orlovkami. Česky si udržují své postavení a tvoří samostatnou skupinu. Svou vlastní skupinu si vytvářejí i Fénixky a Fénixky zakrslé. Araukany se ukazují jako značně heterogenní. Nejvíce však sdílejí znaky s Bojovnicemi šamo. V jedné z původních skupin zůstávají již jen Hedvábničky a Japonky čabo. Australky společně s Kočinkami a Kadeřavými slepicemi též spadají do samostatné skupiny. Vlastní skupinu si vytvářejí nejen Vlašky, ale i Rousné zakrslé. Barneveldky klastrují společně s Barneveldkami zdrobnělými, Brahmánkami a Plymutkami.

K = 29

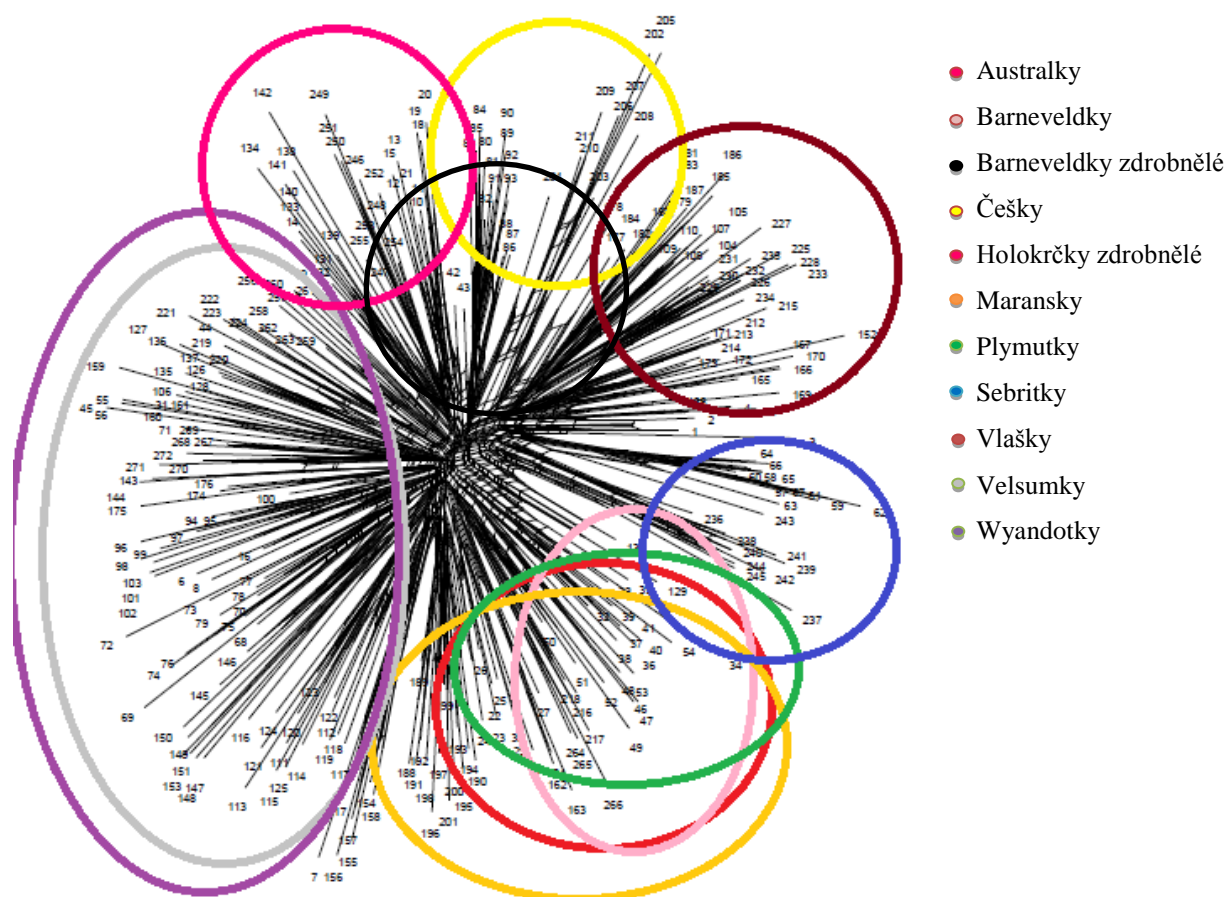


Obrázek č. 14 – $K = 29$ - Detekce populační struktury při rozdělení plemen do 29 skupin.

Při $K = 29$ je zřetelně vidět, že si každé z plemen vytváří svou vlastní skupinu (Obr. č. 14). Určitá plemena stále vykazují výrazné sdílení znaků s některými skupinami, avšak většinou již zůstávají ustálené ve své vlastní skupině. Heterogenita je nejvíce pozorovatelná v plemenech Asilka, Araukana, Barneveldka zdrobnělá, Bojovnice šamo, Holokrčka, Jokohamka, Malajka, Velsumka a

Wyandotka. Naopak jako nejvíce ustálená se ukazují plemena Bantamka, Barneveldka, Češka, Kočinka a Maranska.

Pomocí genetických distancí mikrosatelitů jsem v programu Splitstree zkonstruovala strom, který popisuje vzájemnou podobnost plemen. Díky sdíleným alelám skoro všechna plemena klastrovala do skupin, které byly detekované již v programu Structure.



Obrázek č. 15 – Zobrazení vzájemné podobnosti plemen v programu Splitstree. Barevně jsou zakroužkované oblasti, kde se nacházejí moderní plemena a jim příbuzná starobylá plemena.

Výsledky analýzy klastrování plemen z programu Structure korespondují s distancemi mezi plemeny zjištěnými v programu Genalex a vizualizovanými v programu Splitstree. Příbuznost moderních plemen plemenům starobylým je vyznačena v Tabulce č. 20.

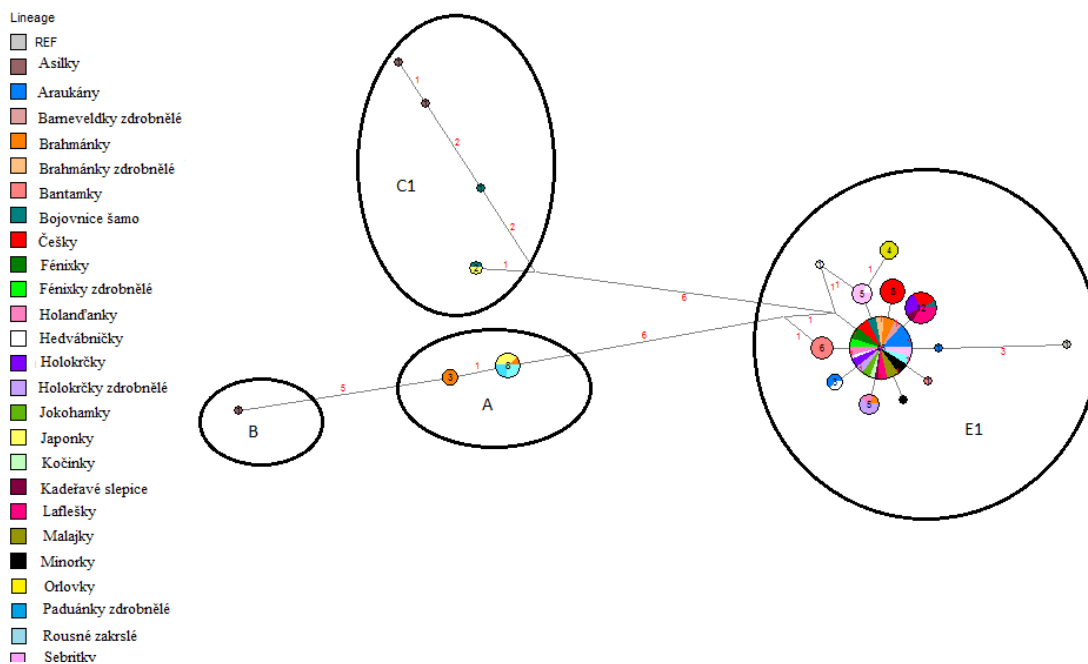
Tabulka č. 20 – Pravděpodobná příbuznost moderních a starobylých plemen

Moderní plemeno	Starobylé plemeno
Australky	Kočinky zakrslé, Kadeřavé slepice, Brahmánky
Barneveldky	Brahmánky
Barneveldky zdobnělé	Brahmánky
Češky	Orlovky
Holokrčky zdobnělé	Brahmánky, Holokrčky
Maransky	Brahmánky
Plymutky	Brahmánky, Kočinky
Sebritky	Bantamky
Vlašky	Minorky
Velsumky	Asilky, Brahmánky, Fénixky, Kočinky, Malajky
Wyandotky	Asilky, Brahmánky, Fénixky, Kočinky, Malajky

4.3 Identifikace možného geografického původu námi vybraných starobylých a moderních plemen kura domácího na základě analýzy kontrolního regionu mtDNA

Analýza mitochondriálních haplotypových skupin do kterých spadají evropská plemena z našeho datasetu

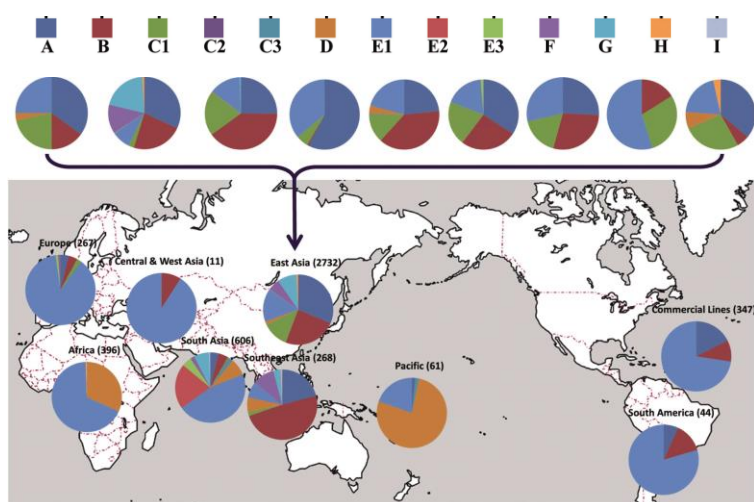
Sestrojené mitochondriální haplotypové sítě ukázaly, že jedinci v našem souboru spadají celkem do 4 mitochondriálních rodin. Nejběžnější haplotypovou rodinou je rodina E1, do které spadá největší část vzorků z našeho souboru. Do haplotypové rodiny A spadají Japonky, Brahmánky, Rousné zakrslé a Paduánky zdobnělé. V haplotypové rodině B je pouze Bojovnice šamo. Haplotypovou rodinu C1 reprezentují taktéž Bojovnice šamo a Japonky. Na základě získaných dat nebyla identifikována žádná dosud neznámá haplotypová rodina. Plemena jako Japonky, Bojovnice šamo, Rousné zakrslé nebo Brahmánky představují plemena nesoucí více typů mitochondriálních haplotypů a spadají tudíž do více haplotypových rodin.



Obrázek č. 16 – Graficky znázorněné rozložení námi analyzovaných plemen ve 4 identifikovaných haplotypových rodinách.

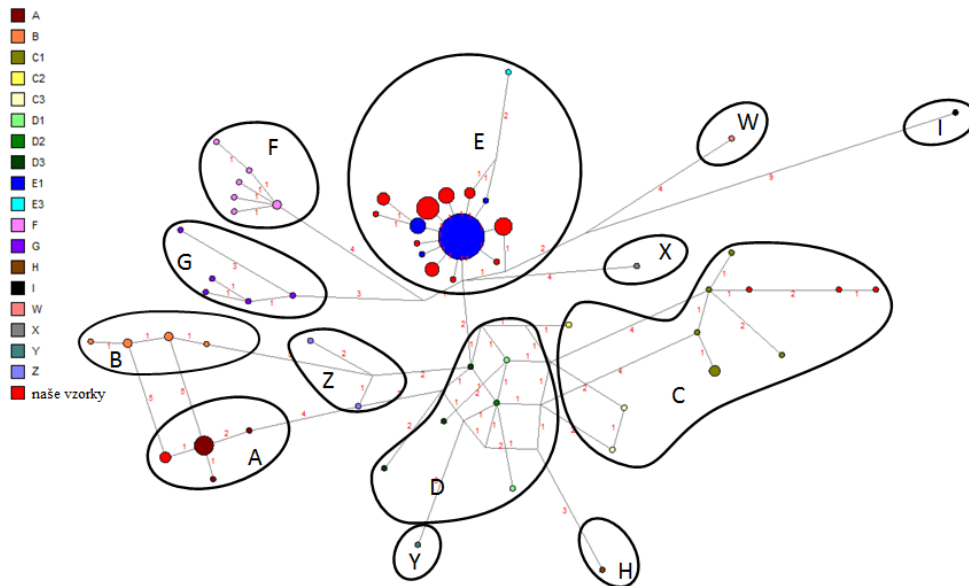
Porovnání našich vzorků s další studií zabývající se genetickou diverzitou kura domácího

Porovnání frekvencí haplotypových rodin v námi analyzovaných plemenech s geografickou distribucí haplotypových rodin zjištěnou ve studii Miao et al. (2013) naznačuje, že většina evropských plemen má pravděpodobně původ v Indii či jihovýchodní Asii.



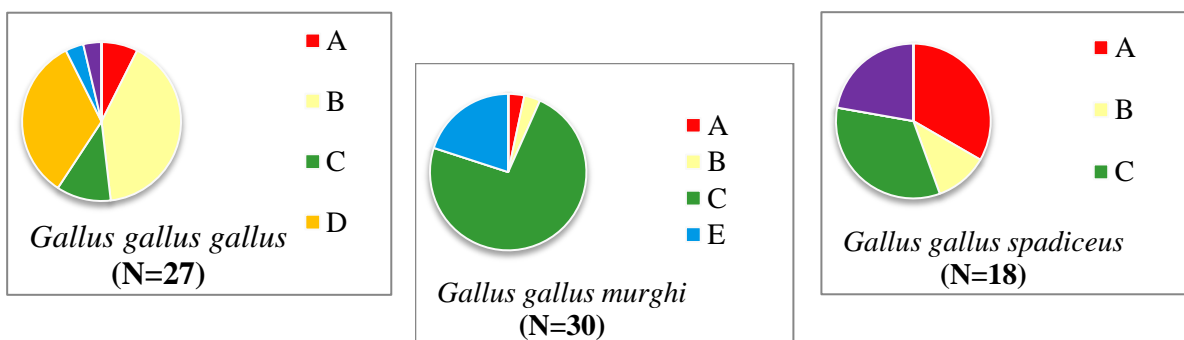
Obrázek č. 17 – Celosvětové rozložení jednotlivých haplotypových rodin podle Miao et al. (2013).

Na obrázku č. 17 lze vidět detekovanou diverzitu v rámci haplotypových rodin prezentovanou ve studii Miao et al. (2013). Haplotypové skupiny, které jsem identifikovala, tvoří pouhý zlomek možných variant haplotypů. Zajímavostí je, že zájmová plemena vykazují podobnou strukturu mitochondriálních haplotypů jako dříve studovaná komerční evropská plemena.

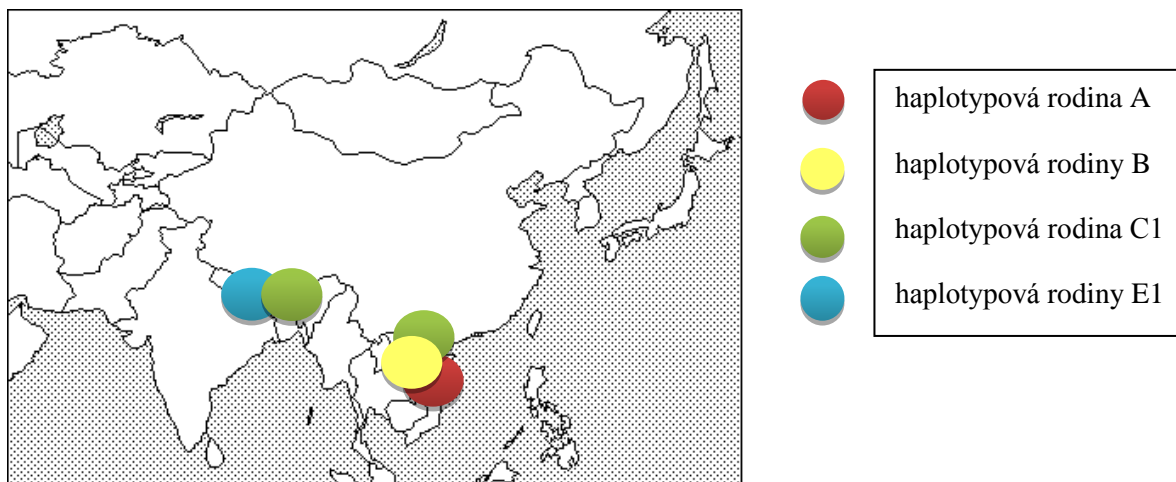


Obrázek č. 18 – Přehled existujících haplotypových rodin znázorněných v grafu společně s námi analyzovanými vzorky (červené zbarvení).

Na základě dat ze studie Miao et al. (2013) jsem sestrojila grafy zobrazující frekvence mitochondriálních haplotypů volně žijících jedinců rodu *Gallus* v různých haplotypových rodinách (Obrázek č. 19). Podle toho bylo možné určit hrubý původ našich analyzovaných jedinců. Grafy jsem utvořila pouze pro poddruhy s dostatečným zastoupením analyzovaných jedinců, tedy poddruhy *G. g. Gallus*, *G. g. spadiceus* a *G.g.murghi*.. Vzhledem k nízkému zastoupení jedinců jsem vyřadila poddruhy *G. g. bankiva* a *G. g. jabouillei*.



Obrázky č. 19 – Kruhové grafy vybraných poddruhů rodu *Gallus* sestrojené na základě dat publikovaných ve studii Miao et al. 2013. V každém grafu jsou vyznačeny haplotypové rodiny (A, B, C, D nebo E), které byly u daného poddruhu detekovány.



Obrázek č. 20 – Mapa s vyznačeným umístěním detekovaných haplotypových rodin. Geografický původ haplotypových rodin bylo možné stanovit na základě frekvencí alel poddruhů (Obr č. 19) a následné shody s našimi vzorky.

Do haplotypové skupiny A spadaly zejména poddruhy jihovýchodní Asie - *G. g. gallus* a *G. g. spadiceus*, které tudíž mohou být považovány za předky námi detekovaných plemen v této haplotypové rodině, a to Japoněk, Brahmánek, Rousných zakrslých a Paduánek zdrobnělých.

Haplotypová rodina B zahrnovala pouze jedno z námi analyzovaných plemen – Bojovnice šamo. Předky, kteří sdíleli stejnou haploskupinu jsou též poddruhy *G. g. gallus* nebo *G. g. spadiceus* pocházející z jihovýchodní Asie.

V haplotypové rodině C1 byly detekovány Bojovnice šamo a Japonky. Jejich předkem je podle zasoupení poddruhů v totožné haplotypové rodině zejména severoindický *G. g. murghi* a dále *G. g. spadiceus* z jihovýchodní Asie.

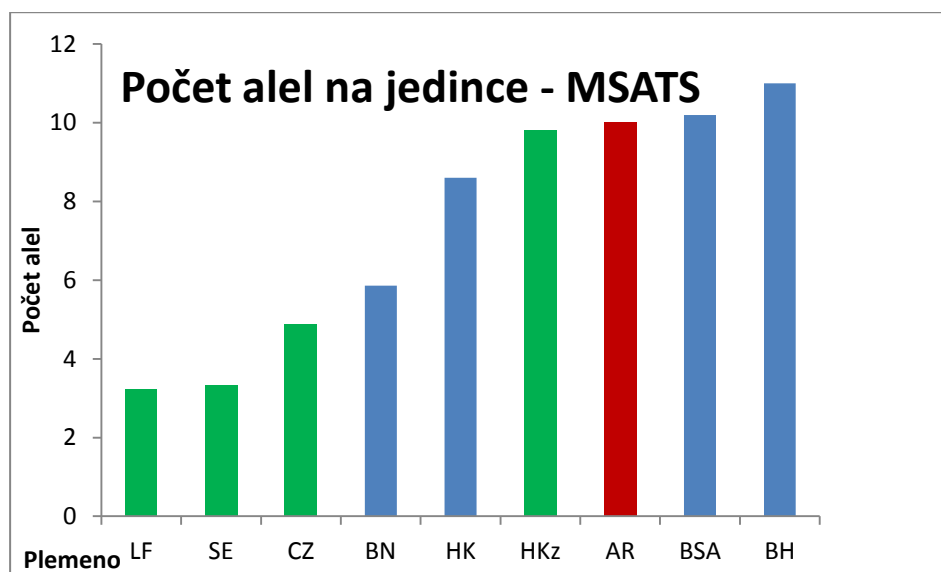
Předkem většiny plemen spadajících do haplotypové rodiny E1 je s velkou pravděpodobností zejména *G. g. murghi* pocházející ze severní Indie. Dalším potenciálním předkem může být i *G. g. gallus*, jehož někteří zástupci též spadali do haplotypové rodiny E1.

4.4 Srovnání míry neutrální a funkční variability mezi plemeny

Alelická diverzita neutrálních markerů a funkčních genů u jednotlivých plemen

Míru variability jsem detekovala na základě výsledků z programu Genalex. Srovnávala jsem výsledky získané analýzou mikrosatelitů a TLR 9 plemen, u kterých bylo analyzováno minimálně 5 jedinců. Snažila jsem se zjistit, která plemena jsou nejvariabilnější. Vzájemně porovnávana byla asijská a evropská plemena. Počáteční hypotéza předpokládala vyšší variabilitu u asijských plemen. Dále jsem hodnotila, která plemena vykazují nejvyšší heterogenitu a která jsou naopak nejuniformnější. Cílem bylo zjistit, zdali jsou evropská plemena oproti asijským plemenům více uniformní.

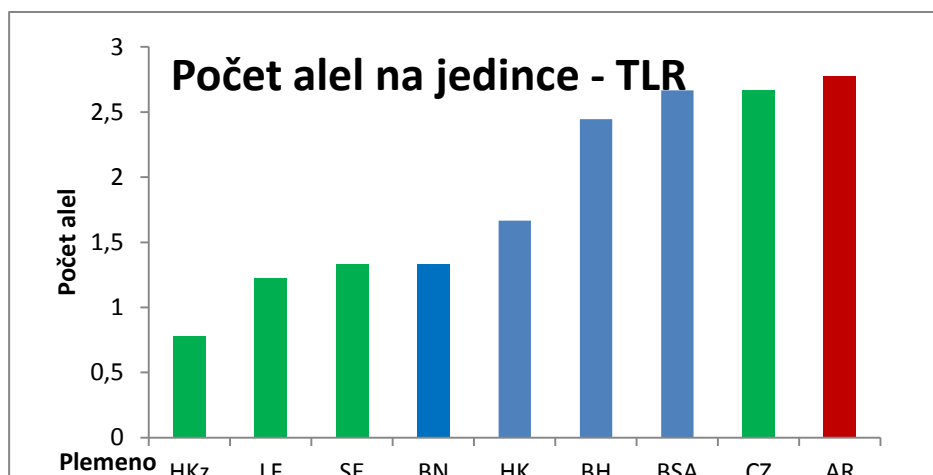
Nejprve jsem se zabývala daty získanými analýzou mikrosatelitů. Ukázalo se, že se nedá jednoznačně určit, která skupina plemen vykazuje vyšší variabilitu (Obr. č. 21). Jako nejvíce variabilní se ukázala plemena Bojovnice šamo a Brahmánka (BSA, BH; asijský původ) a Araukana (AR; jihoamerický původ). S výjimkou Holokrčků zdobnělých se jako variabilnější ukazují asijská plemena.



Obrázek č. 21 – Počet alel mikrosatelitů u 9 plemen. Modře jsou značena asijská plemena, zeleně evropská, červeně jihoamerická.

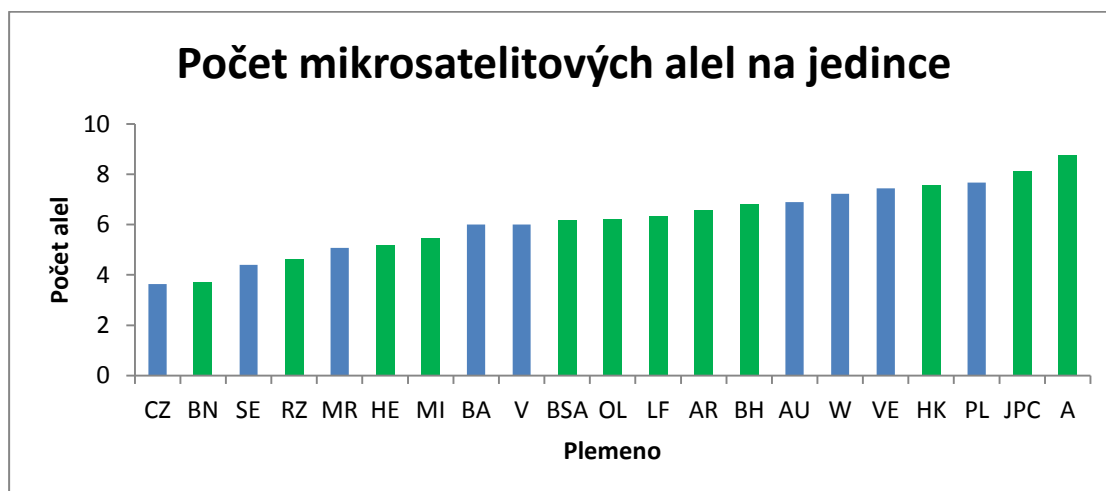
Dále jsem analyzovala data získaná analýzou TLR u téhož vzorku 9 plemen. Jednoznačně se zde jako nejvíce variabilní plemena ukazují Araukany (AR; jihoamerický původ), Bojovnice šamo

(BSA; asijský původ) a Češky (CZ; evropský původ). Na základě analýzy funkčních genů se asijská plemena ukazují jako lehce variabilnější.



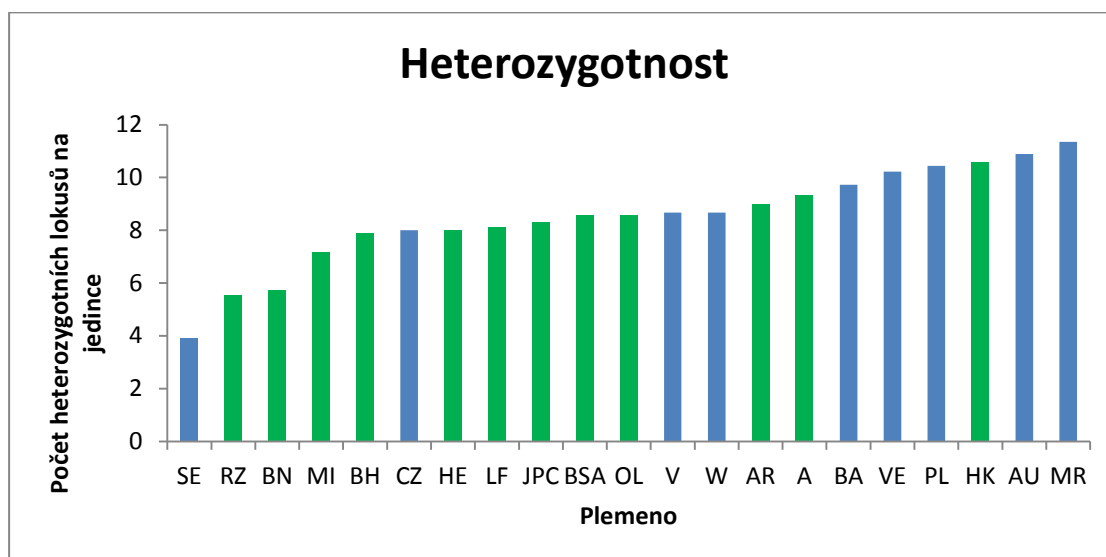
Obrázek č. 22 – Počet alel získaný analýzou TLR u 9 plemen. Modře jsou značena asijská plemena, zeleně evropská, červeně jihoamerická.

Dále jsem zjišťovala, jestli jsou moderní plemena geneticky uniformnější než plemena starobylá. Vycházela jsem z dat získaných analýzou mikrosatelitů u 21 plemen, která měla v datasetu nejméně 9 zástupců. Nejprve jsem zjišťovala, jaký je u nich počet mikrosatelitových alel na jedince. Jako nejvíce uniformní se podle analýzy frekvence alel ukázalo moderní plemeno Češka (CZ) a starobylé plemeno Bantamka (BN). Na základě výsledků nebylo jasné vidět, která skupina plemen je variabilnější. Vzhledem k tomuto zjištění nelze potvrdit původní hypotézu, která předpokládala vyšší uniformitu moderních plemen. Data jsem dále otestovala dvouvýběrovým nepárovým neparametrickým testem (Wilcoxon-Mann-Whitney Test). Výsledná p-hodnota ($p < 0,66$) byla neprůkazná a plemena se nelišila.



Obrázek č. 23 – Srovnání variability starobylých a moderních plemen na základě počtu alel na jedince. Starobylá plemena jsou značena zeleně, moderní plemena modře.

U starobylých a moderních plemen jsem se dále zaměřila i na srovnání jejich heterozygotnosti (Obr. č. 24). Vypočítala jsem si, kolik má každé plemeno heterozygotních lokusů na jedince v rámci daného plemene. Těž jsem vycházela z dat získaných od 21 plemen s nejméně 9 zástupci. Jako nejvariabilnější plemeno, které disponovalo vysokým počtem heterozygotních lokusů na jedince, se ukázalo moderní plemeno Maranska (MR). Kromě Sebritek a Češek, které oplývaly nízkou heterozygotností, se zbylá moderní plemena ukázala jako velice variabilní. V mnohých případech svou variabilitou starobylá plemena převyšovala. Jako nejvariabilnější starobylé plemeno se ukázaly Holokrčky. Data jsem též dále otestovala dvouvýběrovým nepárovým neparametrickým testem (Wilcoxon-Mann-Whitney Test). Výsledná p-hodnota ($p < 0,54$) se i zde ukázala jako neprůkazná.

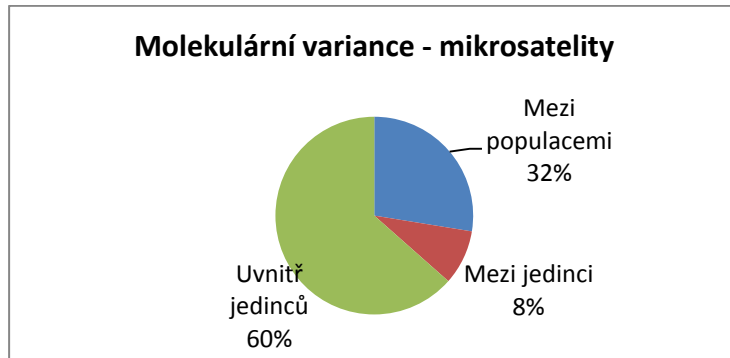


Obrázek č. 24 - Srovnání variability starobylých a moderních plemen na základě počtu heterozygotních lokusů na jedince. Starobylá plemena jsou značena zeleně, moderní plemena modře.

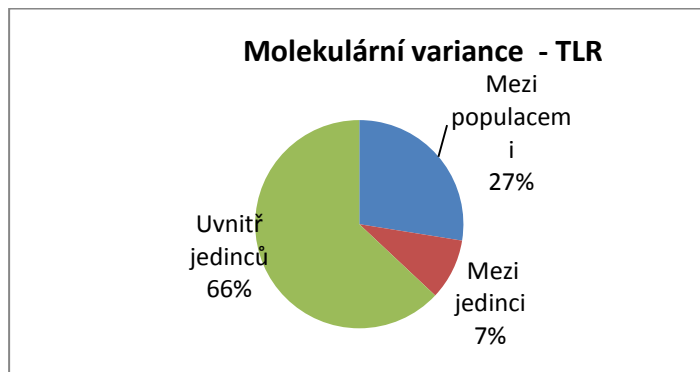
Vzájemné porovnání rozrůzněnosti populací na základě neutrální a funkční variability mezi plemeny

Srovnání míry neutrální a funkční variability mezi plemeny jsem provedla na souboru celkem 110 vybraných jedinců reprezentujících 25 plemen. Výsledky ukázaly, že u neutrálních markerů byl největší podíl genetické variability vysvětlen heterozygotností jednotlivých jedinců. Neutrální genetická variabilita vysvětlená variabilitou mezi populacemi je 32 % a genetická variabilita mezi

jedinci vysvětlovala pouze 8 % variability v datech (Obrázek č. 25). U funkčních genů (TLR) se ukázal výsledek oproti očekávání podobný výsledku získanému u mikrosatelitů (Obrázek č. 26). Opět byla největší část variability vysvětlena heterozygotností jednotlivých jedinců a genetická variabilita vysvětlená variabilitou mezi populacemi byla 27 %, tedy jen nepatrně nižší než u neutrálních markerů. Podíl variability vysvětlený odlišnostmi mezi jedinci byl 7 %



Obrázek č. 25 - Analýza molekulární variance 110 jedinců v programu Genalex zobrazující kolik variability ve struktuře mikrosatelitů vysvětluje variabilita mezi plemeny, mezi jedinci navzájem a uvnitř jedinců samých.



Obrázek č. 26 - Analýza molekulární variance 110 jedinců v programu Genalex zobrazující kolik variability může být TLR vysvětleno mezi plemeny, mezi jedinci navzájem a uvnitř jedinců samých.

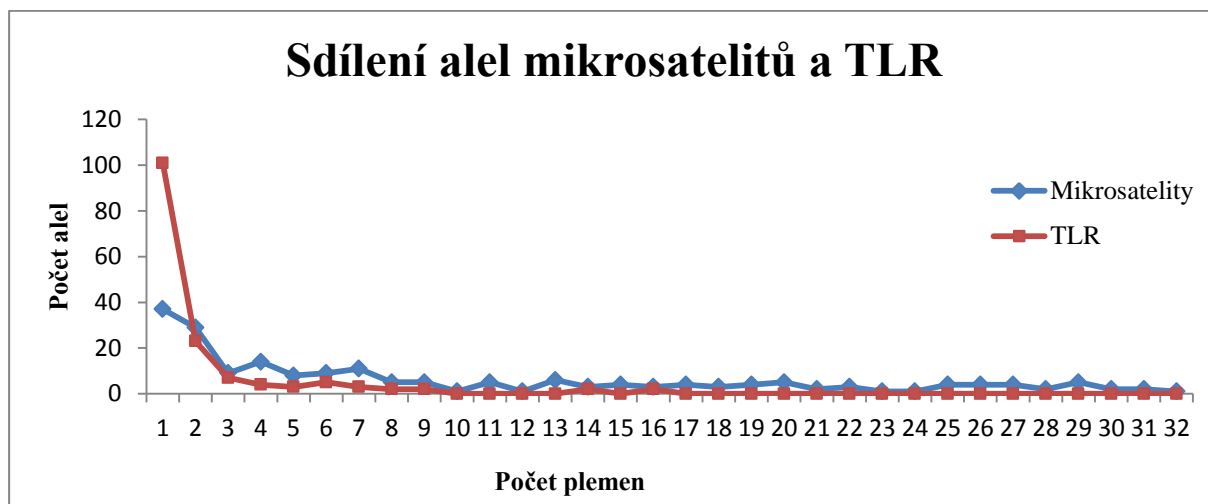
Vzájemné porovnání rozrůzněnosti populací moderních a starobylých plemen na základě variability neutrálních markerů

Na celém datasetu 272 jedinců byla porovnána genetická struktura moderních a starobylých plemen. Analýza ukázala, že u nich nejsou v genetické struktuře populací žádné výrazné rozdíly. U starobylých plemen bylo celkem 62 % variability vysvětleno heterozygotností, u moderních plemen

to bylo 66 %. Genetická variabilita vysvětlená variabilitou mezi populacemi byla 28 % u starobylých plemen a 27 % u moderních plemen.

4.5 Srovnání míry sdíleného polymorfismu (genového toku / ancestrálního polymorfismu) na neutrálních znacích a imunitních genech.

Míru sdíleného polymorfismu jsem nejprve srovnávala na datech získaných analýzou mikrosatelitů u 110 plemen. V programu Genalex jsem stanovila celkový počet alel sdílených studovanými plemeny pro všechny zkoumané neutrální markery. Celkem bylo detekováno 41 privátních alel z celkového počtu 163 alel (25,2 %; 8,79 alel na lokus), ostatní alely byly sdíleny 2 až 32 plemeny (Obrázek č. 27). Míru polymorfismu jsem dále zjišťovala i u imunitních genů. Analyzován byl stejný vzorek 110 plemen, pro které jsem taktéž zkonstruovala graf zobrazující počet plemen sdílející daný počet alel. Detekovala jsem 101 privátních alel z celkového počtu 154 alel (65,6 %; 38,5 alel na lokus), ostatní alely byly sdíleny 2 až 16 plemeny (Obrázek č. 27). Data jsem dále testovala pomocí párového neparametrického testu (Wilcoxon Signed-Rank Test). Detekovaná p-hodnota byla: $p = 0,001$.



Obrázek č. 27 – Zobrazení sdílení alel mikrosatelitů a TLR mezi plemeny. Na ose X lze vidět počet plemen a na ose Y počet alel, které daný počet plemen sdílí.

5. Diskuse

5.1 Cíl 1: Zmapování hrubého rámce původu moderních plemen mezi starobylými plemeny

Analýza mikrosatelitů ukázala, že jednotlivá plemena tvořila vlastní genetické skupiny definované frekvencemi alel jednotlivých lokusů. Tento výsledek potvrzuje studii Granevitze et al. (2009) a naznačuje, že plemena opravdu existují jako určující biologické jednotky, které od sebe lze geneticky rozlišit. Rozrůznění plemen není výrazné, většina plemen klastruje blízko sebe a vytváří shluk – plný často těžko vizualizovatelných vztahů, avšak i přesto lze vidět, že jsou si některá plemena příbuznější než jiná. Díky tomu je také možné identifikovat, z okruhu kterých starobylých plemen moderní plemena vycházejí, a jak jsou si vlastně jednotlivá plemena navzájem příbuzná. Naše výsledky tedy potvrdily počáteční hypotézu (hypotéza č. 1), která předpokládala, že je potenciálně možné zmapovat původ moderních plemen, a to díky detekci znaků, které spolu starobylá a moderní plemena sdílí.

V analýze struktury populace se plemena se stoupajícím počtem skupin (K) začala postupně rozdělovat a tak bylo možné mapovat jejich genetické vztahy. Některá plemena však mezi sebou nebylo možné odlišit ani při vyšších K, což naznačuje, že jsou geneticky provázaná. Důvodem k tomu mohly být jak užší příbuzenské vztahy odražející původ daných plemen, tak i recentní překřížování mezi plemeny. Část analyzovaných plemen se již v časně fázi rozdělení ukázala jako málo variabilní a brzy se ustálila ve vlastní skupině s minimálním sdílením znaků s ostatními plemeny. Příkladem toho může být plemeno Češka a Holandanka zdobnělá. Důvodem k tomu může být například bottleneck spojený s genetickým driftem (snížení genetické diverzity populace vedoucí k unimorfizaci populace) a nebo selekce na znaky ve vazbě se studovanými neutrálními markery. Celkově se jako nejlepší ukázalo rozdělení do dvou skupin $K = 2$. Celkově vysoká pravděpodobnost tohoto rozdělení nás původně vedla k domněnce, že by do vzniklých dvou skupin mohla být rozdělena plemena starobylá a moderní. Tato hypotéza se však ukázala jako mylná. Dá se však říci, že při $K = 2$ se do dvou skupin rozdělila asijská a evropská plemena, podobně jako ve studii Lyimo et al. (2014). Ze starobylých plemen tomuto hrubému rozdělení odporují pouze Bantamky, které pocházejí z Jávvy, avšak geneticky spadají mezi stará evropská plemena. Důvodem tomu může být jejich došlechtění v Evropě, které mohlo pozměnit frekvence neutrálních lokusů a přiřadit je tak blíže k evropským plemenům.

Ukázalo se, že výraznými příbuzenskými vztahy disponovala mnohá moderní plemena se starobylým plemenem Brahmánka. Ze starobylých populací příbuzných těmto moderním Brahmánkám byla patrně odvozena plemena: Australka, Barneveldka, Barneveldka zdobnělá, Holokrčka zdobnělá, Maranska, Plymutka, Sebritka, Velsumka a Wyandotka.

Plemeno Australka bylo s nejvyšší pravděpodobností vyšlechtěno z plemene Orpingtonka, které však v naší studii nebylo zahrnuto (Scrivener, 2004; Vašák, 2008). Podle naší analýzy byly Australky nejbližší Brahmánkám, Kočinkám zakrslým a Kadeřavým slepicím. Barneveldky a Barneveldky zdobnělé klastrovaly nejbližší k plemenu Brahmánka, což odpovídá dostupné chovatelské literatuře, která však uvádí spolu s Brahmánkami jako předka ještě Kočinky (Vašák, 2008). Schmidt a Proll (2007) dále předpokládají i příspěvní Rodajlendek a Indických bojovnic.

České národní plemeno Češka klastrovalo nejbližší k plemeni Orlovka. Ke šlechtění tohoto plemene docházelo v průběhu 20. století (Vašák, 2008). V téže době se podle dostupných informací na české území dostalo i plemeno Orlovka. Otázkou však zůstává, jestli Orlovky opravdu byly plemenem, ze kterého současný genofond Češek vychází nebo se jedná například o výsledek recentního přikřížování. Orlovky a Češky ovšem i přes podobnost tvoří jasně odlišné shluky, a proto je pravděpodobnějším vysvětlením, že se u nich vyvinuly podobné frekvence studovaných haplotypů nezávisle na sobě.

Holokrčky zdobnělé klastrovaly nejbližší k plemenům Brahmánka a Holokrčka. Maransky byly nejbližší příbuzné Brahmánkám. To naznačuje i studie Granevitze et al. (2009), avšak zde pak při vyšších K plemeno Maranska klastruje spíše k plemeni Asilka. Schmidt a Proll (2007) uvádí, že by plemeno mělo vycházet z Brakelek a Faverolek, které však v této práci nebyly zkoumány. Plymutky vykazovaly podobnost s plemeny Brahmánka a Kočinka, což potvrzuje i Vašák (2008). Sebritky nejvíce klastrovaly k plemenu Bantamka. Literatura však tuto přímou spojitost neuvádí. Ke vzniku Sebritek měly podle chovatelské literatury přispět zejména Hamburčanky a Paduánky (Vašák, 2008).

Jako výrazně heterogenní moderní plemena, které sdílely znaky s více starobylými plemeny, se ukázaly Velsumky a Wyandotky. Sdílely znaky s plemeny Asilka, Brahmánka, Fénixka, Kočinka a Malajka, což potvrzují i Schmidt a Proll (2009) a Vašák (2008). Plemeno Vlaška vykazovalo příbuznost s plemenem Minorka (Schmidt a Proll, 2007; www.theleghornclub.com/standards.htm). Všechny výsledky z programu Structure odpovídaly výsledkům z programu Splitstree. Dále zjištěné údaje o příbuznosti plemen pozitivně korelovaly s dostupnými informacemi týkajícími se historie plemen a jejich původu nalezenými v dostupné literatuře.

V roce 2009 Bodszar et al. studovali populační strukturu 6 lokálních maďarských plemen. Ve své studii v programu Structure detekovali jako nejlepší rozložení populací $K = 5$ a $K = 6$. Jedním z plemen, které bylo ve studii zahrnuto, a rovněž jsme jej měli i my zařazené v souboru námi analyzovaných plemen, byly Holokrčky. Oproti ostatním maďarským plemenům se Holokrčky výrazně distancovaly. S velkou pravděpodobností u nich došlo ke zvýšené míře inbreedingu a ke snížení efektivní velikosti populace. Při porovnávání maďarských plemen s referenčními

evropskými plemeny a komerčními liniemi Holokčky klastrovaly v blízkosti plemene Maranska. Tento výsledek potvrzují i naše data.

Genetickou strukturu 65 populací kura domácího pomocí 29 mikrosatelitových markerů studovali i Granevitze et al. (2009). S naším souborem plemen se shodovala plemena Orlovka, Asilka, Kočinka, Brahmánka, Maranska, Holokrčka a Malajka. Získaná data byla taktéž analyzována v programu Structure. Stejně jako v našem případě došlo při $K = 2$ k oddělení asijských a evropských plemen. Se zvyšujícím se K bylo i v této studii pozorovatelné, že k sobě klastují Maransky a Holokrčky. K nim se dále přidává plemeno Asilka (též srovnatelný výsledek s analýzou našich plemen). Orlovky nejbližše klastrovaly ke komerčními liniím nosnic, které v naší studii nebyly zkoumány. Poblíž sebe dále klastrovala plemena Kočinka a Brahmánka, stejně tak jako v našem datovém souboru a v práci Wilkinson et al. (2011). Malajky se ukázaly jako heterogenní.

Detekcí populační struktury se zabývali i Lyimo et al. (2014). Ti však analyzovali výrazně větší a variabilnější soubor jedinců. Celkem bylo do jejich studie zahrnuto 101 populací kura domácího pocházejících ze tří kontinentů (Afrika, Asie, Evropa), dále 3 populace kura bankivského a 9 komerčních linií. Všechny tyto populace byly studovány pomocí 29 mikrosatelitových markerů. Získaná data byla dále analyzována v programu Structure. Podobně jako v této práci se i zde jako nejlepší K ukázala $K = 2$ a $K = 3$. Plemena ze západní Evropy klastrovala společně s nosnicemi, plemena středomořská a východoevropská s brojlery a nosnicemi a asijská plemena s populacemi kura bankivského. Stejně tak i v našem případě bylo pro $K = 2$ vidět, že k sobě většina námi analyzovaných evropských plemen úplně či z větší části klastruje. Výjimkou byly pouze Maransky a Holokrčky zdobnělé. Naopak ze skupiny asijských plemen se vymykaly pouze Bantamky, které klastrovaly spíše k evropským plemenům.

5.2 Cíl 2: Identifikace možného geografického původu námi vybraných starobylých a moderních plemen kura domácího na základě analýzy kontrolní oblasti mtDNA

Naše vybraná plemena spadala celkem do 4 haplotypových rodin. Haplotypová rodina E1 se ukázala jako nejrozšířenější. Všeobecně lze říci, že v Evropě tato skupina zaujímá výraznou dominantní pozici. Spadala do ní naprostá většina námi analyzovaných jedinců. Podle sestrojených grafů frekvencí mitochondriálních haplotypových rodin vybraných poddruhů kura bankivského (Obr. č. 19), které vycházely ze studie Miao et al. (2013), odpovídá haplotypová skupina E1 nejvíce přirozeně vysoké frekvenci této haploskupiny u poddruhu *G. g. murgi* ze severovýchodní Indie. Vzhledem k tomuto zjištění lze soudit, že většina evropských plemen pochází právě z této oblasti. Další haplotypovou rodinou, která byla nalezena u plemen Japonka, Brahmánka, Rousná zakrslá a Paduánka zdobnělá je haplotypová rodina A, která má své kořeny pravděpodobně v jihovýchodní

Asii. Tato oblast je původní dokonce hned pro dva poddruhy kura bankivského, a to *G. g. gallus* a *G. g. spadiceus*. Stejně je to i v případě haplotypové rodiny B. Též lze její předky hledat především v rámci této oblasti. Jediným plemenem, které disponovalo haplotypem klastujícím do haplotypové rodiny B byly Bojovnice šamo. Jako poslední byla detekována haplotypová rodina C1, kam spadaly Bojovnice šamo, Asilky a Japonky čabo. Na základě frekvencí výskytu mitochondriálních haplotypů u původních poddruhů kura bankivského je tedy pravděpodobným předkem těchto plemen *G. g. murgi*. Jelikož se však haplotypová rodina C1 vyskytuje i u poddruhu *G. g. spadiceus*, je nutné uvažovat i o možnosti že tato mitochondriální haplotypová rodina byla těmito plemeny zděděna od tohoto poddruhu. Obvyklé bylo též sdílení několika haplotypů v rámci jednoho plemene. Z našeho souboru plemen do více haplotypových rodin spadaly Japonky, Bojovnice šamo, Rousné zakrslé a Brahmánky, což u Japonek, Bojovnic šamo, Rousných zakrslých a Brahmánek naznačuje hybridní původ z *G. g. murghi* a *G. g. gallus*/*G. g. spadiceus*. Zajímavostí je, že zájmová plemena vykazovala podobnou strukturu mitochondriálních haplotypů jako dříve studovaná komerční evropská plemena. Tento fakt nasvědčuje, že jsou tato plemena podobného geografického původu.

Na základě získaných dat se mi podařilo potvrdit naši hypotézu (hypotéza č. 2), která předpokládala sdílení mitochondriálních haplotypů s referenčními populacemi ze studie Miao et al. (2013). Přiřadila jsem detekované haplotypy analyzovaných jedinců k již identifikovaným haploskupinám a dále díky grafům zobrazujícím rozložení haplotypů poddruhů kura bankivského detekovala pravděpodobné oblasti rozšíření předků analyzovaných plemen.

Analýzou mitochondriální DNA kura domácího se zabývalo již mnoho studií. Avšak žádná z nich nebyla zaměřena na zájmová plemena chovaná ve střední Evropě. Díky tomu bylo tedy nasnadě doplnit mezery v mapování historie maternální linie kura domácího. V jedné z prvních studií zabývajících se rekonstrukcí příbuznosti plemen bylo díky sekvenování mitochondriálního D-loopu u 834 jedinců kura domácího a 66 jedinců volně žijícího kura bankivského napříč celou Eurasií identifikováno 9 haplotypových rodin A - I (Liu et al., 2006). Široce distribuované byly zejména haplotypové rodiny A, B a E. Zbytek byl detekovaný hlavně v jižní a jihovýchodní Asii.

Další studie rozšířila poznatky a detekovala haplotypové rodiny W - Z (Miao et al., 2013). Analyzovaný vzorek zahrnoval celkem 4938 jedinců. Ačkoliv však byla tato studie založena na tak velkém vzorku domácích i volně žijících jedinců kura domácího a kura bankivského, přináší jen málo informací o vzájemné příbuznosti plemen chovaných v Evropě (vzorků z Evropy bylo do studie zahrnuto jen málo a výběr byl s ohledem na použitá plemena značně nekonzistentní). Haplotypy kura domácího a kura bankivského společně spadaly do haplotypových rodin A, B, D1, E1, E3, F a G. Haplotypové rodiny W - Z se ukázaly jako unikátní pro kura bankivského. Naopak se u něj nevyskytovaly haplotypové rodiny H - I, které nesl pouze kur domácí. Poddruh *G. g. murghi*

nejčastěji se haplotypy klastřují do haplotypových rodin C, E, A a D. *G. g., spadiceus* nejvíce spadl do haplotypových rodin A, C, F a B. *G. g. galluszase* do B, D, C, A, E a F.

Poslední rozsáhlou studií zaměřenou na maternální genealogickou linii evropských plemen je Lyimo et al. (2015). Polymorfismy v sekvenci mitochondriální oblasti D-loop analyzovali celkem u 1256 jedinců. Ve studii byla zahrnuta široká škála evropských plemen, která byla rozdělena na základě jejich původu do 6 skupin zahrnujících (středomořská plemena, východoevropská plemena, severo-západoevropská plemena, bojová plemena, plemena vzniklá introgresí asijských do evropských plemen během jejich zakládání a asijská plemena). Klasicky se jako nejrozšířenější haplotypová rodina ukázala E1, která se nejvíce nacházela u středomořských plemen, východoevropských plemen a severo-západoevropských plemen. Následovala haplotypová rodina A, kterou nejvíce disponovala asijská plemena a plemena vzniklá introgresí. Haplotypová rodina B byla detekována zejména u severo-západoevropských plemen, haplotypová rodina C u asijských plemen a haplotypová rodina D u bojových plemen. Východoevropská plemena a severo-západoevropská plemena vykazovala nižší haplotypovou diverzitu než asijská a středomořská plemena. Tento fakt je s velkou pravděpodobností spjatý s izolovaností plemen a malou efektivní velikostí populací.

Ceccobeli et al. (2013) vyšetřovali maternální linii u 5 italských plemen kura domácího. Dále se Ceccobeli et al. (2015) též zabývali studiem kontrolní oblasti D-loop u dalších středomořských plemen kura domácího. Detekovali haplotypové rodiny A, B a E1. Dominance haplotypové rodiny E1 naznačuje, že středomořská plemena mají své kořeny v oblasti Indie stejně jako většina námi analyzovaných plemen. Analyzována byla také domorodá maďarská plemena kura domácího, která taktéž disponovala zejména haplotypovými rodinami A, B a E (Revay et al., 2010). Dále byl D-loop analyzován i u švédských plemen kura domácího. Zde se opět jako nejrozšířenější haplotypové rodiny ukázaly A, B a E (Englund et al., 2014). Meydan et al. (2016) analyzovali D-loop u 9 nativních plemen z Turecka a Íránu. I zde se haplotypová rodina E1 ukázala jako nejrozšířenější.

5.3 Cíl 3: Srovnání míry neutrální a funkční variability mezi plemeny

Asijská plemena vykazovala oproti evropským plemenům vyšší míru genetické variability. Tento výsledek podporuje studii Lyimo et al. (2014), ve které bylo též zjištěno, že heterozygotnost a počet alel na lokus je u evropských plemen výrazně nižší v porovnání s plemeny asijskými a africkými. Důvodem k tomu může být selekční tlak a omezený výskyt plemen v závislosti na zájmových chovatelích. Asijská plemena nejsou oproti evropským plemenům pod tak přísnou kontrolou a často podléhají minimálnímu umělému selekčnímu tlaku. Na základě našich výsledků bylo možné potvrdit původní hypotézu, která předpokládala, že asijská plemena oproti evropským

plemenům disponují vyšší genetickou variabilitou. Stejný výsledek přinesla jak analýza mikrosatelitů, tak analýza imunitních genů (Obr. č. 21 a 22).

Míru variability u starobylých a moderních plemen jsem hodnotila dvěma způsoby, a to na základě počtu alel a počtu heterozygotních lokusů na jedince. Naše původní hypotéza předpokládala, že budou moderní plemena geneticky uniformnější než plemena starobylá. Pro porovnávání starobylých a moderních plemen byla použita data získaná analýzou 21 plemen. Nejprve jsem u těchto plemen porovnávala počet alel na jedince (Obr. č. 23). Ukázalo se, že na základě našich dat nelze říci, že by moderní plemena byla geneticky uniformnější. Tento výsledek jsem ověřila i nepárovým parametrickým testem. Variabilita starobylých a moderních plemen se nelišila. Ani na základě počtu heterozygotních lokusů na jedince se navrhovanou hypotézu nepovedlo potvrdit (Obr. č. 24). Tyto výsledky jsem ověřila i nepárovým parametrickým testem. Variabilita starobylých a moderních plemen se nelišila.

Dále jsem se zabývala tím, jaké rozdělení genetické variability nám vlastně analýza mikrosatelitů a imunitních genů odhalí. Míru variability mezi plemeny jsem porovnávala s mírou variability uvnitř plemen samých. Výsledky byly srovnatelné se studiemi Granevitze et al. (2009) a Wilkinson et al. (2011). Analýza ukázala, že je tato variabilita překvapivě vyšší uvnitř jedinců spadajících do jednotlivých plemen než mezi plemeny samotnými. Největší podíl genetické variability byl tudíž vysvětlen heterozygotností jednotlivých jedinců. Variabilita mezi plemeny byla jen lehce vyšší v neutrálních markerech (32%) než v imunitních genech (27%), což souvisí buďto s podobnou mírou ancestrálního polymorfismu anebo genovým tokem mezi plemeny. Wilkinson et al. (2011) hodnotili genetickou variabilitu na základě analýzy mikrosatelitových markerů. Míra variability mezi plemeny byla 27%, tedy skoro stejná jako v našem případě. Granevitze et al. (2009) stanovili míru variability vysvětlenou analýzou mikrosatelitů mezi 65 populacemi kura domácího vysvětlenou pomocí analýzy mikrosatelitů na 34%.

Dále jsem porovnávala i míru variability 22 starobylých a 11 moderních plemen. K tomuto účelu jsem použila data získaná fragmentační analýzou mikrosatelitů u 272 jedinců. U každé skupiny jsem též analyzovala rozdělení variability mezi plemeny, mezi jedinci a uvnitř jedinců samých. Ukázalo se, že mezi mírou variability starobylých a moderních plemen nejsou žádné výrazné rozdíly. Genetická variabilita vysvětlená variabilitou mezi populacemi u nich byla téměř obdobná (starobylá plemena 28%; moderní plemena 27%).

5.4 Cíl 4: Srovnání míry sdíleného polymorfismu (genového toku / ancestrálního polymorfismu) na neutrálních znacích a imunitních genech.

Vliv genového toku či ancestrálního polymorfismu na sdílení alel mikrosatelitů a imunitních genů mezi plemeny jsem detekovala celkem u 110 jedinců. Původní hypotéza (hypotéza č. 4) nás vedla k domněnce, že by sdílený polymorfismus měl být vzhledem k funkci signifikantně vyšší u imunitních genů. Tuto hypotézu se nám však nepodařilo spolehlivě potvrdit či vyvrátit. Důvodem jsou výrazně odlišné počty alel na lokusech obou typů znaků. U mikrosatelitů bylo z celkového počtu 163 alel (8,79 alel na lokus) pouze 41 alel privátních. Z tohoto výsledku vyplývá, že 74,8% alel bylo mezi plemeny sdíleno. Naopak u TLR bylo ze 154 detekovaných alel (38,5 alel na lokus) 101 privátních. Mezi plemeny tudíž bylo sdíleno pouze 34,4 % alel. Takovéto hrubé srovnání ovšem nezohledňuje počet alel existujících na jednotlivých lokusech. Pomocí párového neparametrického testu vyšla sice p-hodnota průkazná, avšak vzhledem k možným počtům alel imunitních genů a mikrosatelitů, není možné jejich sdílený polymorfismus reálně porovnat. V případě TLR existuje pro jednotlivé lokusy výrazně více alel a není tedy překvapivé, že je také více alel privátních. Mnohé alely byly detekovány v celém datestu pouze jedenkrát a byl by potřeba výrazně vyšší počet jedinců, aby bylo možné odhadnout jejich frekvence v populaci. Naproti tomu u mikrosatelitů existuje více lokusů s menším množstvím alel, což umožňuje také vyšší míru sdílení přítomných alel. Vzhledem ke zjištěné variabilitě v obou typech znaků je tedy otázkou, zdali se genový tok těchto dvou markerů dá vůbec rozumně porovnat. Podstatná je ovšem skutečnost, že obě kategorie znaků ukazují jasnou strukturovanost populace na jednotlivá plemena. Zajímavé však bylo, že pro obě kategorie znaků existovaly i alely, které byly sdíleny u většiny (anebo v případě TLR alespoň u velké části) plemen. Jedna z mikrosatelitových alel byla sdílena mezi 32 plemeny a jedna z alel TLR mezi 16 plemeny. Otázkou však zůstává, jestli tyto vysoce sdílené alely mohou pocházet od společného předka nebo byl jejich vznik zapříčiněn díky hybridizaci.

6. Závěr

Výsledky mé diplomové práce jsou v souladu s mnoha dalšími studii, které se již podobným tématem zabývali. Má práce doplňuje tyto studie a přispívá novými informacemi o příbuznosti a genovém toku u plemen nacházejících se ve střední Evropě. Právě z tohoto důvodu jsme vybrali takový soubor plemen, který ideálně vystihuje aktuální rozložení zájmových plemen chovaných v této oblasti.

Plemena lze na základě mikrosatelitových markerů rozlišit. Navrhovaná hypotéza, která předpokládala, že nám míra sdílení alel pomůže odhalit příbuznost moderních plemen se starobylými plemeny se potvrdila. Většina moderních plemen (Australka, Barneveldka, Barneveldka zdrobnělá, Holokrčka zdrobnělá, Maranska, Plymutka, Sebritka, Velsumka a Wyandotka) nejbližše klastrovala ke starobylému plemeni Brahmánka. Tudíž lze předpokládat, že pravděpodobně byla z Brahmánkám příbuzných populací vyšlechtěna. Analýza populační struktury ukázala, že při $K = 2$ dochází k základnímu rozčlenění plemen na asijská a evropská. Informace o příbuznosti plemen získané na základě naší studie potvrzovaly informace dostupné z chovatelské literatury. Podařilo se nám potvrdit tyto dříve genetickou analýzou nepodložené informace a popsat vztahy mezi jednotlivými plemeny. Některá plemena mezi sebou sdílela znaky i při vyšších rozděleních. Předpokládaným důvodem tomu mohly být jak hlubší příbuzenské vztahy odražející původ daných plemen, tak i recentní překřížování mezi plemeny.

Všechna studovaná plemena náležela ke čtyřem mitochondriálním haplotypovým rodinám, z nichž nejběžnější byla rodina E1. Předkem většiny analyzovaných plemen byl tedy s nejvyšší pravděpodobností poddruh *G. g. murgi* ze severovýchodní Indie, v jehož populaci je haplotypová rodina E1 nejvíce zastoupena. Dalšími minoritními haplotypovými rodinami, které jsem v našem souboru vzorků detekovala, byly A (Japonka, Brahmánka, Rousná zakrslá a Paduánka zdrobnělá) a B (Bojovnice šamo). Předkem těchto rodin pravděpodobně mohl být buď *G. g. gallus* nebo *G. g. spadiceus*. Haplotypová rodina C1 byla nalezena u Bojovnic šamo, Asilek a Japoněk čabo. Některá plemena (Japonky, Bojovnice šamo, Brahmánky nebo Rousné zakrslé) nesly více mitochondriálních haplotypů. Tento výsledek naznačuje buďto udržování ancestrálního polymorfismu původní populace předka, hybridní původ těchto plemen anebo genový tok mezi plemeny.

Asijská plemena oplývala oproti evropským plemenům vyšší mírou variability. Tento výsledek byl srovnatelný jak na základě analýzy mikrosatelitů, tak na základě analýzy TLR. Míru genetické variability jsem srovnávala i mezi starobylými a moderními plemeny. Naše data však nepodporují hypotézu, že jsou moderní plemena uniformnější.

Míra sdíleného polymorfismu byla vyšší u mikrosatelitů. Z celkového počtu 163 alel bylo pouze 41 alel privátních. Z tohoto výsledku vyplývá, že 74,8 % alel bylo mezi plemeny sdíleno. Naopak u TLR bylo ze 154 detekovaných alel 101 privátních. Mezi plemeny tudíž bylo sdíleno pouze 34,4 % alel. Hypotézu, že je sdílený polymorfismus vyšší u imunitních genů se nepodařilo spolehlivě testovat, ale výsledky, které máme ji příliš nepodporují.

7. Poděkování

Ráda bych na tomto místě poděkovala všem, kteří se na celém projektu podíleli a při zpracování diplomové práce mi poskytli cenné rady. V první řadě bych chtěla poděkovat svému školiteli RNDr. Michalovi Vinklerovi PhD. a konzultantu doc. Mgr. Pavlu Munclingerovi PhD. za jejich připomínky a veškerou pomoc při zpracovávání výsledků a sepisování práce. Dále patří velký dík Adéle Šmídové a Zuzaně Bainové, které velkým dílem přispěly zejména při analýze TLR, které prošly složitou, pracnou a dlouhotrvající optimalizací v rámci projektu GAČR P502/12/P179 a za pomoc při analýze mtDNA a mikrosatelitů v rámci GAUK (projekt č. 259358). V neposlední řadě děkuji Anežce Pojezdné, která se na projektu též podílela a nasbírala většinu vzorků DNA v této práci analyzovaných jedinců. Děkuji i dalším členům týmu Evoluční a ekologické imunologie za jejich užitečné postřehy a poznámky. Největší poděkování však patří mé rodině, která mě ve všem podporovala, a to nejen při psaní této práce, ale zejména v průběhu celého studia.

8. Seznam tabulek

Tabulka č. 1 – Seznam analyzovaných plemen, jejich původ, užitkovost a zařazení.

Tabulka č. 2 – Mikrosatelitové lokusy – Vybrané primery a jejich sekvence.

Tabulka č. 3 – Sestavené multiplexy.

Tabulka č. 4 – Mikrosatelity – velikost PCR produktu a fluorescenční značení.

Tabulka č. 5 – Amplifikační primery pro cytochrom B a D-loop

Tabulka č. 6 – Sekvenační primery pro D-loop.

Tabulka č. 7 – Amplifikační primery pro TLR3.

Tabulka č. 8 – Sekvenační primery pro TLR3.

Tabulka č. 9 – Amplifikační primery pro TLR4.

Tabulka č. 10 – Sekvenační primery pro TLR4.

Tabulka č. 11 – Amplifikační primery pro TLR5.

Tabulka č. 12 – Sekvenační primery pro TLR5.

Tabulka č. 13 – Amplifikační primery pro TLR7.

Tabulka č. 14 – Sekvenační primery pro TLR7.

Tabulka č. 15 – Vybrané jaderné geny, místo lokalizace a seznam použitých primerů.

Tabulka č. 16 – Základní charakteristika mikrosatelitů.

Tabulka č. 17 – Detekované privátní alely – analýzy mikrosatelitových markerů.

Tabulka č. 18 – Základní charakteristika TLR.

Tabulka č. 19 – Nejlepší nalezená K, do kterých mohou být analyzovaní jedinci rozděleni.

Tabulka č. 20 – Pravděpodobná příbuznost moderních a starobylých plemen.

Tabulka č. 21 – Seznam použitých vzorků.

9. Seznam zkratk

AMOVA	analýza molekulární variance
bp	base pairs, páry bází
CNV	copy number variations, variabilita počtu kopií
DNA	deoxyribonukleotidová kyselina
MM	mastermix
MPX	multiplex
mtDNA	mitochondriální DNA
NGS	next generation sequencing, sekvenování nové generace
PCR	polymerase chain reaction, polymerázová řetězová reakce
RAPD	random amplified polymorphism, polymorfismus náhodně amplifikované DNA
TLR	Toll-like receptor

10. Seznam obrázků

Obrázek č. 1 – Fylogenetický strom druhů rodu *Gallus*.

Obrázek č. 2 - Mitochondriální DNA kura domácího.

Obrázek č. 3 – Příklad grafu mikrosatelitového lokusu MCW0217.

Obrázek č. 4 – TLR 3 – lokalizace použitých primerů.

Obrázek č. 5 – TLR 4 – lokalizace použitých primerů.

Obrázek č. 6 – TLR 5 – lokalizace použitých primerů.

Obrázek č. 7 – TLR 7 – lokalizace použitých primerů.

Obrázek č. 8 – 3D model znázorňující příbuznost plemen.

Obrázek č. 9 - Grafické zobrazení optimálních K.

Obrázek č. 10 – K = 2

Obrázek č. 11 – K = 3

Obrázek č. 12 – K = 6

Obrázek č. 13 – K = 14

Obrázek č. 14 – K = 29

Obrázek č. 15 – Zobrazení vzájemné podobnosti plemen v programu Splitstree.

Obrázek č. 16 – Grafické znázornění analyzovaných plemen ve 4 haplotypových rodinách.

Obrázek č. 17 - Celosvětové rozložení jednotlivých haplotypových rodin podle Miao et al. (2013).

Obrázek č. 18 – Přehled existujících haplotypových rodin znázorněných v grafu společně s námi analyzovanými vzorky.

Obrázky č. 19 – Kruhové grafy vybraných poddruhů rodu *Gallus*.

Obrázek č. 20 – Mapa s vyznačeným umístěním detekovaných haplotypových rodin.

Obrázek č. 21 - Počet alel získaných analýzou mikrosatelitů u 9 plemen.

Obrázek č. 22 - Počet alel získaný analýzou TLR u 9 plemen.

Obrázek č. 23 - Srovnání variability starobylých a moderních plemen na základě počtu alel na jedince.

Obrázek č. 24 - Srovnání variability starobylých a moderních plemen na základě počtu heterozygotních lokusů na jedince

Obrázek č. 25 - Analýza molekulární variance mikrosatelitů u 110 jedinců.

Obrázek č. 26 - Analýza molekulární variance TLR u 110 jedinců.

Obrázek č. 27 - Zobrazení sdílení alel mikrosatelitů a TLR mezi plemeny.

Obrázek č. 28 - Zobrazení všech majoritních klastrů, které byly vygenerovány programem Structure.

Obrázek č. 29 - Zobrazení všech minoritních klastrů, které byly vygenerovány programem Structure.

11. Literatura

- Alcaide, M., & Edwards, S. V. (2011). Molecular evolution of the toll-like receptor multigene family in birds. *Molecular Biology and Evolution*, 28(5), 1703-1715.
- Alexander, M., Ho, S. Y., Molak, M., Barnett, R., Carlborg, Ö., Dorshorst, B., Honaker, Ch., Besnier, F., Wahlberg, P., Dobney, K., Siegel, P., Andersson, L. & Larson, G. (2015). Mitogenomic analysis of a 50-generation chicken pedigree reveals a rapid rate of mitochondrial evolution and evidence for paternal mtDNA inheritance. *Biology letters*, 11(10), 20150561.
- Backström, N., Brandström, M., Gustafsson, L., Qvarnström, A., Cheng, H., & Ellegren, H. (2006). Genetic mapping in a natural population of collared flycatchers (*Ficedula albicollis*): conserved synteny but gene order rearrangements on the avian Z chromosome. *Genetics*, 174(1), 377-386.
- Backström, N., Fagerberg, S., & Ellegren, H. (2008). Genomics of natural bird populations: a gene-based set of reference markers evenly spread across the avian genome. *Molecular ecology*, 17(4), 964-980.
- Bainová, Z., Šmídová, A., Buchtová, L., Bryjová, A., Pojezdná, A., Munclinger, P. & Vikler, M. (in prep.). Genetic Diversity of Innate Immune Receptors Shaped by Natural and Artificial Selection in Ancient Domestic Fowl Breeds: Evidence for Ancestral Polymorphism and Gene-flow.
- Bandelt, H. J., Forster, P., & Röhl, A. (1999). Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular biology and evolution*, 16(1), 37-48.
- Belkhir, K., Borsa, P., Chikhi, L., Raufaste, N., & Bonhomme, F. (2004). GENETIX 4.05, Population genetics software for Windows TM. *Université de Montpellier II. Montpellier*.
- Bodzsar, N., Eding, H., Revay, T., Hidas, A., & Weigend, S. (2009). Genetic diversity of Hungarian indigenous chicken breeds based on microsatellite markers. *Animal Genetics*, 40(4), 516-523.
- Borge, T., Webster, M. T., Andersson, G., & Saetre, G. P. (2005). Contrasting patterns of polymorphism and divergence on the Z chromosome and autosomes in two *Ficedula* flycatcher species. *Genetics*, 171(4), 1861-1873.
- Brandström, M., & Ellegren, H. (2007). The genomic landscape of short insertion and deletion polymorphisms in the chicken (*Gallus gallus*) genome: a high frequency of deletions in tandem duplicates. *Genetics*, 176(3), 1691-1701.
- Brandström, M., & Ellegren, H. (2008). Genome-wide analysis of microsatellite polymorphism in chicken circumventing the ascertainment bias. *Genome research*, 18(6), 881-887.
- Brisbin, I. L., & Peterson, A. T. (2007). Playing chicken with red junglefowl: identifying phenotypic markers of genetic purity in *Gallus gallus*. *Animal Conservation*, 10(4), 429-435.
- Brownlie, R., & Allan, B. (2011). Avian toll-like receptors. *Cell and tissue research*, 343(1), 121-130.
- Ceccobelli, S., Lorenzo, P. D., Lancioni, H., Castellini, C., Ibáñez, L. V. M., Sabbioni, A., Sarti, F. M., Weigend, S. & Lasagna, E. (2013). Phylogeny, genetic relationships and population structure of five Italian local chicken breeds. *Italian Journal of Animal Science*, 12(3), e66.
- Ceccobelli, S., Di Lorenzo, P., Lancioni, H., Ibáñez, L. M., Tejedor, M. T., Castellini, C., Landi, M., Martinez, A. M., Delgado Bermejo, J. V., Vega Pla, J. L., Jurado, J. L., García, N., Attard, G., Gromal, A., Stojanovic, C., Kume, K., Panella, F., Weigend, S. & Lasagna, E. (2015). Genetic diversity and phylogeographic structure of sixteen Mediterranean chicken breeds assessed with microsatellites and mitochondrial DNA. *Livestock Science*, 175, 27-36.
- Crooijmans, R. P., Groen, A. F., van Kampen, A. J., van der Beek, S, van der Poel, J. J., & Groenen, M. A. (1996). Microsatellite polymorphism in commercial broiler and layer lines estimated using pooled blood samples. *Poultry Science*, 75(7), 904-909.

- Earl, D. A. (2012). STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation genetics resources*, 4(2), 359-361.
- Eda, M., Lu, P., Kikuchi, H., Li, Z., Li, F., & Yuan, J. (2016). Reevaluation of early Holocene chicken domestication in northern China. *Journal of Archaeological Science*, 67, 25-31.
- Elferink, M. G., Megens, H. J., Vereijken, A., Hu, X., Crooijmans, R. P., & Groenen, M. A. (2012). Signatures of selection in the genomes of commercial and non-commercial chicken breeds. *PLoS One*, 7(2), e32720.
- Englund, T., Strömstedt, L., & Johansson, A. M. (2014). Relatedness and diversity of nine Swedish local chicken breeds as indicated by the mtDNA D-loop. *Hereditas*, 151(6), 229-233.
- Eriksson, J., Larson, G., Gunnarsson, U., Bed'hom, B., Tixier-Boichard, M., Strömstedt, L., Wright, D., Jungerius, A., Vereijken, A., Randi, E., Andersson, L. & Jensen, P. (2008). Identification of the yellow skin gene reveals a hybrid origin of the domestic chicken. *PLoS Genet*, 4(2), e1000010.
- 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), 2611-2620.
- Flink, L. G., Allen, R., Barnett, R., Malmström, H., Peters, J., Eriksson, J., Andersson, L., Dobney, K. & Larson, G. (2014). Establishing the validity of domestication genes using DNA from ancient chickens. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(17), 6184-6189.
- Fumihito, A., Miyake, T., Sumi, S., Takada, M., Ohno, S., & Kondo, N. (1994). One subspecies of the red junglefowl (*Gallus gallus gallus*) suffices as the matriarchic ancestor of all domestic breeds. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(26), 12505-9.
- Fumihito, A., Miyake, T., Takada, M., Shingu, R., Endo, T., Gojobori, T., Ohno, S., et al. (1996). Monophyletic origin and unique dispersal patterns of domestic fowls. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(13), 6792-6795.
- Granevitze, Z., Hillel, J., Chen, G. H., Cuc, N. T. K., Feldman, M., Eding, H., & Weigend, S. (2007). Genetic diversity within chicken populations from different continents and management histories. *Animal genetics*, 38(6), 576-583.
- Granevitze, Z., Hillel, J., Feldman, M., Six, A., Eding, H., & Weigend, S. (2009). Genetic structure of a wide-spectrum chicken gene pool. *Animal genetics*, 40(5), 686-693.
- Groenen, M. A. M., Crooijmans, R. P. M. A., Veenendaal, A., Cheng, H. H., Siwek, M., & Van der Poel, J. J. (1998). A comprehensive microsatellite linkage map of the chicken genome. *Genomics*, 49(2), 265-274.
- Groenen, M. A., Cheng, H. H., Bumstead, N., Benkel, B. F., Briles, W. E., Burke, T., Burt, D. W., Crittenden, L. B., Dodgson, J., Hillel, J., Lamont, S., Ponce de Leon, A., Soller, M., Takahashi, H. & Vignal, A. (2000). A consensus linkage map of the chicken genome. *Genome Research*, 10(1), 137-147.
- Hackett, S. J., R. T. Kimball, S. Reddy, R. C. K. Bowie, E. L. Braun, M. J. Braun, J. L. Chojnowski, W. A. Cox, K.-L. Han, J. Harshman, C. J. Huddleston, B. D. Marks, K. J. Miglia, W. S. Moore, F. H. Sheldon, D. W. Steadman, C. C. Witt, and T. Yuri. 2008. A Phylogenomic Study of Birds Reveals Their Evolutionary History. *Science* 320 :1763-1768.
- Hillel, J., Groenen, M. A., Tixier-Boichard, M., Korol, A. B., David, L., Kirzhner, V. M., Weigend, S., et al. (2003). Biodiversity of 52 chicken populations assessed by microsatellite typing of DNA pools. *Genetics Selection Evolution*, 35(5), 533-558.
- Huang, X. H., Zhong, F. S., Li, W. N., Chen, J. B., Zhang, A. X., & Yao, Q. F. (2014). Complete mitochondrial genome of the Wuhua three-yellow chicken (*Gallus gallus domesticus*). *Mitochondrial DNA*, 1-2.
- Huang, Y. Q., Chen, W., Huang, Y. H., Shi, X. W., Deng, X. M., Kang, X. T., & Li, N. (2012). Haplotypic variation and characteristics across the toll-like receptor 3 locus in chickens. *Animal genetics*, 43(3), 343-347.

- Huson, D. H., & Bryant, D. (2006). Application of phylogenetic networks in evolutionary studies. *Molecular biology and evolution*, 23(2), 254-267.
- Chen, G. H., Wu, X. S., Wang, D. Q., Qin, J., Wu, S. L., Zhou, Q. L., Xie, F., Cheng, R., Xu, Q., Liu, B., Zhang, X. Y. & Olowofeso, O. (2004). Cluster analysis of 12 Chinese native chicken populations using microsatellite markers. *ASIAN AUSTRALASIAN JOURNAL OF ANIMAL SCIENCES*, 17(8), 1047-1052.
- International Chicken Polymorphism Map Consortium (2004). A genetic variation map for chicken with 2.8 million single-nucleotide polymorphisms. *Nature*, 432(7018), 717-722.
- Iqbal, M., Philbin, V. J., & Smith, A. L. (2005). Expression patterns of chicken Toll-like receptor mRNA in tissues, immune cell subsets and cell lines. *Veterinary immunology and immunopathology*, 104(1), 117-127.
- Iwasaki, A., & Medzhitov, R. (2004). Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nature immunology*, 5(10), 987-995.
- Jia, X., Chen, S., Zhou, H., Li, D., Liu, W., & Yang, N. (2013). Copy number variations identified in the chicken using a 60K SNP BeadChip. *Animal genetics*, 44(3), 276-284.
- Kanginakudru, S., Metta, M., Jakati, R. D., & Nagaraju, J. (2008). Genetic evidence from Indian red jungle fowl corroborates multiple domestication of modern day chicken. *BMC evolutionary biology*, 8, 174.
- Kannaki, T. R., Reddy, M. R., Shanmugam, M., Verma, P. C., & Sharma, R. P. (2010). Chicken toll-like receptors and their role in immunity. *World's Poultry Science Journal*, 66(04), 727-738.
- Keestra, A. M., de Zoete, M. R., van Aubel, R. A., & van Putten, J. P. (2008). Functional characterization of chicken TLR5 reveals species-specific recognition of flagellin. *Molecular immunology*, 45(5), 1298-1307.
- Kogut, M., He, H., & Kaiser, P. (2005). Lipopolysaccharide binding protein/CD14/TLR4-dependent recognition of Salmonella LPS induces the functional activation of chicken heterophils and up-regulation of pro-inflammatory cytokine and chemokine gene expression in these cells. *Animal biotechnology*, 16(2), 165-181.
- 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.
- Kruglyak, S., Durrett, R. T., Schug, M. D., & Aquadro, C. F. (1998). Equilibrium distributions of microsatellite repeat length resulting from a balance between slippage events and point mutations. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(18), 10774-10778.
- Lan, D., Hu, Y., Zhu, Q., & Liu, Y. (2015). Mitochondrial DNA study in domestic chicken. *Mitochondrial DNA*, 1-5.
- Larson, G., & Fuller, D. Q. (2014). The evolution of animal domestication. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 45, 115-136.
- Liu, L. L., Xie, H. B., Yang, Y. S., Yu, Q. F., & He, J. H. (2016,a). The complete mitochondrial genome of the Xuefeng black-boned chicken. *Mitochondrial DNA*, 27(1), 30-31.
- Liu, L. L., Xie, H. B., Yu, Q. F., He, S. P., & He, J. H. (2016,b). Determination and analysis of the complete mitochondrial genome sequence of Taoyuan chicken. *Mitochondrial DNA*, 27(1), 371-372.
- Liu, Y. P., Wu, G. S., Yao, Y. G., Miao, Y. W., Luikart, G., Baig, M., Zhang, Y. P., et al. (2006). Multiple maternal origins of chickens: out of the Asian jungles. *Molecular phylogenetics and evolution*, 38(1), 12-19.
- Lyimo, C. M., Weigend, A., Msoffe, P. L., Eding, H., Simianer, H., & Weigend, S. (2014). Global diversity and genetic contributions of chicken populations from African, Asian and European regions. *Animal genetics*, 45(6), 836-848.

- Lyimo, C. M., Weigend, A., Msoffe, P. L., Hocking, P. M., Simianer, H., & Weigend, S. (2015). Maternal genealogical patterns of chicken breeds sampled in Europe. *Animal genetics*, 46(4), 447-451.
- Meydan, H., Jang, C. P., Yildiz, M. A., & Weigend, S. (2016). Maternal origin of Turkish and Iranian Native Chickens inferred from Mitochondrial DNA D-Loop Sequences. *Asian-Australasian journal of animal sciences*.
- Miao, Y. W., Peng, M. S., Wu, G. S., Ouyang, Y. N., Yang, Z. Y., Yu, N., Zhang, Y. P., et al. (2013). Chicken domestication: an updated perspective based on mitochondrial genomes. *Heredity*, 110(3), 277-282.
- Nicholls, T. J., & Minczuk, M. (2014). In D-loop: 40years of mitochondrial 7S DNA. *Experimental gerontology*, 56, 175-181.
- Niu, D., Fu, Y., Luo, J., Ruan, H., Yu, X. P., Chen, G., & Zhang, Y. P. (2002). The origin and genetic diversity of Chinese native chicken breeds. *Biochemical genetics*, 40(5-6), 163-174.
- Oka, T., Ino, Y., Nomura, K., Kawashima, S., Kuwayama, T., Hanada, H., Amano, T., Takada, M., Takahata, N., Hayashi, Y. & Akishinomiya, F. (2007). Analysis of mtDNA sequences shows Japanese native chickens have multiple origins. *Animal genetics*, 38(3), 287-293.
- Pavel, I. & Tuláček, F., 2006. *Vzorník plemen drůbeže*, Praha: Český svaz chovatelů.
- Peakall, R. O. D., & Smouse, P. E. (2006). GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular ecology notes*, 6(1), 288-295.
- Peng, M. S., Shi, N. N., Yao, Y. G., & Zhang, Y. P. (2015). Caveats about interpretation of ancient chicken mtDNAs from northern China. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 201501151.
- Peters, J., Lebrasseur, O., Best, J., Miller, H., Fothergill, T., Dobney, K., Thomas, R. M., Maltby, M., Sykes, N., Hanotte, O., Collins, M. J., Larson, G. & O'Connor, T. (2015). Questioning new answers regarding Holocene chicken domestication in China. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(19), E2415-E2415.
- Peterson, A. T., & Brisbin, I. L. (1998). Genetic endangerment of wild Red Junglefowl *Gallus gallus*? *Bird Conservation International*, 8(04), 387-394.
- Philbin, V. J., Iqbal, M., Boyd, Y., Goodchild, M. J., Beal, R. K., Bumstead, N., Young, J. & Smith, A. L. (2005). Identification and characterization of a functional, alternatively spliced Toll-like receptor 7 (TLR7) and genomic disruption of TLR8 in chickens. *Immunology*, 114(4), 507-521.
- Pritchard, J. K., Stephens, M., & Donnelly, P. (2000). Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, 155(2), 945-959.
- Rao, Y., Sun, L., Nie, Q., & Zhang, X. (2011). The influence of recombination on SNP diversity in chickens. *Hereditas*, 148(2), 63-69.
- Revay, T., Bodzsar, N., Mobegi, V. E., Hanotte, O., & Hidas, A. (2010). Origin of Hungarian indigenous chicken breeds inferred from mitochondrial DNA D-loop sequences. *Animal genetics*, 41(5), 548-550.
- Romanov, M. N., & Weigend, S. (2001). Analysis of genetic relationships between various populations of domestic and jungle fowl using microsatellite markers. *Poultry Science*, 80(8), 1057-1063.
- Ruan, W., Wu, Y., & Zheng, S. J. (2012). Different genetic patterns in avian Toll-like receptor (TLR) 5 genes. *Molecular biology reports*, 39(4), 3419-3426.
- Rubin, C. J., Zody, M. C., Eriksson, J., Meadows, J. R., Sherwood, E., Webster, M. T., Andersson, L., et al. (2010). Whole-genome resequencing reveals loci under selection during chicken domestication. *Nature*, 464(7288), 587-591.
- Sawai, H., Kim, H. L., Kuno, K., Suzuki, S., Gotoh, H., Takada, M., Takahata, N., Satta, Y. & Akishinomiya, F. (2010). The origin and genetic variation of domestic chickens with special reference to junglefowls *Gallus g. gallus* and *G. varius*. *PLoS one*, 5(5), e10639.

- Scrivener, D. (2014). Popular poultry breeds. Crowood.
- Schmidt, H. a Proll, R. (2007). Kapesní atlas slepic a zakrslých slepic. ISBN: 978-80-86891-54-5, 191.
- Sorenson, M. D., Ast, J. C., Dimcheff, D. E., Yuri, T., & Mindell, D. P. (1999). Primers for a PCR-based approach to mitochondrial genome sequencing in birds and other vertebrates. *Molecular phylogenetics and evolution*, 12(2), 105-114.
- Storey, A. A., Athens, J. S., Bryant, D., Carson, M., Emery, deFrance, S., K., Higham, C., Huynen, L., Intoh, M., Jones, S., Kirch, P. V., McCoy, P., Morales-Muniz, A., Quiroz, D., Reitz, E., Robins, J., Walter, R., Matisoo-Smith, E. & Ladefoged, T. (2012). Investigating the global dispersal of chickens in prehistory using ancient mitochondrial DNA signatures. *PloS one*, 7(7), e39171.
- Tadano, R., & Kataoka, Y. (2014). Genetic diversity in a small chicken population inferred from microsatellite polymorphism. *The Journal of Poultry Science*, 51(3), 242-247.
- Temperley, N. D., Berlin, S., Paton, I. R., Griffin, D. K., & Burt, D. W. (2008). Evolution of the chicken Toll-like receptor gene family: a story of gene gain and gene loss. *BMC genomics*, 9(1), 62.
- Tixier-Boichard, M., Bed'hom, B., & Rognon, X. (2011). Chicken domestication: From archeology to genomics. *Comptes rendus biologiques*, 334(3), 197-204.
- Toro, M. A., Fernández, J., & Caballero, A. (2009). Molecular characterization of breeds and its use in conservation. *Livestock Science*, 120(3), 174-195.
- Vašák, P. (2008). Drůbež a její chov v ilustracích Pavla Procházky. ISBN: 9788086858869. 264.
- Villesen, P. (2007). FaBox: an online toolbox for fasta sequences. *Molecular Ecology Notes*, 7(6), 965-968.
- Vinkler, M., Bainová, H., & Bryja, J. (2014). Protein evolution of Toll-like receptors 4, 5 and 7 within Galloanserae birds. *Genetics Selection Evolution*, 46(1), 1.
- Wang, C., Lu, H., Zhang, J., Gu, Z., & He, K. (2014). Prehistoric demographic fluctuations in China inferred from radiocarbon data and their linkage with climate change over the past 50,000 years. *Quaternary Science Reviews*, 98, 45-59.
- Wang, Y., Gu, X., Feng, C., Song, C., Hu, X., & Li, N. (2012). A genome-wide survey of copy number variation regions in various chicken breeds by array comparative genomic hybridization method. *Animal genetics*, 43(3), 282-289.
- West, B., & Zhou, B. X. (1988). Did chickens go north? New evidence for domestication. *Journal of Archaeological Science*, 15(5), 515-533.
- Wilkinson, S., Wiener, P., Teverson, D., Haley, C. S., & Hocking, P. M. (2012). Characterization of the genetic diversity, structure and admixture of British chicken breeds. *Animal genetics*, 43(5), 552-563.
- Wright, D., Boije, H., Meadows, J. R., Bed'Hom, B., Gourichon, D., Vieaud, A., Tixier-Boichard, M., Rubin, C. J., Imsland, F., Hallböök, F & Andersson, L. (2009). Copy number variation in intron 1 of SOX5 causes the Pea-comb phenotype in chickens. *PLoS Genet*, 5(6), e1000512.
- Xiang, H., Gao, J., Yu, B., Zhou, H., Cai, D., Zhang, Y., Cai, D., Zhang, Y., Chen, X., Hofreiter, M. & Zhao, X. (2014). Early Holocene chicken domestication in northern China. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(49), 17564-17569.
- Yacoub, H. A., & Fathi, M. M. (2013). Phylogenetic analysis using d-loop marker of mtDNA of Saudi native chicken strains. *Mitochondrial DNA*, 24(5), 538-551.

Yap, F. C., Yan, Y. J., Loon, K. T., Zhen, J. L. N., Kamau, N. W., & Kumaran, J. V. (2010). Phylogenetic analysis of different breeds of domestic chickens in selected area of Peninsular Malaysia inferred from partial cytochrome b gene information and RAPD markers. *Animal biotechnology*, 21(4), 226-240.

Zeuner, F. E. (1963). A history of domesticated animals. *A history of domesticated animals*.

Zhang, X., Leung, F. C., Chan, D. K., Chen, Y., & Wu, C. (2002). Comparative analysis of allozyme, random amplified polymorphic DNA, and microsatellite polymorphism on Chinese native chickens. *Poultry science*, 81(8), 1093-1098.

Zima, J., Macholán, M., Muclinger, P. & Piálek J. (2004). Genetické metody v zoologii. *Karolinum, Praha*.

12. Přílohy:

12.1 Seznam použitých vzorků

Tabulka č. 21 – Seznam vzorků, které byly v diplomové práci použity. Jedinci s výrazně vyznačeným bankovním kódem spadaly do skupiny 110 plemen, u kterých proběhla analýza všech 20 neutrálních markerů a 4 imunitních genů.

	Bankovní kód	Plemeno	Chovatel
1	2012GG0001	Araukana	Bočková Miloslava
2	2012GG0002	Araukana	Bočková Miloslava
3	2012GG0003	Araukana	Bočková Miloslava
4	2012GG0006	Araukana	Kodytek Josef
5	2012GG0007	Araukana	Kodytek Josef
6	2012GG0008	Araukana	Bočková Miloslava
7	2012GG0024	Araukana	Kodytek Josef
8	2012GG0025	Araukana	Kodytek Josef
9	2012GG0036	Araukana	Pawlas Vladislav
10	2012GG0037	Araukana	Pawlas Vladislav
11	2012GG0038	Araukana	Pawlas Vladislav
12	2013GG0295	Araukana	Kodytek Josef
13	2011GG0017	Asilka	Jorda Michal
14	2011GG0018	Asilka	Jorda Michal
15	2012GG0185	Asilka	Kaiser Wolfgang
16	2012GG0186	Asilka	Kaiser Wolfgang
17	2012GG0187	Asilka	Kaiser Wolfgang
18	2013GG0024	Asilka	Wollenburger Jean Marc
19	2013GG0025	Asilka	Wollenburger Jean Marc
20	2013GG0026	Asilka	Wollenburger Jean Marc
21	2014GG0241	Asilka	Vlas Rostislav
22	2014GG0266	Australka	Horinka Tomáš
23	2014GG0267	Australka	Horinka Tomáš
24	2014GG0268	Australka	Horinka Tomáš
25	2014GG0269	Australka	Ječný Oldřich
26	2014GG0270	Australka	Ječný Oldřich
27	2014GG0271	Australka	Ječný Oldřich
28	2014GG0272	Australka	Novák Michal
29	2014GG0273	Australka	Novák Michal
30	2014GG0274	Australka	Novák Michal
31	2011GG0006	Bantamka	Rohrer Patrik
32	2011GG0007	Bantamka	Rohrer Patrik
33	2012GG0069	Bantamka	Šulc Jan
34	2012GG0070	Bantamka	Šulc Jan
35	2012GG0075	Bantamka	Verner František
36	2012GG0076	Bantamka	Verner František
37	2012GG0077	Bantamka	Verner František
38	2013GG0238	Bantamka	Beran Josef
39	2013GG0239	Bantamka	Beran Josef
40	2013GG0240	Bantamka	Beran Josef
41	2014GG0096	Bantamka	Šolc Josef & syn
42	2013GG0011	Barneveldka	Bakker Hendrik
43	2013GG0072	Barneveldka	Hlava Luděk
44	2013GG0141	Barneveldka	Polášková Alena
45	2013GG0142	Barneveldka	Polášková Alena

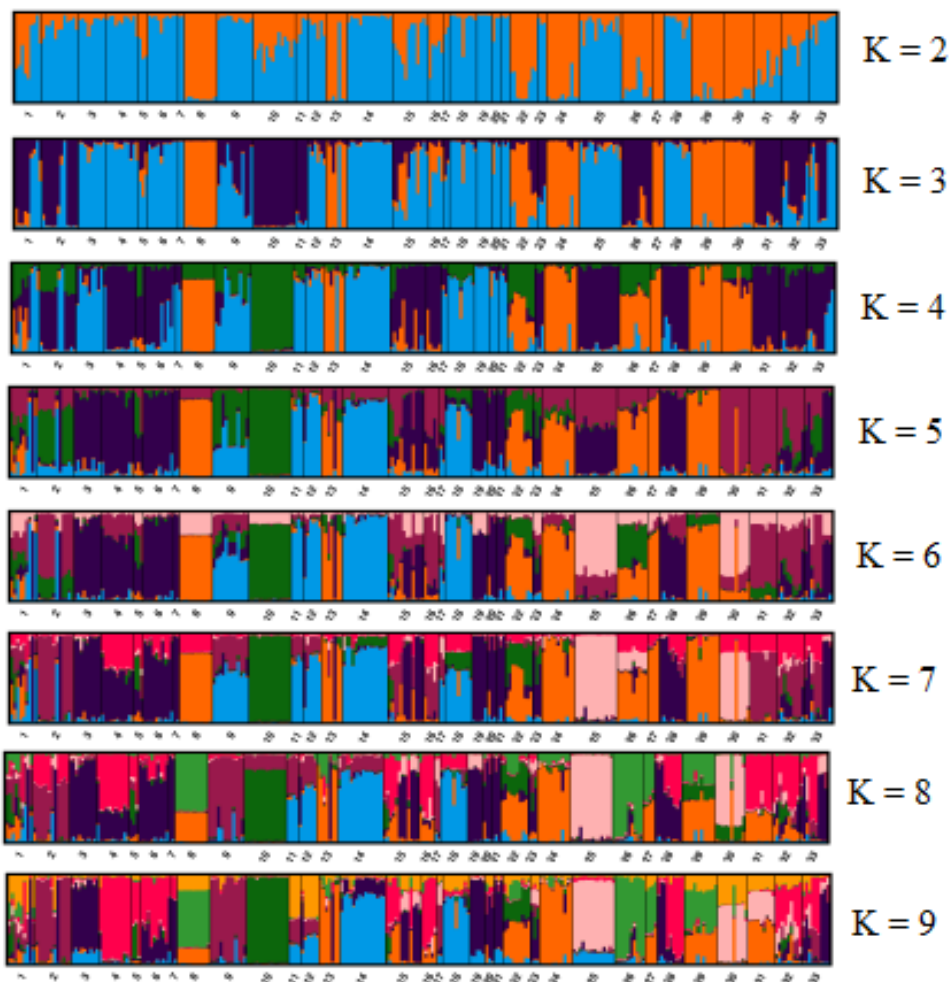
46	2013GG0144	Barneveldka	Polášková Alena
47	2013GG0285	Barneveldka	Flachs
48	2013GG0286	Barneveldka	Flachs
49	2013GG0287	Barneveldka	Flachs
50	2013GG0301	Barneveldka	Kukla Jiří
51	2013GG0302	Barneveldka	Kukla Jiří
52	2013GG0303	Barneveldka	Kukla Jiří
53	2012GG0106	Barneveldka zakrslá	Kubát Miloslav
54	2012GG0107	Barneveldka zakrslá	Kubát Miloslav
55	2012GG0110	Barneveldka zakrslá	Kubát Miloslav
56	2010GG0011	Bojovnice šamo	ZOO Vyškov
57	2012GG0169	Bojovnice šamo	ZOO Vyškov
58	2012GG0170	Bojovnice šamo	ZOO Vyškov
59	2013GG0027	Bojovnice šamo	Wollenburger Jean Marc
60	2013GG0076	Bojovnice šamo	Pignatti Luca
61	2013GG0080	Bojovnice šamo	Pignatti Luca
62	2013GG0136	Bojovnice šamo	Syrová Irena
63	2013GG0138	Bojovnice šamo	Syrová Irena
64	2013GG0140	Bojovnice šamo	Syrová Irena
65	2013GG0355	Bojovnice šamo	Hort Leoš
66	2013GG0356	Bojovnice šamo	Hort Leoš
67	2013GG0357	Bojovnice šamo	Hort Leoš
68	2012GG0055	Brahmánka	ZOO Vyškov
69	2012GG0102	Brahmánka	Přindiš Rostislav
70	2012GG0103	Brahmánka	Přindiš Rostislav
71	2012GG0104	Brahmánka	Přindiš Rostislav
72	2012GG0122	Brahmánka	Giesová Olga
73	2012GG0123	Brahmánka	Giesová Olga
74	2012GG0124	Brahmánka	Giesová Olga
75	2012GG0160	Brahmánka	Šuterová Jana
76	2012GG0163	Brahmánka	Šuterová Jana
77	2012GG0165	Brahmánka	Šuterová Jana
78	2012GG0050	Brahmánka zakrslá	ZOO Vyškov
79	2012GG0054	Brahmánka zakrslá	ZOO Vyškov
80	2012GG0058	Česka	Kosík Milan
81	2012GG0059	Česka	Kosík Milan
82	2012GG0060	Česka	Kosík Milan
83	2012GG0071	Česka	Baše Zdeněk
84	2012GG0072	Česka	Baše Zdeněk
85	2012GG0073	Česka	Baše Zdeněk
86	2012GG0081	Česka	Vančat Stanislav
87	2012GG0082	Česka	Vančat Stanislav
88	2012GG0083	Česka	Vančat Stanislav
89	2012GG0085	Česka	Šuba Zdeněk
90	2012GG0086	Česka	Šuba Zdeněk
91	2012GG0087	Česka	Šuba Zdeněk
92	2012GG0116	Česka	Kubát Miloslav
93	2012GG0117	Česka	Kubát Miloslav
94	2012GG0029	Fénixka	Jerman Jakub
95	2012GG0030	Fénixka	Jerman Jakub
96	2012GG0031	Fénixka	Jerman Jakub
97	2012GG0032	Fénixka	Jerman Jakub
98	2013GG0060	Fénixka zakrslá	Hertl Miroslav
99	2013GG0061	Fénixka zakrslá	Hertl Miroslav
100	2013GG0275	Fénixka zakrslá	Dalecká Daniela
101	2013GG0276	Fénixka zakrslá	Dalecká Daniela
102	2013GG0277	Fénixka zakrslá	Dalecká Daniela
103	2013GG0278	Fénixka zakrslá	Dalecká Daniela

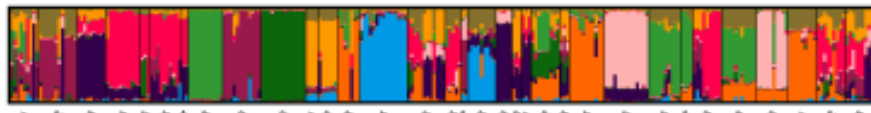
104	2012GG0063	Hedvábnička	Vinklerovi Michal a Jitka
105	2012GG0084	Hedvábnička	Starý Pavel
106	2013GG0198	Hedvábnička	Tománek
107	2013GG0200	Hedvábnička	Mach Jan
108	2013GG0201	Hedvábnička	Mach Jan
109	2013GG0202	Hedvábnička	Mach Jan
110	2013GG0248	Hedvábnička	Dalecká Daniela
111	2013GG0270	Hedvábnička	Maňáková
112	2013GG0271	Hedvábnička	Maňáková
113	2013GG0272	Hedvábnička	Maňáková
114	2013GG0350	Hedvábnička	Veselý Josef
115	2013GG0351	Hedvábnička	Veselý Josef
116	2013GG0352	Hedvábnička	Veselý Josef
117	2013GG0396	Hedvábnička	Novotný Karel
118	2013GG0399	Hedvábnička	Novotný Karel
119	2012GG0126	Holandská chocholata z drobnělá	Veselý Josef
120	2012GG0127	Holandská chocholata z drobnělá	Veselý Josef
121	2012GG0136	Holandská chocholata z drobnělá	Veselý Josef
122	2013GG0296	Holandská chocholata z drobnělá	Šanda Jan
123	2013GG0297	Holandská chocholata z drobnělá	Šanda Jan
124	2013GG0338	Holandská chocholata z drobnělá	Veselý Josef
125	2013GG0339	Holandská chocholata z drobnělá	Veselý Josef
126	2012GG0064	Holokrčka	Vrátný Ladislav
127	2012GG0065	Holokrčka	Vrátný Ladislav
128	2012GG0066	Holokrčka	Vrátný Ladislav
129	2013GG0040	Holokrčka	Bergk Ralf
130	2013GG0041	Holokrčka	Bergk Ralf
131	2013GG0245	Holokrčka	Hejda František
132	2013GG0246	Holokrčka	Hejda František
133	2013GG0247	Holokrčka	Hejda František
134	2013GG0290	Holokrčka	Prombergerová Iveta Ing. Ph.D.
135	2013GG0373	Holokrčka	Justych Václav
136	2013GG0374	Holokrčka	Justych Václav
137	2013GG0375	Holokrčka	Justych Václav
138	2012GG0035	Holokrčka z drobnělá	Bradna Vladimír Ing.
139	2012GG0039	Holokrčka z drobnělá	Vanžura Josef
140	2012GG0040	Holokrčka z drobnělá	Vanžura Josef
141	2012GG0041	Holokrčka z drobnělá	Vanžura Josef
142	2012GG0146	Holokrčka z drobnělá	Vychodil František, Ing.
143	2012GG0153	Japonka čabo	Šolc Josef & syn
144	2012GG0154	Japonka čabo	Šolc Josef & syn
145	2013GG0057	Japonka čabo	Hertl Miroslav
146	2013GG0058	Japonka čabo	Hertl Miroslav
147	2013GG0059	Japonka čabo	Hertl Miroslav
148	2013GG0064	Japonka čabo	Šolc Josef & syn
149	2013GG0220	Japonka čabo	Majrichová Jitka
150	2013GG0221	Japonka čabo	Majrichová Jitka
151	2013GG0222	Japonka čabo	Majrichová Jitka
152	2012GG0033	Jokohamka	Štěpánovský Jiří
153	2012GG0034	Jokohamka	Štěpánovský Jiří
154	2012GG0045	Kadeřavá slepice	ZOO Vyškov
155	2012GG0046	Kadeřavá slepice	ZOO Vyškov
156	2012GG0049	Kadeřavá slepice	ZOO Vyškov
157	2013GG0361	Kočinka	Wissenschaftlichen geflügelhof des BDRG
158	2013GG0362	Kočinka	Wissenschaftlichen geflügelhof des BDRG
159	2013GG0363	Kočinka	Wissenschaftlichen geflügelhof des BDRG
160	2013GG0364	Kočinka	Wissenschaftlichen geflügelhof des BDRG

161	2013GG0365	Kočínka	Wissenschaftlichen geflügelhof des BDRG
162	2012GG0139	Kočínka zakrslá	Cik Jiří
163	2012GG0143	Kočínka zakrslá	Cik Jiří
164	2012GG0144	Kočínka zakrslá	Cik Jiří
165	2012GG0016	Lafleška	Ferjenčík Peter
166	2012GG0017	Lafleška	Ferjenčík Peter
167	2012GG0018	Lafleška	Ferjenčík Peter
168	2012GG0174	Lafleška	Dohnal Petr
169	2012GG0176	Lafleška	Dohnal Petr
170	2012GG0177	Lafleška	Dohnal Petr
171	2013GG0460	Lafleška	Vollenhardt Chris
172	2013GG0461	Lafleška	Vollenhardt Chris
173	2013GG0462	Lafleška	Vollenhardt Chris
174	2012GG0044	Malajka	ZOO Vyškov
175	2012GG0167	Malajka	ZOO Vyškov
176	2012GG0168	Malajka	ZOO Vyškov
177	2013GG0042	Maranska	Bergk Ralf
178	2013GG0043	Maranska	Bergk Ralf
179	2013GG0044	Maranska	Bergk Ralf
180	2013GG0045	Maranska	Bergk Ralf
181	2013GG0046	Maranska	Bergk Ralf
182	2014GG0257	Maranska	Hladík Jaroslav
183	2014GG0258	Maranska	Hladík Jaroslav
184	2014GG0259	Maranska	Hladík Jaroslav
185	2014GG0260	Maranska	Chichmanov Ivan
186	2014GG0261	Maranska	Chichmanov Ivan
187	2014GG0262	Maranska	Chichmanov Ivan
188	2014GG0263	Maranska	Mahulík Pravoslav
189	2014GG0264	Maranska	Mahulík Pravoslav
190	2014GG0265	Maranska	Mahulík Pravoslav
191	2012GG0091	Minorka	Švarc Josef
192	2012GG0092	Minorka	Švarc Josef
193	2012GG0093	Minorka	Švarc Josef
194	2012GG0112	Minorka	Hýsek Milan
195	2012GG0113	Minorka	Hýsek Milan
196	2012GG0114	Minorka	Hýsek Milan
197	2013GG0164	Minorka	Smetanová Gitta
198	2013GG0205	Minorka	Tománek
199	2013GG0223	Minorka	Majrichová Jitka
200	2013GG0224	Minorka	Majrichová Jitka
201	2013GG0225	Minorka	Majrichová Jitka
202	2012GG0013	Orlovka	Nadzdy Peter
203	2012GG0014	Orlovka	Nadzdy Peter
204	2012GG0015	Orlovka	Nadzdy Peter
205	2012GG0171	Orlovka	ZOO Vyškov
206	2012GG0172	Orlovka	ZOO Vyškov
207	2012GG0173	Orlovka	ZOO Vyškov
208	2013GG0334	Orlovka	Vesely Josef
209	2013GG0358	Orlovka	Hort Leoš
210	2013GG0359	Orlovka	Hort Leoš
211	2013GG0360	Orlovka	Hort Leoš
212	2012GG0147	Paduánka zakrslá	Brandejs Alois
213	2012GG0148	Paduánka zakrslá	Brandejs Alois
214	2012GG0151	Paduánka zakrslá	Brandejs Alois
215	2012GG0152	Paduánka zakrslá	Brandejs Alois
216	2013GG0050	Plymutka	Hertl Miroslav
217	2013GG0051	Plymutka	Hertl Miroslav
218	2013GG0052	Plymutka	Hertl Miroslav

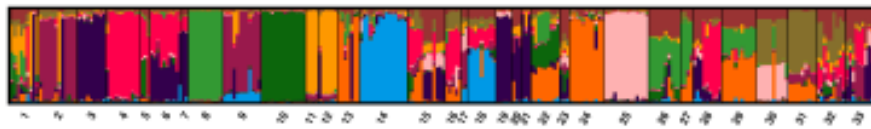
219	2014GG0251	Plymutka	Justyčová Pavla
220	2014GG0252	Plymutka	Justyčová Pavla
221	2014GG0253	Plymutka	Justyčová Pavla
222	2014GG0254	Plymutka	Řeháček Ladislav
223	2014GG0255	Plymutka	Řeháček Ladislav
224	2014GG0256	Plymutka	Řeháček Ladislav
225	2012GG0096	Rousná zakrslá	Vlasák Bohumil
226	2012GG0097	Rousná zakrslá	Vlasák Bohumil
227	2013GG0106	Rousná zakrslá	Petrovický Pavel prof. MUDr.
228	2013GG0159	Rousná zakrslá	Hronek Karel Ing.
229	2013GG0233	Rousná zakrslá	Flídr Jan
230	2013GG0234	Rousná zakrslá	Flídr Jan
231	2013GG0235	Rousná zakrslá	Flídr Jan
232	2013GG0309	Rousná zakrslá	Tuček
233	2013GG0321	Rousná zakrslá	Vlasák Bohumil
234	2014GG0115	Rousná zakrslá	Hronek Karel, Ing.
235	2014GG0116	Rousná zakrslá	Hronek Karel, Ing.
236	2012GG0051	Sebritka	ZOO Vyškov
237	2012GG0052	Sebritka	ZOO Vyškov
238	2012GG0056	Sebritka	Karkan Karel
239	2012GG0057	Sebritka	Karkan Karel
240	2012GG0119	Sebritka	Kubát Miloslav
241	2012GG0120	Sebritka	Kubát Miloslav
242	2012GG0121	Sebritka	Kubát Miloslav
243	2013GG0092	Sebritka	Zábrana Ivan
244	2013GG0095	Sebritka	Zábrana Ivan
245	2013GG0096	Sebritka	Zábrana Ivan
246	2013GG0068	Velsumka	Šolc Josef & syn
247	2013GG0069	Velsumka	Šolc Josef & syn
248	2013GG0227	Velsumka	Kulanda Stanislav
249	2013GG0288	Velsumka	Bartoš Jiří
250	2013GG0289	Velsumka	Bartoš Jiří
251	2014GG0008	Velsumka	Kulanda Stanislav
252	2014GG0009	Velsumka	Kulanda Stanislav
253	2014GG0242	Velsumka	Velíšek Jan
254	2014GG0243	Velsumka	Velíšek Jan
255	2013GG0062	Vlaška	Šolc Josef & syn
256	2013GG0063	Vlaška	Šolc Josef & syn
257	2013GG0073	Vlaška	Hlava Luděk
258	2014GG0275	Vlaška	Kukla Jiří
259	2014GG0276	Vlaška	Kukla Jiří
260	2014GG0277	Vlaška	Kukla Jiří
261	2014GG0278	Vlaška	Vrba Jaroslav
262	2014GG0279	Vlaška	Vrba Jaroslav
263	2014GG0280	Vlaška	Vrba Jaroslav
264	2013GG0479	Wyandotka	Kysilka Rudolf
265	2013GG0480	Wyandotka	Kysilka Rudolf
266	2014GG0244	Wyandotka	Kysilka Rudolf
267	2014GG0245	Wyandotka	Komárek Milan
268	2014GG0246	Wyandotka	Komárek Milan
269	2014GG0247	Wyandotka	Komárek Milan
270	2014GG0248	Wyandotka	Boukal Jaroslav, Ing.
271	2014GG0249	Wyandotka	Boukal Jaroslav, Ing.
272	2014GG0250	Wyandotka	Boukal Jaroslav, Ing.

Obr. č. 28 – Zobrazení všech majoritních klastrů, které byly vygenerovány programem Structure. Jednotlivá čísla odpovídají plemenům: 1 = A, 2 = AR, 3 = AU, 4 = BA, 5 = BAz, 6 = BH, 7 = BHz, 8 = BN, 9 = BSA, 10 = CZ, 11 = FX, 12 = FXz, 13 = HDz, 14 = HE, 15 = HK, 16 = HKz, 17 = JK, 18 = JPC, 19 = KC, 20 = KCz, 21 = KR, 22 = LF, 23 = MA, 24 = MI, 25 = MR, 26 = OL, 27 = PAz, 28 = PL, 29 = RZ, 30 = SE, 31 = V, 32 = VE, 33 = W. Celkem pro každé K běželo 10 běhů. Na základě jejich podobnosti byly vytvořeny grafy pro jednotlivá K s majoritním počtem podobných klastrů: K = 1 (10/10); K = 2 (10/10); K = 3 (5/10); K = 4 (6/10); K = 5 (9/10); K = 6 (8/10); K = 7 (5/10); K = 8 (6/10); K = 9 (6/10); K = 10 (8/10); K = 11 (10/10); K = 12 (10/10); K = 13 (4/10); K = 14 (10/10); K = 15 (5/10); K = 16 (10/10); K = 17 (10/10); K = 18 (10/10); K = 19 (10/10); K = 20 (10/10); K = 21 (7/10); K = 22 (9/10); K = 23 (7/10); K = 24 (6/10); K = 25 (8/10); K = 26 (6/10); K = 27 (10/10); K = 28 (9/10); K = 29 (9/10); K = 30 (9/10); K = 31 (8/10); K = 32 (7/10); K = 33 (9/10).

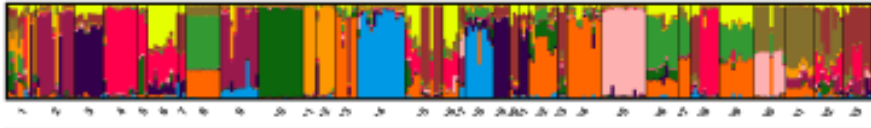




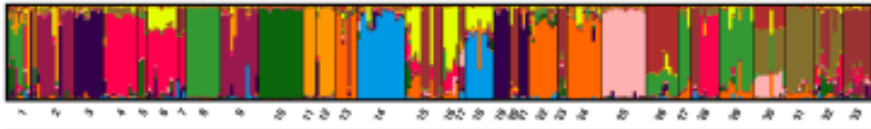
$K = 10$



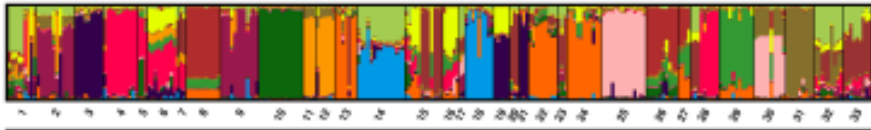
$K = 11$



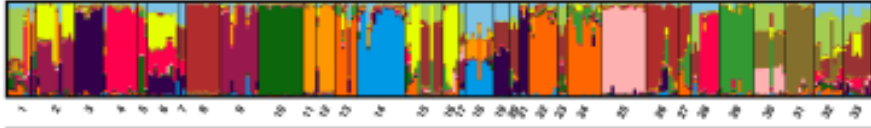
$K = 12$



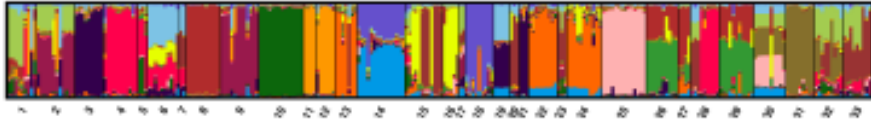
$K = 13$



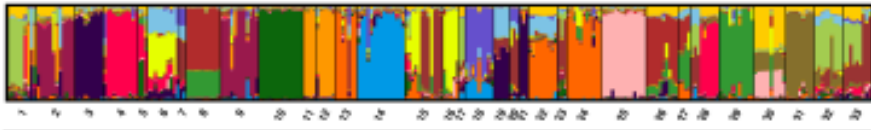
$K = 14$



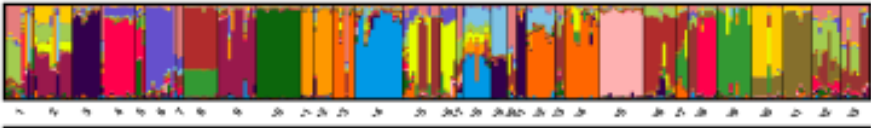
$K = 15$



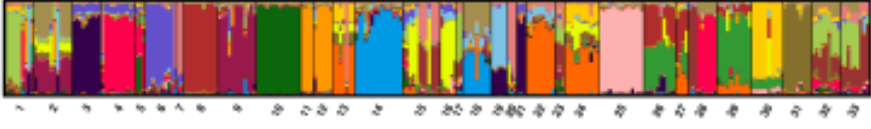
$K = 16$



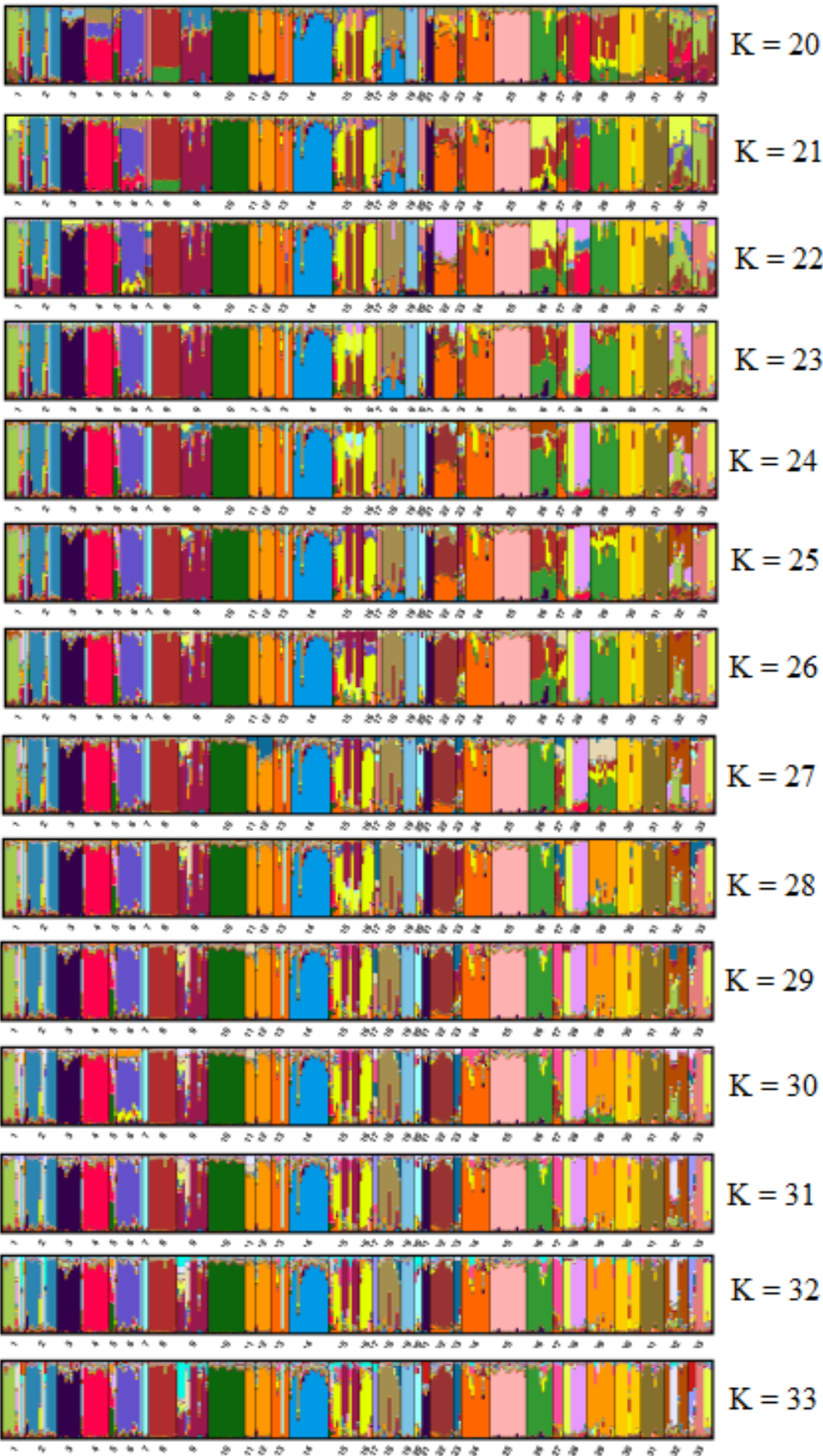
$K = 17$



$K = 18$



$K = 19$



Obrázek č. 29 - Zobrazení všech minoritních klastrů, které byly vygenerovány programem Structure. Jednotlivá čísla odpovídají plemenům: 1 = A, 2 = AR, 3 = AU, 4 = BA, 5 = BAz, 6 = BH, 7 = BHz, 8 = BN, 9 = BSA, 10 = CZ, 11 = FX, 12 = FXz, 13 = HDz, 14 = HE, 15 = HK, 16 = HKz, 17 = JK, 18 = JPC, 19 = KC, 20 = KCz, 21 = KR, 22 = LF, 23 = MA, 24 = MI, 25 = MR, 26 = OL, 27 = PAz, 28 = PL, 29 = RZ, 30 = SE, 31 = V, 32 = VE, 33 = W. Celkem pro každé K běželo 10 běhů. Na základě jejich podobnosti byly vytvořeny grafy pro jednotlivá K s minoritním počtem podobných klastrů: K = 3 (3/10); K = 3 (2/10); K = 4 (3/10); K = 4 (1/10); K = 5 (1/10); K = 6 (2/10); K = 7 (5/10); K = 8 (3/10); K = 8 (1/10); K = 9 (2/10); K = 9 (2/10); K = 10 (2/10); K = 13 (4/10); K = 13 (2/10); K = 15 (5/10); K = 21 (3/10); K = 22 (1/10); K = 23 (2/10); K = 23 (1/10); K = 24 (4/10); K = 25 (2/10); K = 26 (4/10); K = 28 (1/10); K = 29 (1/10); K = 30 (1/10); K = 31 (2/10); K = 32 (2/10); K = 32 (1/10); K = 33 (1/10).

