



## PROTOKOL O PROVEDENÝCH ANALÝZÁCH

K analýze pro hodnocení čistoty plemene **Česká slepice zlatá kropenatá** bylo dodáno celkem 132 vzorků krve od 13 chovatelů. U všech vzorků proběhla extrakce DNA z odebrané krve pomocí komerčního kitu NucleoSpin Blood od společnosti Macherey-Nagel. DNA byla o dostatečné čistotě a koncentraci v rozmezí od 100 do 200 ng/μl.

Jako molekulární marker bylo použito celkem 16 SSR markerů využívaných pro hodnocení diverzity a čistoty u kura domácího. Tyto markery byly vybrány na základě předchozích analýz prováděných na pracovišti VÚŽV a dle dostupné databáze The AVIANDIV Database (<https://aviandiv.fli.de/>). Konkrétně se jednalo o tyto mikrosatelitové lokusy: ADL 0268, MCW 0206, MCW 0295, MCW 0081, MCW 0014, MCW 0183, MCW 0330, MCW 0069, MCW 0034, LEI 0234, LEI 0094, LEI 0192, ADL 0039, LEI 0092, ADL 0021 a MCW 0078.

Všechny markery byly před vlastní analýzou optimalizovány pro podmínky laboratoře Katedry genetiky a biotechnologií FZT JU. Reakční směs pro PCR analýzu byla připravována zvlášť pro každý marker tak, aby teplota nasedání primerů byla přizpůsobena pro daný marker. Vyhodnocení výsledků z PCR analýzy probíhalo pomocí fragmentační analýzy v přístroji ABI 3500. Pro toto hodnocení byly připraveny směsné vzorky podle očekávané velikosti alel. Celkem bylo připraveno 5 mixů. Specifikace jednotlivých markerů a velikosti alel jsou zobrazeny v následující tabulce.

**Tabulka mikrosatelitových markerů pro analýzy vzorků slepic prováděné v období leden-únor 2023**

Marker	Annealing	FA mix	Alely			
			Rozmezí (bp)	Počet	Informativních	Přesné velikosti
ADL 0268	56 °C	1	107-114	4	4	107, 110, 112, 114
MCW 0206	56 °C	3	221-229	4	4	221, 225, 227, 229
MCW 0295	56 °C	2	84-98	5	5	84, 86, 88, 94, 98
MCW 0081	56 °C	3	110-132	6	6	110, 112, 119, 126, 130, 132
MCW 0014	56 °C	2	143-178	5	5	143, 145, 163, 176, 178
MCW 0183	51 °C	2	293-317	5	5	293, 300, 304, 310, 317
MCW 0330	59 °C	1	265-285	4	4	254, 265, 273, 285

MCW 0069	56 °C	1	155-166	4	4	155, 162, 164, 166
MCW 0034	56 °C	1	220-247	8	8	220, 222, 224, 229, 230, 237, 242, 247
LEI 0234	59 °C	3	215-217, 274-298	8	8	215, 216, 217, 274, 278, 282, 286, 298
LEI 0094	59 °C	5	246-277	5	5	246, 259, 261, 263, 277
LEI 0192	59 °C	4	253-306	6	6	253, 269, 273, 289, 293, 306
ADL 0039	59 °C	5	153-161	4	4	153, 156, 159, 161
LEI 0092	59 °C	3	234-248	5	5	234, 236, 238, 248, 250
ADL 0021	56 °C	4	151-192	6	6	151, 154, 166, 167, 180, 192
MCW 0078	51 °C	2	132-145	6	6	132, 137, 139, 143, 145
<b>celkem</b>				<b>85</b>	<b>85</b>	

**Tabulka mikrosatelitových markerů pro analýzy prováděné pro databázi AvianDiv v letech 1998-2000**

Marker	Alely			
	Rozmezí (bp)	Počet	Informativních	Přesné velikosti
ADL 0268	106-116	6	6	106,108,110,112,114,116
MCW 0206	227-239	4	4	227, 233, 235, 239
MCW 0295	94-96	2	2	94, 96
MCW 0081	114-135	7	7	114, 116, 125, 127, 129, 133, 135
MCW 0014	173-187	4	4	173, 183, 185, 187
MCW 0183	296-306	3	3	296, 302, 306
MCW 0330	272-290	3	3	272, 279, 290
MCW 0069	156-170	6	6	156, 158, 162, 164, 168, 170
MCW 0034	222-236	8	8	222, 224, 226, 228, 230, 232, 234, 236
LEI 0234	218-219, 279-307	10	10	218, 219, 279, 280, 284, 288, 291, 303, 306, 307
LEI 0192	256-290	6	6	256, 258, 264, 266, 270, 290
ADL 0021	151-192	6	6	151, 154, 166, 167, 180, 192
MCW 0078	137-150	5	5	137, 139, 143, 145, 150
<b>celkem</b>		<b>70</b>	<b>70</b>	

**Tabulka porovnání mikrosatelitových markerů z AvianDiv databáze z roku 2000 a aktuálně analyzovaných markerů (analýzy z roku 2023)**

Marker	2000		2023		Změna (vzhledem k současnosti)
	rozsah	Počet alel	rozsah	Počet alel	
ADL 0268	106-116	6	107-114	4	Nižší
MCW 0206	227-239	4	221-229	4	Stejně
MCW 0295	94-96	2	84-98	5	Vyšší
MCW 0081	114-135	7	110-132	6	Nižší
MCW 0014	173-187	4	143-178	5	Vyšší
MCW 0183	296-306	3	293-317	5	Vyšší
MCW 0330	272-290	3	265-285	4	Vyšší
MCW 0069	156-170	6	155-166	4	Nižší
MCW 0034	222-236	8	220-247	8	Stejně
LEI 0234	218-219, 279-307	10	215-217, 274-298	8	Nižší
LEI 0192	256-290	6	253-306	6	Stejně
ADL 0021	151-192	6	151-192	6	Stejně
MCW 0078	137-150	5	132-145	6	Vyšší
<b>celkem</b>		<b>70</b>		<b>71</b>	

### Výsledky - markery

Porovnání současné analýzy a analýzy z let 1998-2000 je velmi složité, jelikož došlo k výraznému posunu ve vývoji přístrojového vybavení. Není tedy možné porovnávat jednotlivé velikosti alel. Je ale možné porovnávat počet alel a rozsah velikostí alel u jednotlivých markerů.

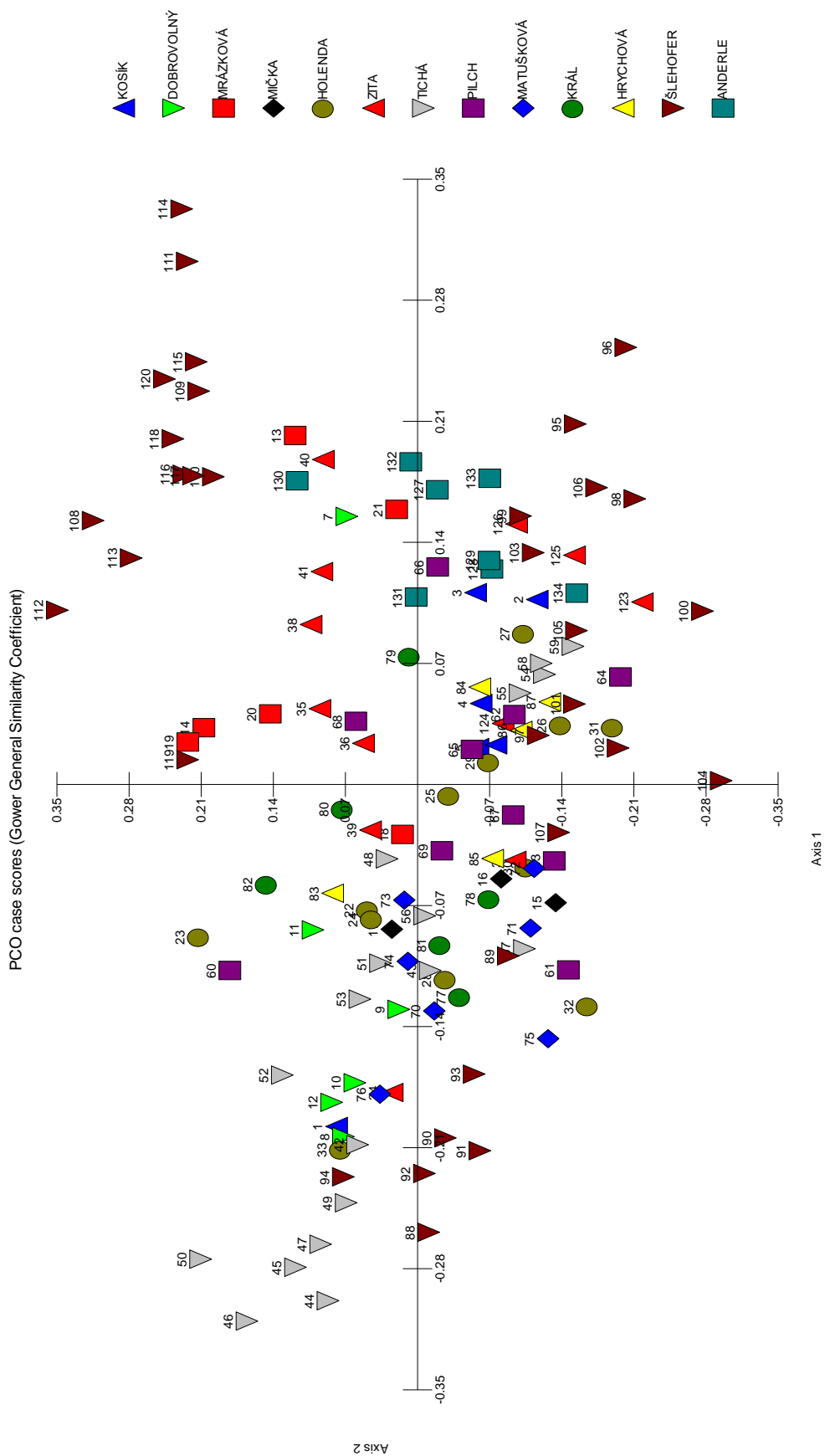
Z celkového počtu 16 mikrosatelitových lokusů bylo možné porovnat 13, protože 3 lokusy nebyly v původní analýze zahrnuty. Shodují se ovšem s použitými markery, které byly součástí analýzy prováděné na VÚŽV v roce 2013. Bohužel tato data nejsou dostupná, proto není porovnání možné.

Při porovnání bylo zjištěno, že u 4 markerů je počet alel stejný v obou analýzách, u 4 markerů došlo ke ztrátě alel a u 5 markerů se počet alel naopak zvýšil. Nicméně v součtu je tento počet rozdílný pouze o jednu alelu. Vyšší počet alel může znamenat „přilítí“ jiné krve, ale jelikož se jedná pouze o jednu alelu, je tato hypotéza neprůkazná. V obou analýzách byl u analyzovaných markerů zjištěn 100% polymorfismus a všechny vzorky jsou jednoznačně rozlišitelné. Každý vzorek má tedy unikátní sadu mikrosatelitových alel.

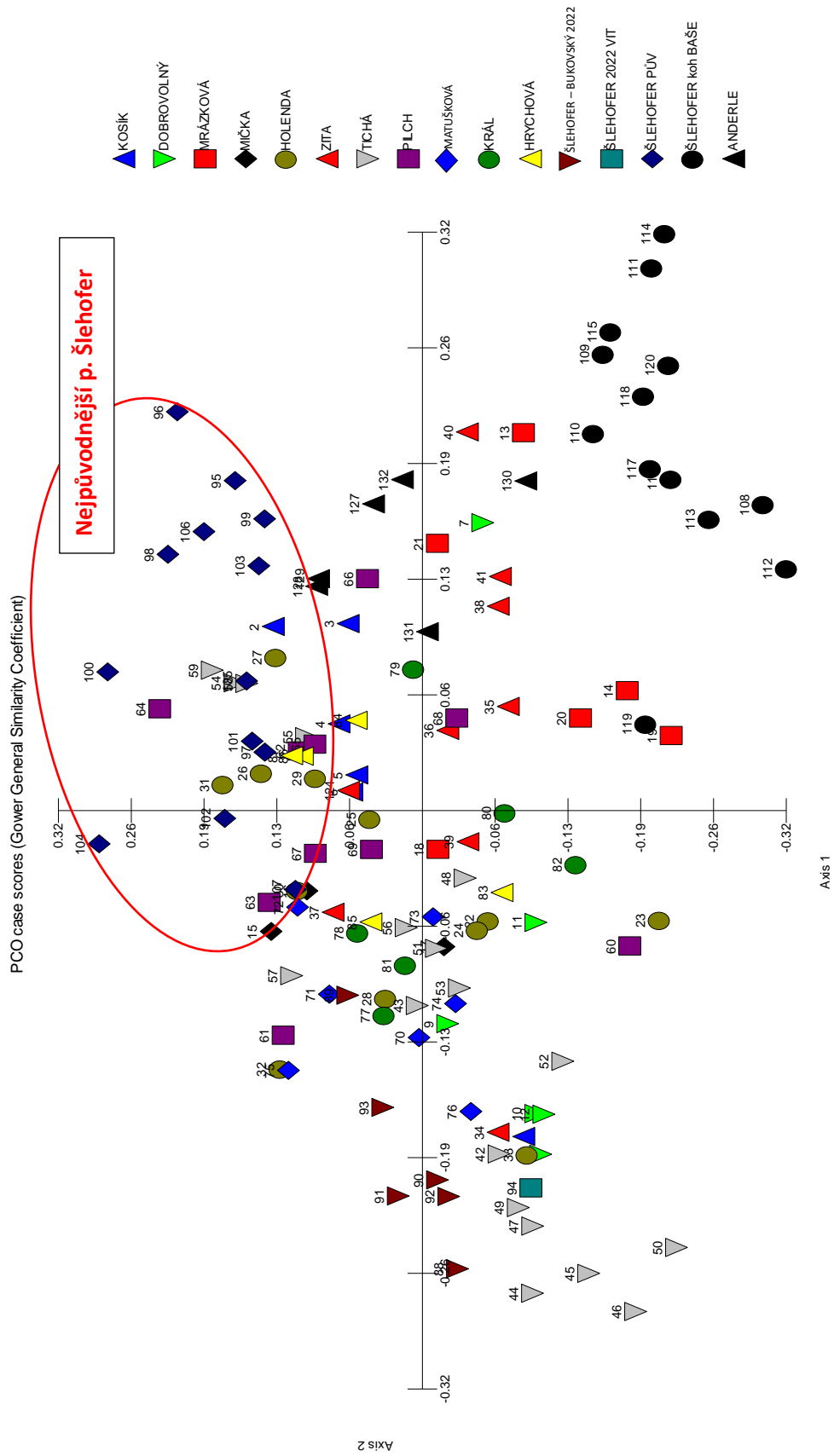
### PCO analýza

Vizualizace výsledků z PCR analýzy byla prováděna pomocí fragmentační analýzy na genetickém analyzátoru ABI3500 s použitím fluorescenčně značených forward primerů. Aby byly náklady na hodnocení pomocí fragmentační analýzy co nejnižší, všech 16 markerů bylo rozděleno do 5 mixů tak, aby se jednotlivé alely v rámci daného mixu nepřekrývaly. Primární molekulární data byla analyzována pomocí softwaru GeneMapper a výsledky fragmentační analýzy byly převedeny pro následné výpočty do tabulkového editoru jak ve formě velikosti alel, tak i ve formě binární matice, kde 1 je přítomnost alely a 0 je nepřítomnost alely. Binární matice byla importována do programu MVSP, který slouží pro výpočet matice genetické podobnosti a provedení shlukové a ordinační analýzy. Výsledky z PCO analýzy jsou zobrazeny na následujících obrázcích.

Obr. 1: PCO analýza 16 mikrosatelitových lokusů pro 13 chovů kroupenky.



Obr. 2: PCO analýza 16 mikrosatelitových lokusů pro chovy kroupenky s odlišením jednotlivých kmenů v chovech pana Šlehofera.



Analyzované vzorky byly v PCO analýze rozděleny podle jednotlivých chovatelů a barevně odlišeny. Je patrné, že všechny vzorky jsou rozdělené, nepřekrývají se, a u většiny chovatelů se analyzovaní jedinci shlukují v grafu u sebe. Velmi zajímavé jsou vzorky dodané od chovatele p. Šlehofera, který poskytl i doplňující informace, na základě kterých bylo možné vzorky ještě více specifikovat (Obr2). V červeném oválu jsou vyznačeny vzorky, které byly chovatelem označeny jako nejpůvodnější. Tzn., že další vzorky, které se vyskytují v podobné pozici/kvadrantu, mají alely, které by měly být charakteristické pro Českou kroupku. Tyto výsledky jsou zatím orientační a budou ještě upřesněny dalšími výpočty.

**Přílohou této zprávy** je matice podobnosti, díky které je možné hodnotit míru genetické podobnosti/vzdálenosti mezi jednotlivými vzorky. Hodnoty v těchto typech matic se pohybují v rozmezí od 0 do 1, kde 0 znamená – není žádná shoda a 1 znamená – 100% shoda mezi jedinci. Čím je hodnota vyšší, tím větší genetická podobnost (podobnost ve spektru mikrosatelitových markerů) mezi jedinci je. Pro přehlednost jsou hodnoty označeny třibarevnou škálou, kde červená znamená nejmenší shodu a čím sytější zelená, tím větší shoda je u jedinců. V tomto konkrétním výpočtu je minimální hodnota 0,541 (54,1% shoda) a nejvyšší 0,988 (98,8% shoda).

#### **Analýza genetické struktury populace kroupky**

Primární molekulární data byla analyzována pomocí softwaru GeneMapper a byla zaznamenána velikost SSR alel, stejně jako v případě hodnocení genetické podobnosti. Pro vyhodnocení genetické struktury analyzovaného souboru kroupky byl využit Bayesovský přístup a software STRUCTURE (Evanno et al. 2005; Pritchard et al. 2000).

Celkem bylo hodnoceno 16 mikrosatelitových lokusů u 130 individuálních vzorků kroupky. Software STRUCTURE byl použit pro odhad počtu shluků pomocí bayesovských algoritmů, které lépe popisují genetickou strukturu a vysvětlují výsledky molekulárních analýz. Výsledky a výstupy softwaru STRUCTURE (hodnoty Q1/Q2/Q3) jsou uvedeny na obrázcích 3A-C. Prostřednictvím softwaru STRUCTURE jsme provedli simulační analýzy pro  $K = 1-7$ , během těchto analýz byl nastaven parametr burnin period = 100 tis, MCMC = 150 tis a byl používán „admixture“ model. Parametr lambda byl nastaven na hodnotu 1 a odvozená hodnota byla použita v sekvenčních analýzách (kvantifikace nezávislosti mezi markery z hlediska distribuce alelické frekvence). Ostatní hyperparametry byly ponechány na své výchozí hodnotě.

Na základě hodnoty DeltaK byl parametr K stanoven na  $K=3$  a analyzovaný soubor genotypů byl podle hodnot Q rozdělen podle hodnot Q1/Q2/Q3 do tří klastrů. Průměrné distance (očekávaná heterozygotnost) mezi individuálními vzorky v rámci klastrů byla pro klastr 1=0,4332, pro klastr 2=0,4915 a pro klastr 3=0,5872. Stabilní hodnoty byly rovněž dosaženy pro Dirichletův parametr  $\ln(\alpha)$  (kvantifikace relativních úrovní příměsí mezi populacemi). Hodnota parametru  $\ln(\alpha)$  byla odhadnuta na 0,1987. Průměrné hodnoty Fst byly následující: Fst\_1 = 0,2631, Fst\_2 = 0,2905 a Fst\_3 = 0,0133.

### **Interpretace výsledků analýzy genetické struktury:**

- Průměrné distance odpovídající hodnotám očekávané heterozygotnosti dosahovaly 0,4332 – 0,5872. Vzhledem k tomu, že hodnota očekávané heterozygotnosti je rovněž označovaná jako genová diverzita a je zcela základním ukazatelem míry genetické diverzity v populaci - popisuje očekávané proporce heterozygotních genotypů v případě Hardy-Weinbergovy rovnováhy (Nei 1973) – lze konstatovat, že genová diverzita je ve sledované populaci nízká.
- *Alfa* ( $\alpha$ ) je Dirichletův parametr, který odráží relativní úroveň „příměsí“ mezi populacemi (Hubisz a kol. 2009). Když  $\alpha$  výrazně vyšší než 1, pak alely každého jedince se vyskytují ve všech populacích (K – klastrech) v přibližně stejných poměrech a ukazuje to na neexistenci bariér mezi populacemi a není zabráněno genovému toku mezi populacemi. Pokud jsou ale hodnoty  $\alpha$  nižší než 1, pak se populace liší, jedinci resp. jejich alely jsou typické pro jednotlivé populace a ukazuje to na bariéry mezi populacemi a omezený genový tok. V případě, kdy se hodnota  $\alpha$  blíží 0, pak se jedná o silně izolované populace, s výraznými bariérami mezi populacemi a prakticky neexistujícím genovým tokem (Falush a kol. 2003; Evanno a kol. 2005). Průměrná hodnota Dirichletova parametru alfa byla odhadnuta na 0,1987, což ukazuje na značné bariéry mezi populacemi (klastry) a reprodukční izolaci v důsledku omezené výměny genetických zdrojů mezi jednotlivými chovateli (Bird a kol. 2011).
- Hodnota *Fst* je ukazatelem míry genetické variability, kterou lze vysvětlit strukturou populace na základě Wrightovy F-statistiky (Wright 1965). Parametr *Fst* udává podíl celkové genetické variability obsažené v subpopulaci v poměru k celkové genetické variabilitě. Vysoká úroveň hodnoty *Fst* ukazuje na značný stupeň diferenciace mezi populacemi. Zjištěné průměrné hodnoty *Fst* byly relativně nízké a pro jednotlivé klastry následující: *Fst*\_1= 0,2631, *Fst*\_2=0,2905 a *Fst*\_3=0,0133. Tyto hodnoty pak ukazují na signifikantní genetickou diferenciaci v klastrech 1 a 2. V klastru 3 byla ale hodnota *Fst* nižší než 0,15 (Frankham a kol. 2002) a ukazuje tak velmi nízkou genetickou diferenciaci v klastru 3 mezi jednotlivými genetickými zdroji.

Výsledky analýzy genetické struktury souboru genových zdrojů kropenky jsou uvedeny na obrázku 3A-C. Z pohledu analýzy výsledků je nejdůležitější obr 3C – rozdělení analyzovaných vzorků do třech klastrů na základě hodnot Q1/Q2/Q3. Tyto tři klastry se významně shodují se seskupením vzorků po PCO analýze (Obr. 4A) a celý soubor lze pak rozdělit do 4 bloků.

#### **Blok genových zdrojů I.**

V rámci PCO analýzy vzorky seskupené v pravém horním kvadrantu. Dle genetické struktury dominantní hodnota Q1 a minoritní hodnoty Q2+Q3. Na Obr. 4B jsou vzorky z tohoto kvadrantu vyznačeny červeně. Okrovou barvou jsou pak vyznačeny vzorky, které sice náležejí do tohoto bloku/kvadrantu, ale vytváří přechodovou zónu k bloku IV. Vzorky této přechodové zóny se z pohledu genetické struktury vyznačují nižší až minoritní hodnotou Q1.

Blok I. představuje nejcenější genetické zdroje kropenky. Lze doporučit dále pracovat s touto skupinou jedinců v rámci úzké příbuzenské plemenitby. Ke zvážení jsou pak vzorky z přechodové zóny mezi bloky I a IV, a mezi bloky I a II.

#### Blok genových zdrojů II.

V rámci PCO analýzy vzorky seskupené v levém horním kvadrantu a zasahující přes levý spodní kvadrant do pravého spodního kvadrantu. Dle genetické struktury nízká až minoritní hodnota Q1 a významný podíl hodnoty Q2. Na Obr. 4B jsou vzorky z tohoto kvadrantu vyznačeny modře.

Blok II. představuje genetické zdroje kroupky vyžadující pozornost a důsledný management a kontrolu GZ. Po dalším cyklu analýz (v dalších generacích) je možné posouzení diferenciaci tohoto bloku směrem k bloku I (cenným genotypům) či bloku III (nežádoucím genotypům).

#### Blok genových zdrojů III.

V rámci PCO analýzy vzorky seskupené v levém spodním kvadrantu. Dle genetické struktury dominantní hodnota Q2. Na Obr. 4B jsou vzorky z tohoto kvadrantu vyznačeny zeleně. Tento blok je na okraji genetické variability GZ kroupky, představuje významný odklon od požadovaného charakteru genotypu.

Blok III. představuje genetické zdroje kroupky, které by měly být vyloučeny z genových rezerv.

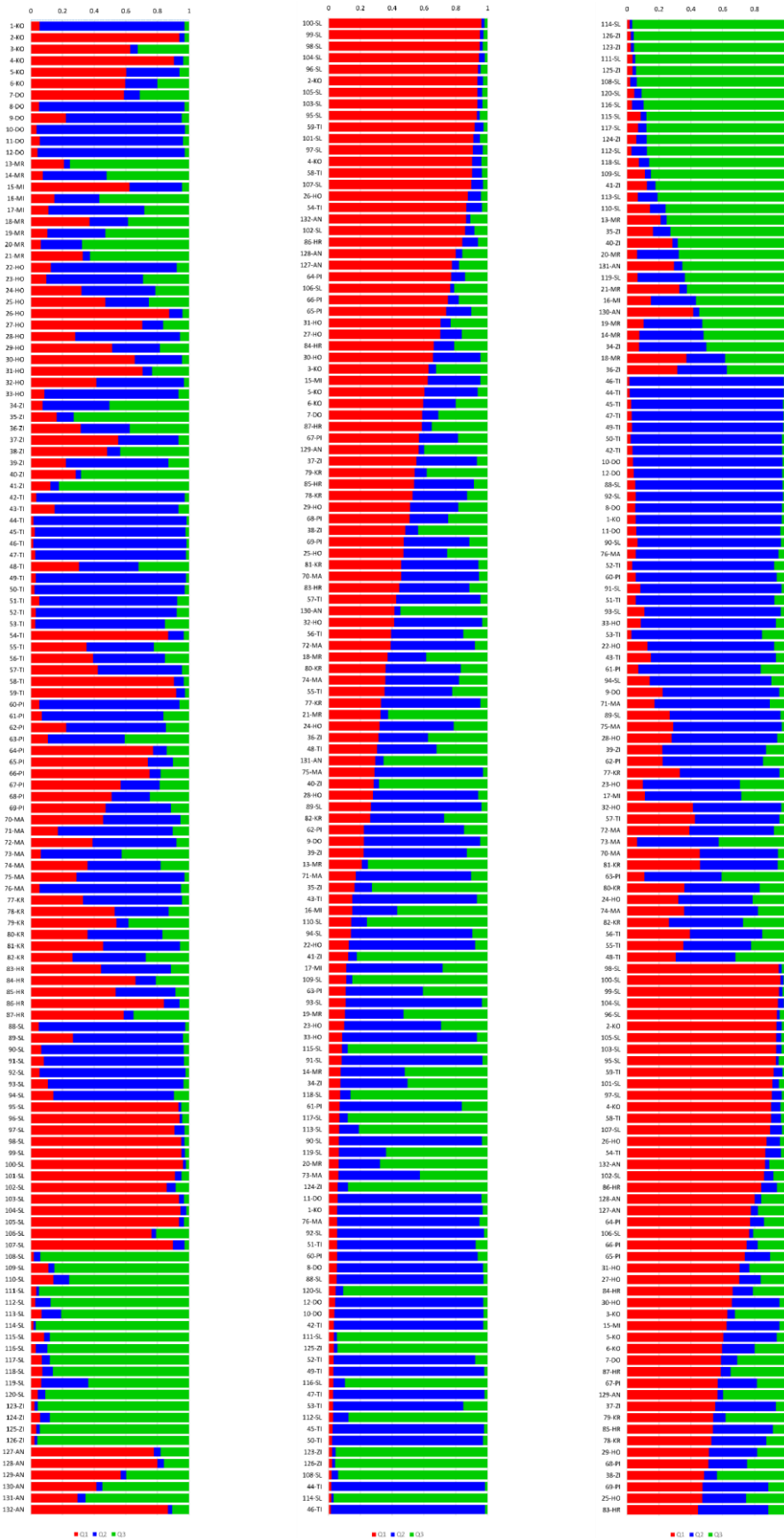
#### Blok genových zdrojů IV.

V rámci PCO analýzy vzorky seskupené na okraji pravého spodního kvadrantu. Dle genetické struktury dominantní hodnota Q3, tj. zcela nežádoucí genotypová struktura. Na Obr. 4B jsou vzorky z tohoto kvadrantu vyznačeny žlutě. Tento blok je na okraji genetické variability GZ kroupky, představuje významný odklon od požadovaného charakteru genotypu.

Blok IV. představuje genetické zdroje kroupky, které by měly být vyloučeny z genových rezerv.

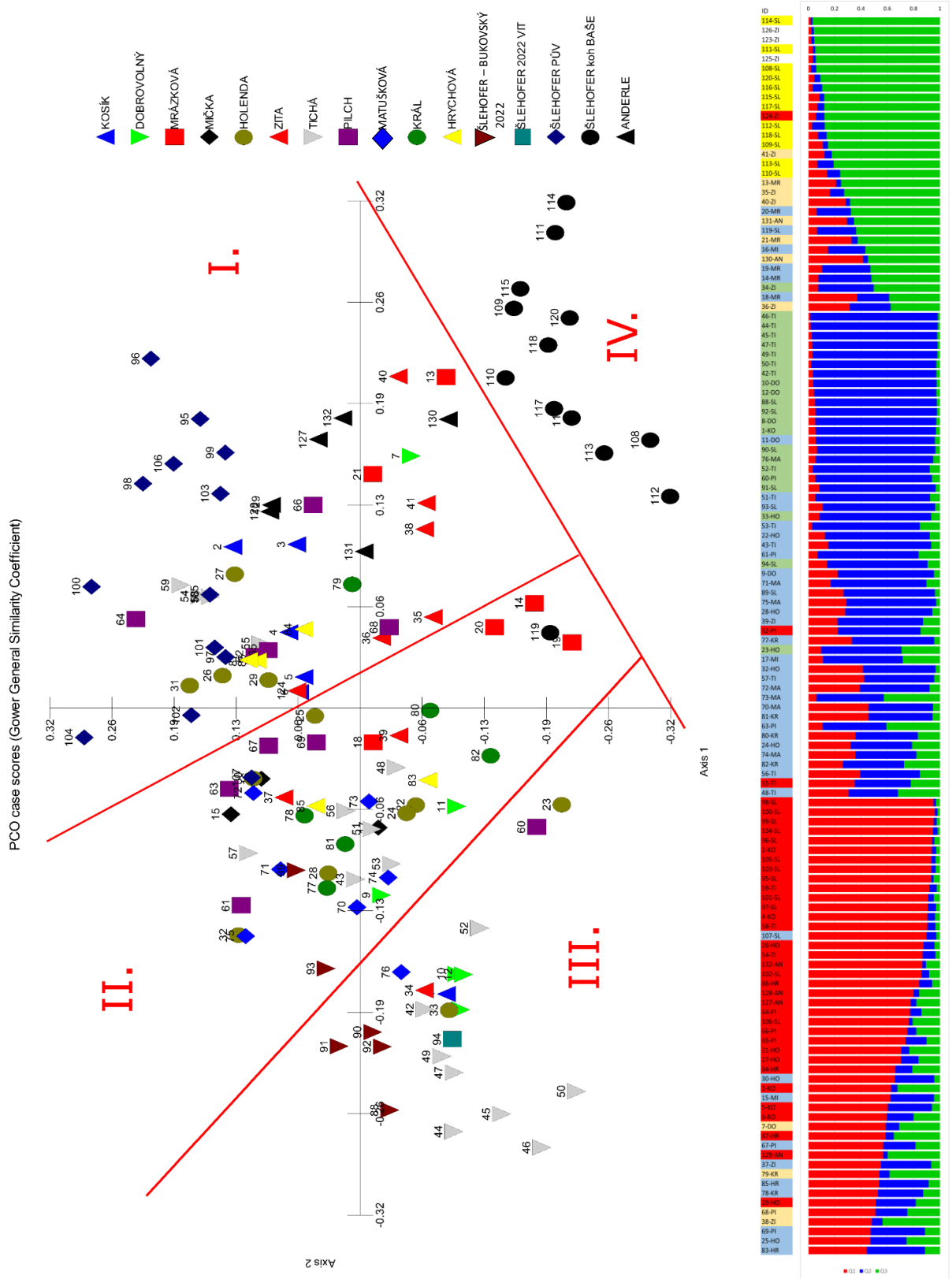


Obr. 3: Analýza genetické struktury, A: řazení vzorků podle přírůstkových čísel, B: řazení podle hodnoty Q1 a C: řazení do klastrů na základě algoritmu v programu STRUCTURE.



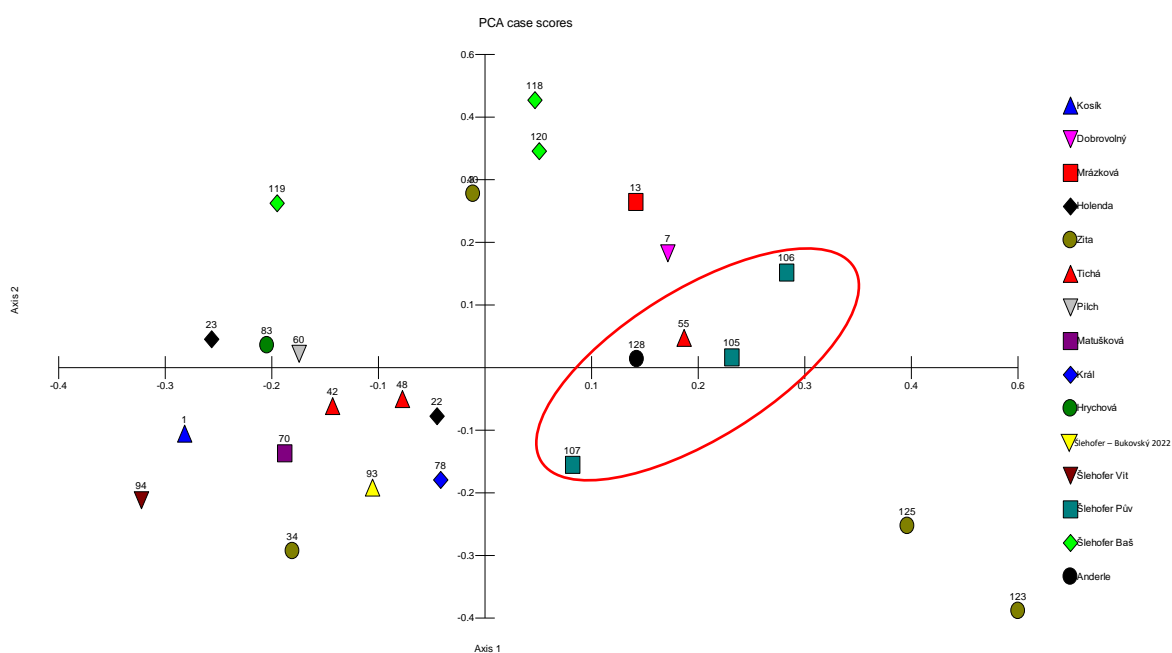
Obr. 4: Porovnání výstupů PCO analýzy (A) a analýzy genetické struktury (B).

Blok I – červeně; Blok II – modře; Blok III – zeleně; Blok IV – žlutě, přechodová zóna I/IV – okrově.



Byla provedena i samostatná analýza kohoutů a vyhodnocena jejich genetická podobnost. Výsledky PCO analýzy jsou uvedeny na obr. 5. Nejcennější jádro GZ je označeno červeným oválem. Tito jedinci odpovídají bloku genetických zdrojů I. Do přechodové zóny pak náleží ještě jedinci 7 a 13.

**Obr. 5: PCO analýza 16 mikrosatelitových lokusů u kohoutů GZ kroupky.**



Další analýzy budou zaměřeny na analýzu plemen, jejichž genotypem mohou být GZ kroupky kontaminovány a bude ověřeno, zda dochází k překryvu genetické variability kroupky a těchto plemen.