



Fakulta zemědělská  
a technologická  
Faculty of Agriculture  
and Technology

Jihočeská univerzita  
v Českých Budějovicích  
University of South Bohemia  
in České Budějovice

# JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH FAKULTA ZEMĚDĚLSKÁ A TECHNOLOGICKÁ

Katedra genetiky a biotechnologií

Autoreferát disertační práce

## **Aplikace metod molekulární biologie k detekci hospodářsky významných genů a patogenů u drůbeže**

Autorka práce: Ing. Kristina Beranová

Vedoucí práce: prof. Ing. Vladislav Čurn, Ph.D.

Konzultant práce: doc. Ing. Michael Rost, Ph.D.

České Budějovice  
2026

---

**Doktorand:** Kristina Beranová  
**Studijní program:** Zemědělská chemie a biotechnologie

**Název práce:** Aplikace metod molekulární biologie k detekci hospodářsky významných genů a patogenů u drůbeže

**Oponenti:** prof. Ing. Martina Lichovníková, Ph.D., MBA  
prof. Ing. Luboš Vostrý, Ph.D.  
prof. Ing. Jindřich Čítek, CSc.

---

## Abstrakt

Tato disertační práce představuje komplexní integraci molekulárně-biologických metod do tří klíčových oblastí moderního drůbežnictví: monitoringu genetických rezerv, precizního šlechtění a biosekurity ve šlechtitelských chovech. V první části byla pomocí 16 mikrosatelitových markerů analyzována populační struktura zemské populace české slepice zlaté kropenaté (ČSZK). Výsledky potvrdily stabilitu genové diverzity ( $H_e = 0,52$ ) ve srovnání s historickými daty, avšak zjištěná vysoká hodnota koeficientu inbreedingu ( $F_{is}=0,152$ ) s největší pravděpodobností odráží probíhající inbreeding nebo skrytou populační strukturu. Tuto hypotézu podporuje analýza v programu STRUCTURE, která stanovila jako nejpravděpodobnější počet klastrů  $K=2$ . Rozpad populace do dvou genetických klastrů (při zachování diverzity  $H_{e1}=0,51$ ;  $H_{e2}=0,48$ ) indikuje silnou reprodukční izolaci uvnitř zkoumané skupiny a riziko budoucího nárůstu inbreedingu, což je v souladu s nedávnými výsledky analýzy na základě genealogických dat. Druhá část práce se zaměřila na optimalizaci selekce podporované markery (MAS) v rámci šlechtitelského programu firmy Dominant Genetika s.r.o.. Experimentálně byla prokázána 100 % účinnost molekulární selekce při eliminaci nežádoucích recesivních alel (v rámci genů *TYR* a *HOXC10*) již v první filiální generaci. Pro hodnocení modrozeleného zbarvení skořápky (gen *SLCO1B3*) byl navržen dvoustupňový diagnostický přístup. Fotometrické měření parametru  $a^*$  se ukázalo jako efektivní pro primární screening k eliminaci nosnic s bílou skořápkou, avšak pro přesnou diferenciaci dominantních homozygotů od heterozygotů je nezbytné metodu doplnit o PCR diagnostiku. Třetí pilíř práce tvoří vývoj a validace metody izotermální amplifikace (LAMP) pro rychlou detekci patogenu *Mycoplasma synoviae*. Navržený test vykazuje citlivost ( $10 \text{ fg}/\mu\text{l}$ ) a díky inovativnímu *in silico* návrhu primerů pomocí softwaru KEC dokázal spolehlivě rozlišit všechny námi testované příbuzné druhy aviárních mykoplazem, včetně *M. gallisepticum*, která u běžně využívaných detekčních metod v ČR (ELISA) vykazuje s tímto patogenem křížovou reaktivitu. Dosažené výsledky potvrzují, že aplikace těchto molekulárních nástrojů zásadně zvyšuje efektivitu šlechtění a poskytuje robustní platformu pro zajištění zdravotní bezpečnosti a udržitelnosti chovů drůbeže.

**Klíčová slova:** genetická diverzita, mikrosatelity, lokální plemena slepic, MAS, LAMP, *Mycoplasma synoviae*

---

## Abstract

This doctoral thesis presents a comprehensive integration of molecular-biological methods into three key areas of modern poultry farming: the monitoring of genetic reserves, precision breeding, and biosecurity in breeding flocks. In the first part, the population structure of the local population of the Czech Golden Pencilled fowl (ČSZK) was analysed using 16 microsatellite markers. The results confirmed the stability of gene diversity ( $H_e = 0,52$ ) compared to historical data; however, the observed high value of the inbreeding coefficient ( $F_{is} = 0.152$ ) most likely reflects ongoing inbreeding or a hidden population structure. This hypothesis is supported by the analysis in the STRUCTURE software, which determined  $K = 2$  as the most probable number of clusters. The division of the population into two genetic clusters (while maintaining diversity  $H_{e1} = 0,51$ ;  $H_{e2} = 0,48$ ) indicates strong reproductive isolation within the studied group and a risk of a future increase in inbreeding, which is consistent with the recent results of pedigree-based analysis. The second part of the thesis focused on the optimisation of marker-assisted selection (MAS) within the breeding programme of Dominant Genetika s.r.o. The 100 % efficacy of molecular selection in eliminating undesirable recessive alleles (within the *TYR* and *HOXC10* genes) was experimentally demonstrated as early as the first filial generation. To evaluate the blue-green eggshell coloration (the *SLCO1B3* gene), we proposed a two-step diagnostic approach. Photometric measurement of the  $a^*$  parameter proved effective for primary screening to eliminate hens laying white-shelled eggs; however, to accurately differentiate dominant homozygotes from heterozygotes, it is necessary to complement this method with PCR diagnostics. The third pillar of the work consists of the development and validation of a loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method for the rapid detection of the *Mycoplasma synoviae* pathogen. The designed test exhibits high sensitivity (10 fg/μl) and, thanks to the innovative *in silico* primer design using the KEC software, it reliably differentiated all tested related species of avian mycoplasmas. The obtained results confirm that the application of these molecular tools fundamentally increases breeding efficiency and provides a robust platform for ensuring health security and the sustainability of poultry farming.

**Keywords:** genetic diversity, microsatellites, local chicken breeds, MAS, LAMP, *Mycoplasma synoviae*

---

## Obsah

1	Úvod.....	6
2	Cíle a hypotézy.....	8
2.1	Genetická struktura a diverzita zemské populace ČSZK .....	8
2.2	MAS a optimalizace šlechtění v rámci programu Dominant CZ .....	8
2.3	Implementace pokročilých metod kontroly zdravotního stavu drůbeže.....	10
3	Metodika .....	11
3.1	Zkoumané populace .....	11
3.2	Odběr biologického materiálu a extrakce genomové DNA .....	11
3.3	Metody molekulárně genetické a fenotypové analýzy .....	12
3.3.1	Genotypizace ČSZK pomocí SSR markerů.....	12
3.3.2	Genotypizace a fenotypizace šlechtitelských linií Dominant CZ .....	12
3.3.3	Detekce <i>Mycoplasma synoviae</i> pomocí LAMP .....	12
3.4	Statistické zpracování dat.....	13
4	Výsledky .....	15
5	Diskuse.....	17
6	Závěr .....	18
7	Seznam publikovaných prací .....	20
8	Seznam literatury .....	21

---

# 1 Úvod

Drůbežnictví představuje celosvětově jedno z nejvýznamnějších odvětví živočišné produkce a hraje nezastupitelnou roli při zajišťování výživy neustále rostoucí lidské populace (Mottet & Tempio, 2017; FAO, 2024a). Od prostého výběru fenotypově nejlepších jedinců se toto odvětví historicky propracovalo až ke tvorbě vysoce specializovaných komerčních hybridů. Tento proces však vedl k extrémní konsolidaci trhu, kterému dnes dominují prakticky pouze dvě nadnárodní společnosti (Tixier-Boichard, 2020). Vzniklý duopol představuje riziko pro biodiverzitu, neboť masivní rozšíření úzkého spektra linií využívaných pro tvorbu finálních hybridů, vyvolává nebezpečnou redukci genofondu a vede ke ztrátě cenných lokálních genetických zdrojů (Besbes et al., 2007). O to důležitější je udržení nezávislých šlechtitelských programů, obzvláště v situaci, kdy produkce u mnoha užitkových vlastností naráží na své biologické limity (Muir et al., 2008). V České republice má chov nosného typu slepic dlouhou tradici a několik linií je oficiálně zahrnuto do Národního programu konzervace a využívání genetických zdrojů, což podtrhuje jejich význam pro národní zemědělskou biodiverzitu. Kur domácí (*Gallus gallus f. domestica*) navíc slouží jako silný modelový organismus pro genetické a evoluční studie, včetně výzkumu přirozené a umělé selekce během procesů domestikace (Burt & White, 2007). Přesto v tuzemských šlechtitelských programech dosud dominovala klasická fenotypová selekce a využívání údajů o užitkovosti potomstva. Tento postup je však z hlediska času i financí neefektivní, zejména u znaků s komplexní dědičností, u vlastností měřitelných až v dospělosti (Wolc et al., 2011), nebo u znaků limitovaných pohlavím. Tradiční selekce nedokáže včas identifikovat skryté heterozygotní nositele nežádoucích alel, což vede k nechtěné segregaci znaků u finálních kříženců a komplikuje šlechtitelské strategie (Wolc, 2015). Z těchto důvodů prochází odvětví transformací k využívání molekulárně genetických nástrojů, které umožňují selektovat jedince s vysokou přesností již v raných fázích vývoje (Meuwissen et al., 2001; Wolc et al., 2011). Zatímco v zemích jako Čína či Izrael je molekulární genotypizace standardem, v širší praxi zůstává její uplatnění někdy omezené kvůli vysokým nákladům na implementaci (Pértille et al., 2016). Moderní a udržitelné šlechtění drůbeže proto vyžaduje integraci tří vzájemně se doplňujících segmentů: precizního šlechtění pomocí selekce podporované markery (MAS); molekulárního monitoringu lokálních genetických rezerv a striktní biosekurity podpořené rychlou diagnostikou patogenů. Z této filozofie vychází i koncepce disertační práce, která

---

zahrnuje výsledky třech modelových studií zacílených na tyto segmenty. První studie byla zaměřena na problematiku rizik ztráty genetické diverzity lokálních plemen. Práce se specificky věnuje metodice využívající mikrosatelitové (SSR) markery pro monitoring genetické struktury populace české slepice zlaté kropenaté (FAO, 2011). Přestože historická data potvrdila dostatečnou míru genetické diverzity (Hillel et al., 2003), genealogické analýzy naznačují vysoké riziko inbreedingu (Vostrý et al., 2020). Výsledky analýzy genetické variability a genetické struktury sledované populace tak poskytují nezbytný podklad pro monitoring míry inbreedingu a efektivní sestavování přípařovacích plánů s cílem eliminovat negativní dopady liniové plemenitby. Druhá studie se zabývala vývojem molekulárně genetických testů pro šlechtitelský program společnosti Dominant Genetika s.r.o., se zaměřením na specializované linie, jako jsou Dominant Greenshell a Dominant Darkshell a implementací postupů založených na molekulární analýze do šlechtitelské praxe. Moderní šlechtitelské programy nejsou postaveny jen na fenotypovém výběru a klasických nástrojích populační genetiky, ale jejich integrací součástí jsou metody a postupy markery asistované selekce (MAS) zejména u znaků definujících jejich specifický fenotyp. Studie byla zaměřena na netradiční modrozelené zbarvení skořápky, zapříčiněné inzercí retrovirového elementu EAV-HP do promotorové oblasti genu *SLCO1B3* (Wang et al., 2013) a fenotyp chocholky, který je výsledkem duplikace v genu *HOXC10* (Li et al., 2021). Podobně komplexní je regulace opeření běháků (ptilopodie), kde je žádoucí fixace mutace genu *TBX5* (lokus *Pti-1*), ale současně eliminace delece genu *PITX1* (lokus *Pti-2*), způsobující extrémní rousnost (Somes, 1992; Domyan et al., 2016; Yang et al., 2025). Práce rovněž cílí na eliminaci skrytých přenašečů recesivních defektů, jako je recesivní bílé zbarvení (lokus *C*, gen *TYR*; Chang et al., 2006). Třetí studie byla zacílena na molekulární detekci patogenů a udržování zdravotního standardu, kde jednu ze zásadních hrozeb pro šlechtitelské chovy slepic představuje respirační patogen *Mycoplasma synoviae* (MS), způsobující synovitidu a abnormality skořápky (Kleven, 2008; Feberwee et al., 2009). Pro operativní polní molekulární detekci mykoplazmy byl v práci vyvinut postup založený na izotermální amplifikaci – metodě LAMP (Notomi et al., 2000), kde jinak složitý návrh primerů pro detekci mykoplazem byl překonán inovativním *in silico* postupem pomocí nástroje KEC (Beran et al., 2021). Tato komplexní integrace molekulárních metod tak poskytuje robustní platformu pro modernizaci, efektivitu a bezpečnost českého šlechtění drůbeže.

---

## 2 Cíle a hypotézy

### 2.1 Genetická struktura a diverzita zemské populace ČSZK

Hlavní cíl = Zhodnocení stavu genetické variability a populační struktury současné zemské populace ČSZK v *in situ* podmínkách. Prostřednictvím analýzy SSR markerů kvantifikovat úroveň genetické diverzity a posoudit časovou dynamiku vývoje plemene současně se srovnáním s genobankingovými vzorky z roku 2004. Práce tak usiluje o zhodnocení reálného dopadu dlouhodobého uzavřeného chovatelského managementu na zachování tohoto genového zdroje.

Dílčí cíle:

- Posouzení míry genetické unikátnosti a izolace ČSZK v širším evropském kontextu prostřednictvím srovnávací analýzy s referenčními a lokálními plemeny.
- Identifikace rizik stávajícího systému selekce, který je založen primárně na rodokmenovém sledování a fenotypovém standardu.

Vědecká hypotéza:

Molekulární data získaná genotypizací SSR lokusů odhalí v současné zemské populaci ČSZK vyšší reálnou míru inbreedingu a genetické fragmentace, než jakou predikují dříve publikované genealogické modely. Molekulární přístup prokáže skrytou strukturu populace, kterou nelze z dostupných rodokmenových dat spolehlivě detekovat.

### 2.2 MAS a optimalizace šlechtění v rámci programu Dominant CZ

Hlavní cíl = Hlavním cílem práce je vývoj a validace molekulárně biologických postupů pro optimalizaci selekce klíčových užitkových a exteriérových znaků u šlechtitelských linií společnosti Dominant Genetika s.r.o. Stěžejní je integrace metod MAS do šlechtitelské praxe u znaků s komplexní dědičností, u nichž běžná fenotypová selekce vykazuje nízkou efektivitu.

Dílčí cíle a vědecké hypotézy:

#### 1. Lokus *O* (Zbarvení vaječné skořápky)

- Dílčí cíl: Navrhnout komplexní selekční postup, který propojuje objektivní fotometrické měření barvy vaječné skořápky se zavedením molekulární analýzy inzerce (EAV-HP) v regulační oblasti genu *SLCO1B3* za účelem stabilizace modrozeleňého zbarvení u linie Dominant Greenshell.

---

Hypotéza: Integrace objektivní fotometrie a cílené molekulární detekce umožní spolehlivě odlišit jednotlivé genotypy v lokusu *O*. Samotné fotometrické měření nedokáže spolehlivě identifikovat skryté heterozygoty, avšak v kombinaci s genotypizací signifikantně zefektivní a urychlí stabilizaci požadovaného fenotypu.

## 2. Lokus *Cr* (Fenotyp chocholky)

○ Dílčí cíl: Aplikovat metody molekulární diagnostiky pro spolehlivou identifikaci skrytých heterozygotních přenašečů recesivní alely *cr* u linie Dominant Greenshell, a tím zefektivnit proces stabilizace a uniformity tohoto znaku.

Hypotéza: Zavedení cílené molekulární diagnostiky odhalí v populaci přítomnost skrytých přenašečů alely *cr*, jejichž včasná detekce a následná eliminace z reprodukce povede k rychlejší a trvalé fixaci uniformity chocholky ve srovnání s tradiční selekcí založenou výhradně na exteriéru.

## 3. Lokus *C* (Recesivní bílé zbarvení peří)

○ Dílčí cíl: Implementovat přesnou detekční metodu pro identifikaci skrytých nositelů recesivní alely *c*, s cílem zajistit genetickou čistotu linie Dominant Greenshell s ohledem na tento znak.

Hypotéza: Maskovanou recesivní alelu *c* nelze v populaci spolehlivě eliminovat standardními chovatelskými postupy, a proto pouze implementace specifické molekulární detekce umožní úplné očištění linie od těchto skrytých nositelů a zajištění její absolutní genetické čistoty.

## 4. Lokusy *Pti-1* a *Pti-2* (ptilopodie)

○ Dílčí cíl: Provést genotypizaci lokusů *Pti-1* a *Pti-2* u linie Dominant Darkshell, posoudit prediktivní význam asociovaných SNP markerů a výsledky využít k modelování postupu při fixaci optimální úrovně tohoto znaku.

Hypotéza: Markery asociované s lokusy *Pti-1* a *Pti-2* představují stěžejní determinanty ptilopodie u zkoumané linie. Jejich genotypizace umožní definovat podíl těchto lokusů na pozorované fenotypové variabilitě a objektivně zhodnotit reálný potenciál i limity MAS zacílené na tyto hlavní geny a asociované SNP při snaze o stabilizaci tohoto komplexního znaku.

---

### 2.3 Implementace pokročilých metod kontroly zdravotního stavu drůbeže

Hlavní cíl: Hlavním cílem této části je vývoj a zavedení rychlé detekce patogenu MS na bázi izotermální amplifikace (LAMP) přímo z terénních biologických vzorků. Zavedení tohoto specifického a časově nenáročného molekulárního nástroje je stěžejní pro zajištění biologické bezpečnosti ve šlechtitelských chovech drůbeže, a to zejména v rámci prevence zavlečení patogenů během importu nového genetického materiálu z externích zdrojů.

- Dílčí cíl: Navrhnout, optimalizovat a validovat metodu LAMP pro cílenou detekci MS, což zahrnuje stanovení její senzitivity a specifčnosti v přímém porovnání se standardními diagnostickými postupy (např. PCR) a následné ověření funkčnosti na reálných biologických vzorcích za účelem potvrzení její aplikovatelnosti pro rychlou polní detekci a rutinní screening zvířat.

Vědecká hypotéza: Předpokládáme, že nově navržená izotermální metoda (LAMP) dosáhne vysoké senzitivity a specifčnosti srovnatelné se standardními PCR postupy, a současně umožní spolehlivou a rychlou detekci patogenu přímo z terénních biologických vzorků, čímž prokazatelně zefektivní screening importovaného materiálu v karanténní fázi.

---

## 3 Metodika

### 3.1 Zkoumané populace

#### Zemská populace české slepice zlaté kropenaté (ČSZK)

Vzorky byly získány v součinnosti s 24 chovateli z Národního programu a z genové banky VÚŽV (kryokonzervované vzorky z roku 2004). Pro stanovení genetické unikátnosti byl sestaven panel referenčních populací zahrnující vlašku koroptví, polskou zelenonožku a ruskou populaci ČSZK.

#### Šlechtitelský program Dominant CZ

Vzorky byly derivovány z nukleových chovů společnosti Dominant Genetika s.r.o. v rámci programu *Artisan Eggs*. Pilotní analýzy se zaměřily na linii Dominant Greenshell (genotypizace lokusu *O*, genu *HOXC10* a lokusu *C*) a linii Dominant Darkshell (ptilopodie – geny *TBX5* a *PITX1*).

#### Biologická bezpečnost

Byl zaveden monitoring v karanténním režimu s cílem prevence zavlečení respiračního patogenu (MS) do šlechtitelských chovů.

### 3.2 Odběr biologického materiálu a extrakce genomové DNA

Invazivní odběr (plná krev, tracheální výtěry) probíhal v souladu s legislativou ČR upravující welfare zvířat. Krev byla odebírána do zkumavek VACUETTE® s K3EDTA (Greiner Bio-One International GmbH, Německo) a tracheální výtěry pomocí tamponů FLOQSwabs (Copan, Itálie). Neinvazivní alternativou bylo prachové peří. Referenční bakteriální kmeny (MolliScience, Maďarsko) byly dodány na FTA kartách.

Pro izolaci genomové DNA byly využity specifické postupy dle matrice:

- Plná krev: NucleoSpin Blood (Macherey-Nagel, Německo).
- Peří: Modifikovaná metoda CTAB-PVP (Doyle, 1991).
- Tracheální výtěry: Paralelně testovány DEP-25 DNA Extraction Kit (Top-Bio, ČR) a Presto™ Buccal Swab Kit (Geneaid, Tchaj-wan).
- Čisté kultury a FTA karty: Automatizovaný systém MagCore® HF16 (RBC Bioscience, Tchaj-wan), respektive purifikace přes silikové kolony (Qiagen, Německo).

---

### 3.3 Metody molekulárně genetické a fenotypové analýzy

#### 3.3.1 Genotypizace ČSZK pomocí SSR markerů

Byl využit panel 16 mikrosatelitových markerů dle doporučení FAO a ISAG (2011) a databáze AVIANDIV (Hillel et al., 2003). Fragmentační analýza proběhla na ABI3500 Genetic Analyser (Applied Biosystems, Waltham, MA, USA) a vyhodnocena softwarem GeneMapper version 3.0. (Applied Biosystems, Waltham, MA, USA).

#### 3.3.2 Genotypizace a fenotypizace šlechtitelských linií Dominant CZ

- **Lokus *O* (*SLCO1B3*):** K objektivnímu stanovení zbarvení skořápky u souboru 119 nosnic (celkem 357 vajec – 3 vejce od každé slepice) sloužil reflektometr QCR (TSS, York, UK) a spektrofotometr CM-700d (Konica Minolta, Osaka, Japonsko) v prostoru CIE  $L^*a^*b^*$ . Detekce inzerce EAV-HP proběhla pomocí end point PCR protokolů dle Wang et al. (2013) a Wragg et al. (2013).
- **Lokus *C* (*TYR*):** Identifikace mutované alely proběhla metodou end point PCR dle Cho et al. (2021).
- **Lokus *Cr* (*HOXC10*):** Detekce 197bp tandemové duplikace byla provedena dle Li et al. (2021) pomocí end point PCR.
- **Lokusy *Pti-1* a *Pti-2*:** Návrh primerů proběhl v nástroji OligoPerfect Primer Designer (Thermo Fisher Scientific). Amplifikace a detekce delecí pomocí end point PCR proběhla dle Li et al., 2020. kauzální mutace zasahující gen *TBX5* a SNP asociované s ptilopodií (SNP1 a SNP2) byly sekvenovány formou služby (SEQme s.r.o., Dobříš u Prahy). Vyhodnocení zajistil program Geneious Prime verze 2022.1.1.

#### 3.3.3 Detekce *Mycoplasma synoviae* pomocí LAMP

Vyhledání sekvenčně unikátního úseku pro následný návrh primerů proběhl *in silico* v softwaru KEC (Beran et al., 2021). Samotné primery (BIP, FIP, B3, F3, LB) byly navrženy pomocí Primer Explorer (V5). Optimalizovaná reakce LAMP obsahovala Isothermal Master Mix (ISO-001) (OptiGene, Sussex, Velká Británie) a byla analyzována na přístroji QuantStudio™ 6 Flex Real-Time PCR Systém. Výsledky byly vyhodnoceny v softwaru QuantStudio™ Real-Time PCR Software v1.3 (Applied Biosystems, Waltham, MA, USA). Validace a stanovení specificity proběhly vůči refe-

---

renční metodě (komerční CE-IVD kit) real-time PCR Kylt® *Mycoplasma* spp. (AnI-con Labor GmbH, Německo) na platformě Azure Cielo (Azure Biosystems Inc., Dublin, CA, USA) se softwarem Azure Cielo Manager (verze 1.0.8.26) a na přístroji Genie® III (OptiGene, Velká Británie). K analýze citlivosti byl určen absolutní počet kopií standardu pomocí Avogadrovy konstanty ( $N_A=6,022 \times 10^{23} \text{ mol}^{-1}$ ).

### 3.4 Statistické zpracování dat

#### Zemská populace ČSZK

Data byla zpracována v softwarovém jazyce R verze 4.4.0 (R Core Team, 2020) pomocí balíčku *adegenet* a v programu MVSP v.3.1. Byl stanoven informační obsah polymorfismu (PIC; Botstein et al., 1980), očekávaná heterozygotnost ( $H_e$ ; Nei, 1978) a koeficient inbreedingu ( $F_{is}$ ; Wright, 1965). Bayesovská analýza genetické struktury proběhla v programu STRUCTURE version 2.3.4 (Pritchard et al., 2000). Optimální počet klastrů ( $K$ ) byl verifikován statistikou  $\Delta K$  (Evanno et al., 2005).

#### Fotometrie a vliv genotypu lokus *O*

Statistické testování dat z fotometrie probíhalo v R verze 4.4.0 (R Core Team, 2020). Smíšený lineární model byl zpracován algoritmem REML z knihovny *lmer* (Bates et al., 2015) podle rovnice:

$$y_{ijk} = \beta_0 + \beta_i \text{GENOTYPE} + u_{ji} + \epsilon_{ijk}$$

Kde:

- $y_{ijk}$ : Hodnota  $k$ -tého pozorování konkrétní proměnné (ref\_blunt atd.) pro  $i$ -tou úroveň genotypu a  $j$ -tou úroveň faktoru slepice.
- $\beta_0$ : Celkový průměr (absolutní člen / průsečík).
- $\beta_i$ : Pevný efekt genotypu. Koeficient  $\beta_i$  udává průměrný rozdíl v hodnotě konkrétní proměnné pro  $i$ -tý genotyp oproti celkovému průměru (referenční hodnotě).
- $u_{ji}$ : Udává náhodný efekt pro  $j$ -tou slepici v rámci  $i$ -tého genotypu. Svislá čára „|“ zdůrazňuje, že  $j$ -tá slepice je vnořena do  $i$ -tého genotypu. Přičemž platí, že  $u_{ji} \sim N(0; \sigma_u^2)$ .
- $\epsilon_{ijk}$ : Chybový člen (reziduum), který zachycuje veškerou zbývající variabilitu, jež není vysvětlena pevnými ani náhodnými efekty. Přičemž platí, že  $\epsilon_{ijk} \sim N(0; \sigma^2)$ .

---

Analýza hlavních komponent byla provedena dle Jolliffe (2002) a klasifikační model metodou CART dle Breiman et al. (2017).

---

## 4 Výsledky

### Vyhodnocení genetické struktury a diverzity zemské populace ČSZK

Analýza 16 mikrosatelitových markerů (17 SSR lokusů) u 272 jedinců současné populace ČSZK poskytla celkem 85 polymorfních fragmentů. Zpracování primárních dat bylo provedeno v softwaru GeneMapper version 3.0. (Applied Biosystems, Waltham, MA, USA). Z pohledu genetické diverzity se současná populace jeví jako relativně stabilní s průměrnou hodnotou očekávané heterozygotnosti ( $H_e$ ) 0,521 a pozorované heterozygotnosti ( $H_o$ ) 0,443. Byla však zjištěna mírně pozitivní hodnota koeficientu inbreedingu ( $F_{is} = 0,152$ ), což indikuje signifikantní deficit heterozygotů a probíhající příbuzenskou plemenitbu.

Komparace se vzorky z roku 2004 odhalila vliv genetického driftu – vlivem izolace populace nenávratně vymizely minimálně dvě historické alely (219 bp u lokusu *MCW0206* a 250 bp u *LEI0094*). Bayesovská analýza v programu STRUCTURE ( $K=2$ ) navíc indikovala rozpad zemské populace do dvou genetických klastrů se středně velkou mírou diferenciací, což potvrzuje reprodukční izolaci a riziko nárůstu inbreedingu do budoucna.

Srovnávací PCoA analýza s referenčními plemeny (vlaška koroptví, polská zelenonožka, ruská linie ČSZK) prokázala existenci ostré genetické bariéry. Zemská ČSZK tvoří izolovanou skupinu (vysoký fixační index  $F_{st} = 0,282$ ), kde dochází k naprosto minimálnímu toku genů zvenčí.

### MAS v programu Dominant CZ

**Lokus *O* (*SLCO1B3*):** PCR analýza z krve i z peří spolehlivě odlišila všechny tři genotypy (*O/O*, *O/o*, *o/o*). Následné fotometrické měření na reflektometru QCR (TSS, York, UK) a spektrofotometru CM-700d (Konica Minolta, Osaka, Japonsko) sice potvrdilo, že parametr  $a^*$  (osa červená/zelená) je klíčovým diskriminačním faktorem, nicméně metodou klasifikačních stromů (CART) bylo prokázáno, že fotometrie spolehlivě identifikuje pouze recesivní homozygoty (*o/o*). Genotypy *O/O* a *O/o* se hodnotově překrývají a opticky je nelze bezchybně rozeznat. Byl proto navržen efektivní dvoustupňový model selekce: primární fotometrický screening a následná molekulární genotypizace.

---

**Lokus *Cr* (*HOXC10*) a Lokus *C* (*TYR*):** Molekulární genotypizace ukázala, že vizuální selekce je u těchto znaků neefektivní, neboť neodhalí skryté heterozygotní přenašeče (*Cr/cr* a *CN/CC*). Matematické modely potvrdily, že zatímco fenotypová selekce ponechává tyto alely v populaci, molekulární selekce vede k okamžité a úplné eliminaci nežádoucích vloh již v první F1 generaci.

**Lokusy *Pti-1* a *Pti-2*:** Analýza potvrdila, že mutace v regulační oblasti genu *TBX5* je primárním determinantem ptilopodie. Samotná přítomnost této mutace však plně nevysvětluje pozorovanou fenotypovou variabilitu (redukované opeření vs. plné opeření), což naznačuje polygenní charakter znaku a nutnost zapojení dalších, dosud neidentifikovaných genetických faktorů (např. lokus *Pti-3*).

### **Vývoj testu LAMP pro *Mycoplasma synoviae***

Nově navržený *in silico* test pomocí programu KEC prokázal 100% mezidruhovou specificitu v rámci testované sady referenčních vzorků. Metoda s jistotou odlišila MS od příbuzné *M. gallisepticum*, čímž získává výhodu oproti běžně prováděným testům, které mají tendenci vykazovat křížovou reaktivitu (ELISA).

Detekční limit byl stanoven na základě desítkové ředící řady ze syntetického fragmentu na 10 fg/μl vzorku, což je se shodou s citlivostí klasických PCR metod. Zároveň byla ověřena kompatibilita testu s komerční soupravou pro rychlou terénní detekci DEP-25 DNA Extraction Kit (Top-Bio, ČR) a komerčním kitem Presto™ Buccal Swab Kit (Geneaid, Tchaj-wan), přičemž referenčním standardem byl CE-IVD kit Kylt® *Mycoplasma* spp. (AnIcon Labor GmbH, Německo).

---

## 5 Diskuse

### Genetická struktura ČSZK

Molekulární data aktuální populace ČSZK potvrzují relativní stabilitu celkové genetické diverzity ( $H_e = 0,52$ ). Přesto zjištěný koeficient inbreedingu ( $F_{is} = 0,152$ ) představuje varovný signál. Naměřené hodnoty potvrzují teoretické rodokmenové predikce Vostrý et al. (2020) o probíhajícím efektu hrdla láhve a nárůstu homozygotnosti. Navíc byla potvrzena ztráta historických alel v průběhu uplynulých dvou dekád. Výsledky upozorňují na nezbytnost přechodu od klasického rodokmenového sledování k molekulárně asistovanému řízení chovu (např. pomocí nástrojů jako je MolKin) a případně nasazení celogenomových analýz (High-Density SNP čipy) pro přesné mapování funkční diverzity.

### Selekce linií Dominant CZ

Aplikace MAS ve šlechtitelských programech se prokázala jako klíčová. Zatímco u lokusu *O* (*SLCO1B3*) lze k optimalizaci nákladů úspěšně využít dvoustupňový proces (rychlá eliminace nosnic snášejících bílá vejce s fotometrií a PCR ověření homozygotů *O/O*), u genů *TYR* (recesivní bílá) či *HOXC10* (fenotyp chocholky) vizuální selekce naprosto selhává. Diagnostické PCR testy zde jako jediné umožňují dosažení absolutní genetické čistoty linie okamžitě během jediné generace bez nutnosti testovacího křížení. Na druhou stranu diskuse nad genetickým pozadím ptilopodie ukázala limity stávající "single-gene" diagnostiky – komplexní morfologické znaky si do budoucna vyžadují pokročilejší sekvenční přístupy (GWAS, WGS) pro plné porozumění vlivu všech interagujících lokusů.

### Diagnostika patogenů

Zavedený izotermální LAMP test se ukázal jako srovnatelný s publikovanými PCR testy, navíc s výhodou nižších nároků na instrumentaci a možností využití přímo s polními extrakčními kity. Návrh molekulárního testu *in silico* dovedl v rámci testovaných polních a referenčních vzorků spolehlivě detekovat MS. Jako budoucí výzva nicméně zůstává vývoj tzv. DIVA testu, který by umožnil rozlišit přirozenou infekci od vakcinačních kmenů (např. kmene MS-H), což stávající varianta testu zatím nemožňuje.

---

## 6 Závěr

### Genetická struktura ČSZK

Hlavní cíl i dílčí cíle práce byly naplněny. Molekulární monitoring současné zemské populace ČSZK *in situ* potvrdil, že plemeno sice udržuje relativně stabilní celkovou genovou diverzitu ( $H_e = 0,52$ ), nicméně vykazuje známky probíhajícího inbreedingu ( $F_{is} = 0,152$ ) a skryté genetické eroze. Srovnání se vzorky z roku 2004 prokázalo nenávratnou ztrátu minimálně dvou ancestrálních alelických variant vlivem fixace a genetického driftu. Analýza v programu STRUCTURE a fixační index ( $F_{st} = 0,282$ ) potvrdily, že zemská populace představuje silně reprodukčně izolovanou jednotku, u níž klasický management založený na rodokmenech nedokáže dostatečně kompenzovat rizika inbreedingu. Byla tak potvrzena hypotéza, že molekulární přístup odhalí v populaci vyšší míru fragmentace a deficit heterozygotů, než jakou predikovaly standardní genealogické modely.

### Využití MAS v selekčním programu Dominant CZ

V rámci šlechtění komerčních linií se metody MAS ukázaly jako nezbytný a vysoce účinný nástroj:

- **Lokus *O* (zbarvení skořápky):** Pro fixaci modrozelené barvy skořápky byl navržen efektivní dvoustupňový přístup. Rychlé fotometrické měření (parametr  $a^*$ ) slouží k vyřazení recesivních homozygotů (bílá skořápka), avšak pro rozlišení homozygotů ( $O/O$ ) od heterozygotů ( $O/o$ ) je nezbytná PCR diagnostika detekující gen *SLCO1B3*.
- **Lokus *Cr* (chocholka) a Lokus *C* (recesivní bílé zbarvení):** Bylo prokázáno, že u genů s úplnou i neúplnou dominancí (*TYR* a *HOXC10*) klasická vizuální selekce naprosto selhává, protože nedokáže identifikovat skryté přenašeče ( $Cr/cr$  a  $CN/CC$ ). Cílená molekulární selekce pomocí navržených PCR testů zajistila rychlou eliminaci nežádoucích alel hned v první filiální generaci. Hypotézy o nezbytnosti molekulární detekce pro obě tyto vlastnosti byly potvrzeny.
- **Lokusy *Pti-1* a *Pti-2* (Ptilopodie):** Molekulární genotypizace sice potvrdila klíčovou roli mutace v regulační oblasti genu *TBX5*, avšak tato samotná detekce (tzv. single-gene diagnostika) nedokázala plně vysvětlit komplexní fenotypovou variabilitu v populaci. Ptilopodie se ukázala jako složitější polygenní

---

znak. Hypotéza, že testované markery zajistí fixaci znaku samy o sobě, byla zamítnuta; k přesné kontrole znaku bude nezbytné aplikovat celogenomové metody analýzy.

### **Molekulární detekce patogenů**

Dílčí cíl vývoje rychlé izotermální diagnostiky pro patogen MS byl úspěšně splněn a hypotéza potvrzena. Navržený *in silico* model primerů v programu KEC spolehlivě zaručil 100% mezidruhovou specifitu v rámci testované sady referenčních vzorků a test spolehlivě odlišil MS i od blízce příbuzné *M. gallisepticum*. Test LAMP dosáhl senzitivity s detekčním limitem 10 fg/μl, srovnatelným s konvenčními PCR testy. Test navíc prokázal výbornou kompatibilitu s terénními kity pro rychlou extrakci DNA, čímž se stává perspektivním nástrojem Point-of-Care diagnostiky pro rutinní screening a posílení biosecurity chovů drůbeže.

---

## 7 Seznam publikovaných prací

Beran, P., Rost, M., Beranová, K., Kváč, M., Stehlíková, D., Udoh, O. E., ... & Čurn, V. (2025). genCRC32: Collision-free CRC32 based hashing of DNA sequences. *Bioinformatics Advances*, vba315.

Kváč, M., Konvalinová, A., Holubová, N., Hůzová, Z., Kicia, M., McEvoy, J., ... & Sak, B. (2025). The first appearance of the zoonotic parasite *Cryptosporidium mortiferum* in human and tree and ground squirrels in Central Europe. *Emerging Microbes & Infections*, 14(1), 2456148.

Kváč, M., Konvalinová, A., Holubová, N., Hůzová, Z., Kicia, M., McEvoy, J., ... & Sak, B. (2025). The first appearance of the zoonotic parasite *Cryptosporidium mortiferum* in human and tree and ground squirrels in Central Europe. *Emerging Microbes & Infections*, 14(1), 2456148.

Beranová, K., Jozová, E., Anderle, V., Rost, M., Zita, L., Beran, P., ... & Tyller, M. (2024). Molecular tool for efficient breeding of DOMINANT Greenshell laying hens and significant refinement of phenotypic selection focused on eggshell color. *Poultry Science*, 103(12), 104425.

Zikmundová, V., Horáková, V., Tůmová, L., Koudela, B., Holubová, N., Sak, B., ... & Kváč, M. (2024). Pet chinchillas (*Chinchilla lanigera*): source of zoonotic *Giardia intestinalis*, *Cryptosporidium ubiquitum* and microsporidia of the genera *Encephalitozoon* and *Enterocytozoon*. *Veterinary Parasitology*, 331, 110275.

---

## 8 Seznam literatury

Bates, D., Mächler, M., Bolker, B., & Walker, S. (2015). Fitting linear mixed-effects models using lme4. *Journal of statistical software*, 67, 1-48.

Beran, P., Stehlíková, D., Cohen, S. P., & Čurn, V. (2021). KEC: unique sequence search by k-mer exclusion. *Bioinformatics*, 37(19), 3349-3350.

Besbes, B., Tixier-Boichard, M., Hoffmann, I., & Jain, G. L. (2007). Future trends for poultry genetic resources. In *Proceedings of the International conference of poultry in the 21st century: Avian influenza and beyond* (pp. 5-7).

Botstein, D., White, R. L., Skolnick, M., & Davis, R. W. (1980). Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *American journal of human genetics*, 32(3), 314.

Burt, D. W., & White, S. J. (2007). Avian genomics in the 21st century. *Cytogenetic and genome research*, 117(1-4), 6-13.

Domyan, E. T., Kronenberg, Z., Infante, C. R., Vickrey, A. I., Stringham, S. A., Bruders, R., ... & Shapiro, M. D. (2016). Molecular shifts in limb identity underlie development of feathered feet in two domestic avian species. *elife*, 5, e12115.

Doyle, J. (1991). DNA protocols for plants. In *Molecular techniques in taxonomy* (pp. 283-293). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.

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.

FAO (2024a). *Meat Market Review: Emerging trends and outlook*. Food and Agriculture Organization of the United Nations.

Feberwee, A., De Wit, J. J., & Landman, W. J. (2009). Induction of eggshell apex abnormalities by *Mycoplasma synoviae*: field and experimental studies. *Avian Pathology*, 38(1), 77-85.

Hillel, J., Groenen, M. A., Tixier-Boichard, M., Korol, A. B., David, L., Kirzhner, V. M., ... & Weigend, S. (2003). Biodiversity of 52 chicken populations assessed by microsatellite typing of DNA pools. *Genetics Selection Evolution*, 35(6), 533.

Chang, C. M., Coville, J. L., Coquerelle, G., Gourichon, D., Oulmouden, A., & Tixier-Boichard, M. (2006). Complete association between a retroviral insertion in the tyrosinase gene and the recessive white mutation in chickens. *BMC genomics*, 7(1), 19.

Kleven, S. H. (2008). Control of avian mycoplasma infections in commercial poultry. *Avian diseases*, 52(3), 367-374.

---

Li, J., Lee, M. O., Davis, B. W., Wu, P., Hsieh Li, S. M., Chuong, C. M., & Andersson, L. (2021). The crest phenotype in domestic chicken is caused by a 195 bp duplication in the intron of HOXC10. *G3*, *11*(2), jkaa048.

Meuwissen, T. H., Hayes, B. J., & Goddard, M. (2001). Prediction of total genetic value using genome-wide dense marker maps. *genetics*, *157*(4), 1819-1829.

Mottet, A., & Tempio, G. (2017). Global poultry production: current state and future outlook and challenges. *World's poultry science journal*, *73*(2), 245-256.

Muir, W. M., Wong, G. K. S., Zhang, Y., Wang, J., Groenen, M. A., Crooijmans, R. P., ... & Cheng, H. H. (2008). Genome-wide assessment of worldwide chicken SNP genetic diversity indicates significant absence of rare alleles in commercial breeds. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *105*(45), 17312-17317.

Nei, M. (1978). Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *genetics*, *89*(3), 583-590.

Notomi, T., Okayama, H., Masubuchi, H., Yonekawa, T., Watanabe, K., Amino, N., & Hase, T. (2000). Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic acids research*, *28*(12), e63-e63.

Pértille, F., Guerrero-Bosagna, C., Silva, V. H. D., Boschiero, C., Nunes, J. D. R. D. S., Ledur, M. C., ... & Coutinho, L. L. (2016). High-throughput and cost-effective chicken genotyping using next-generation sequencing. *Scientific reports*, *6*(1), 26929.

Pritchard, J. K., Stephens, M., & Donnelly, P. (2000). Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, *155*(2), 945-959.

Somes Jr, R. G. (1992). Identifying the ptilopody (feathered shank) loci of the chicken. *The Journal of heredity*, *83*(3), 230-234.

Tixier-Boichard, M. (2020). From the jungle fowl to highly performing chickens: are we reaching limits?. *World's Poultry Science Journal*, *76*(1), 2-17.

Vostrý, L., Vostrá-Vydrová, H., Moravčíková, N., Hofmanová, B., Rychtářová, J., Machová, K., ... & Kasarda, R. (2020). Monitoring of genetic diversity in autochthonous Czech poultry breeds assessed by genealogical data. *Czech Journal of Animal Science*, *65*(6).

Wang, Z., Qu, L., Yao, J., Yang, X., Li, G., Zhang, Y., ... & Wu, C. (2013). An EAV-HP insertion in 5' flanking region of SLC01B3 causes blue eggshell in the chicken. *PLoS genetics*, *9*(1), e1003183.

Wolc, A. (2015). Genomic selection in layer and broiler breeding. *Lohmann Information*, *49*(1), 1-11.

Wolc, A., Stricker, C., Arango, J., Settar, P., Fulton, J. E., O'Sullivan, N. P., ... & Dekkers, J. C. (2011). Breeding value prediction for production traits in layer chickens using pedigree or genomic relationships in a reduced animal model. *Genetics Selection Evolution*, *43*(1), 5.

---

Wragg, D., Mwacharo, J. M., Alcalde, J. A., Wang, C., Han, J. L., Gongora, J., ... & Hanotte, O. (2013). Endogenous retrovirus EAV-HP linked to blue egg phenotype in Mapuche fowl. *PloS one*, 8(8), e71393.

Wright, S. (1965). The interpretation of population structure by F-statistics with special regard to systems of mating. *Evolution*, 395-420.

Yang, Z., Liu, Y., Luo, J., Xiao, C., Yuan, H., Du, W., & Yang, X. (2025). Integrating whole-genome re-sequencing and transcriptome data to reveal the molecular mechanism of TBX5 gene regulating feathered feet in Guangxi native chickens. *Poultry Science*, 104(3), 104871.