

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Katedra antropologie a genetiky člověka

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Antropologie a genetika člověka



Bc. Iva Kulichová

Populace afrického sahelu pohledem fylogeografie eurasijských mtDNA haploskupin

Population of African Sahel according to phylogeography of Eurasian haplogroups

Diplomová práce

Vedoucí závěrečné práce/Školitel:

doc. Mgr. Viktor Černý, Dr.

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 Praze, 2. 5. 2016

Podpis

Poděkování:

V první řadě bych chtěla poděkovat svému školiteli doc. Mgr. Viktorovi Černému, Dr. za pomoc a cenné rady při vypracovávání této diplomové práce. Rovněž děkuji Mgr. Elišce Podgorné, Mgr. Editě Priehodové a Mgr. Martině Čížkové za ochotu a trpělivost při zaučování v laboratoři. Děkuji i portugalským kolegům, kteří mi pomohli s analýzou dat, zejména Dr. Verónice Fernandes. Dále pak děkuji své rodině za neocenitelnou pomoc a všemožnou podporu během celého studia.

Abstrakt

Tato diplomová práce zkoumá dvě mtDNA haploskupiny eurasijského původu, jež se vyskytují v převážné míře u Fulbů, pastevců afrického sahelu. Na prvotní analýzu bylo využito 544 vzorků nepříbuzných fulbských jedinců. Tyto vzorky byly klasifikovány na základě hypervariabilního segmentu I (HVS-I) mtDNA do haploskupin a následně byly pro celogenomové sekvenování mtDNA vybrány konkrétní eurasijské haplotypy. Obdržené mito-genomy byly zařazeny do fylogenetických stromů a datovány. Ukázalo se, že patří do haploskupin U5b1b1b a H1ca1a s pravděpodobným původem na Pyrenejském poloostrově, zřejmě ve frankokantaberském refugiu, kde vznikli jejich předkové v pozdním glaciálu až v první polovině holocénu. Ti následně migrovali přes Gibraltarskou úžinu do severní Afriky a na Saharu, kde se utvářela proto-fulbská pastevecká populace. Lze také předpokládat, že jedna její část přišla do Afriky z Blízkého východu společně s hovězím dobyt看em. V druhé polovině holocénu migrovala tato pastevecká populace z vysychající Sahary do sahelu. Patrně kvůli malému počtu migrujících žen byly do ní přijaty i ženy z lokálních subsaharských populací, což vysvětluje majoritní zastoupení západoafrických mtDNA haploskupin u dnešních Fulbů. Haploskupiny U5b1b1b a H1ca1a ale již zůstaly izolovány v jejich populaci.

Klíčová slova

Sahara, sahel, Fulbové, pastevectví, migrace, mtDNA haploskupiny

Abstract

The thesis is focused on two mtDNA haplogroups of Eurasian origin that occur mostly among the Fulani, herders of the African Sahel. On the initial analysis 544 DNA samples from unrelated Fulani individuals were used. These samples were classified to haplogroups according to hypervariable segment I (HVS-I) of mtDNA and subsequently, specific Eurasian haplotypes were chosen for the whole mtDNA genome sequencing. Obtained mito-genomes were assigned to phylogenetic trees and dated. It turned out that they belonged to haplogroups U5b1b1b and H1ca1a with the probable origin in the Iberian Peninsula, presumably in Franco-Cantabrian refugium where their ancestors originated in the period between the Late Glacial and the first half of the Holocene. Afterwards they migrated through the Strait of Gibraltar to North Africa and the Sahara, where the proto-Fulani pastoral population was being formed. It may also be assumed that a part of this population came to Africa from the Near East, along with cattle. In the second half of the Holocene, this pastoral population migrated from the drying Sahara to the Sahel. Probably due to small number of female migrants the females from the local populations were integrated, which explains the major representation of West African mtDNA haplogroups in contemporary Fulani. Haplogroups U5b1b1b and H1ca1a have remained isolated in their population.

Keywords

Sahara, Sahel, Fulani, pastoralism, migration, mtDNA haplogroups

Obsah

1. Úvod.....	8
2. Cíle práce	9
3. Afrika	10
3.1. Geografické vyčlenění	10
3.2. Podnebí a vegetace	11
3.2.1. Sahel.....	11
3.2.2. Sahara.....	12
3.2.3. Změny klimatu Sahary a sahelu v pozdním pleistocénu.....	12
3.2.4. Změny klimatu Sahary a sahelu v holocénu	13
4. Populace sahelu.....	17
4.1. Fulbové.....	18
4.1.1. Způsob života Fulbů	18
4.1.2. Historie Fulbů	20
4.1.3. Populační genetik a Fulbů.....	21
5. Mitochondriální DNA	24
5.1. Fylogenetika mtDNA	25
5.2. Datování mtDNA haploskupin.....	27
5.2.1. Odhad mutační rychlosti mtDNA	28
5.3. Rozšíření mtDNA haploskupin	30
5.3.1. Subsaharské mtDNA haploskupiny	33
5.3.2. Eurasijské mtDNA haploskupiny v Africe	34
6. Materiál.....	40
7. Metody	42
7.1. Izolace DNA a nspecifická amplifikace kitem Illustra	42
7.2. Amplifikace DNA polymerázovou řetězovou reakcí.....	43
7.3. Gelová elektroforéza	45
7.4. Sekvence.....	45
7.5. Zpracování dat.....	46
7.5.1. Klasifikace haploskupin a sdílení mtDNA a haplotypů.....	46
7.5.2. Datování.....	46
8. Výsledky	48
8.1. Klasifikace haploskupin Fulbů a jejich sdílení	48
8.2. Fylogenetické stromy a datování	52
8.2.1. Haploskupina U5b1	53
8.2.2. Haploskupina H1ca.....	54

9.	Diskuze	58
9.1.	MtDNA haploskupiny Fulbů určené podle HVS-I	58
9.2.	MtDNA haploskupiny Fulbů určené podle celé mtDNA a jejich datování	60
9.2.1.	Haploskupina U5b1	62
9.2.2.	Haploskupina H1ca.....	63
9.3.	Svědectví mtDNA, NRY a autozomů o původu Fulbů.....	64
9.4.	Fulbové a pastevectví.....	66
9.5.	Songhajci.....	67
10.	Závěr	69
11.	Seznam použitých zkratk	71
12.	Seznam použité literatury	73
13.	Přílohy.....	84

1. Úvod

Africký sahel, který severně přechází v poušť Saharu a jižně se mění v savany, je kontaktní zónou pasteveckých a zemědělských populací. Zatímco pastevci chovají svá stáda obvykle v polopouštních podmínkách blíže k Sahaře, usedlí zemědělci se naopak soustředují do savan, tedy do vlhčího prostředí, na kterém pěstování místních plodin (z obilnin především čiroku a dochanu) závisí. Počátky pěstování rostlin v sahelu, lze díky archeologickým nálezům poměrně dobře datovat. Ukazuje se, že se jedná o poměrně mladou událost posledních několika tisíců let. Ovšem u pastevců se archeologický materiál vzhledem k jejich kočovnému způsobu života prakticky nedochová, a tedy spolehlivé doklady o počátku afrického pastevectví tudíž chybí.

Nejpočetnější pasteveckou populací afrického sahelu jsou Fulbové, kteří obývají zejména jeho západní část, v menším měřítku ale i část východní, konkrétně povodí Modrého Nilu v Súdánu, západní Čad a některé oblasti ve Středoafrické republice. Uvažuje se o tom, že jejich předkové byli původně pastevci hovězího dobytka, ale velká část se během posledních staletí usadila a živí se dnes pěstováním plodin podobně jako ostatní etnické skupiny. Lze říci, že fulbští zemědělci splynuli s dalšími usedlými populacemi sahelu, byť není zřejmé, zda došlo i k výraznějšímu míšení. Ať tak či onak po jazykové stránce se pastevecké a zemědělské skupiny Fulbů příliš neliší. Dodnes přežívají i Fulbové, kteří praktikují plně kočovné pastevectví (zejména v sahelských částech Mali, Nigeru, Nigérie, Kamerunu a Čadu), a předpokládá se, že právě ti mohou odrážet genofond prapůvodní fulbské pastevecké populace, což lze využít pro archeogenetický výzkum historie afrického pastevectví.

Jako nejstarší marker pro výzkum genetické diverzity na molekulární úrovni byla používaná mitochondriální DNA (dále jen mtDNA), která se dědí jenom po mateřské linii, nerekombinuje a v buňkách se vyskytuje ve velkém množství kopií. Dnes se výzkum této molekuly dostává do pozadí, hlavně kvůli celogenomovým studiím, které díky snazší dostupnosti sekvenování třetí generace poskytují více informací. Ovšem to, že se od mtDNA postupně ustupuje, neznamená, že z ní už nic nového nelze zjistit. Studie Černý et al. (2006), Černý et al. (2011b) a Cerezo et al. (2011) ukazují, že v porovnání s jinými západosahelskými populacemi jsou u Fulbů zastoupeny ve vyšší míře eurasijské mtDNA haploskupiny. Tato část fulbského maternálního genofonu ovšem dodnes nebyla uspokojivě vyhodnocena.

2. Cíle práce

Hlavním cílem této práce je odhadnout stáří posledního společného předka vybraných eurasijských mtDNA haploskupin v africkém sahelu a přispět tak k problematice trans-saharských migrací a afrického pastevectví ovlivněného klimatickými změnami pozdního pleistocénu a holocénu. K tomuto cíli vedou následující kroky neboli dílčí cíle:

- a) Podle sekvence prvního hypervariabilního segmentu (HVS-I) mtDNA zjistit zastoupení subsaharských vs. eurasijských haploskupin u sahelských Fulbů a analyzovat jejich sdílení v populacích z dalších afrických regionů.
- b) Provést celogenomové sekvenování mtDNA vybraných haploskupin eurasijského původu, zařadit je do fylogenetického stromu a datovat.
- c) Na základě geografického původu jednotlivých vzorků interpretovat zjištěné klady a jejich stáří. Jedná se zejména o posouzení toho, jak a kdy se tyto linie dostaly do subsaharské Afriky, resp. afrického sahelu.
- d) Zařadit nově zjištěné výsledky do dosavadních poznatků o Fulbech zjištěných analýzami mtDNA, Y chromozomu a ostatních autozomů i s ohledem na kulturní a lingvistická hlediska.
- e) Diskutovat nově zjištěné výsledky v širším kontextu afrického pastevectví.

3. Afrika

3.1. Geografické vyčlenění

Afrika je hned po Asii druhý největší kontinent s rozlohou 30,5 milionů km² a počtem obyvatel převyšujícím 1 miliardu. Ze západu je omývána Atlantickým oceánem, který na severu přechází Gibraltarským průlivem ve Středozevní moře oddělující Afriku od Evropy. Na východě je Afrika ohraničená Indickým oceánem a Rudým mořem, které omývá i západní břeh Arabského poloostrova až do pevninského přepojení Asie s Afrikou zvaného Suezská šíje. K Africe patří i několik ostrovů, největší z nich, Madagaskar, leží jihovýchodně od ní.

Afrika je rozdělena rovníkem na severní a jižní část a většina její plochy se nachází na východní polokouli. Kromě toho je členěna horizontálně na několik biogeografických pásem (zjednodušeně také vegetačních pásem či biomů), která jsou definovaná přirozenou vegetací, jež by vznikla bez zásahu člověka, například beze změn krajiny vlivem zemědělství a pastevectví. Častokrát jsou právě tyto zásahy člověka měnící přirozenou vegetaci důvodem problematického odlišení nebo přesné lokalizace jednotlivých biomů (Grosz-Ngaté et al., 2014).

Nejsevernější biom Afriky se nachází na jejím styku se Středozevním mořem a je tvořen úzkým pásem středomořské vegetace. Jižně je ohraničený pohořím Atlas, které se táhne ze severního Maroka, v délce 2 500 km až do Tuniska. Následuje poušť Sahara probíhající napříč Afrikou od severozápadního pobřeží Atlantického oceánu až po pobřeží Rudého moře. Tvoří asi čtvrtinu rozlohy tohoto kontinentu. Vytváří přirozenou bariéru mezi rostlinnými, živočišnými a lidskými populacemi severní a subsaharské Afriky (Mares, 1999). Spojení těchto dvou oblastí zabezpečuje údolí Nilu na severovýchodě Sahary (Reid, 2012). Sahara ve své jižní části přechází pozvolna v oblast travnaté a stromové savany a toto přechodové pásmo, kde je poušť postupně pokrývána vegetací, se nazývá sahel. Jedná se o relativně úzký pás, dle Mares (1999) kolem 400 km široký.

Slovo sahel pochází z arabského *sahíl*, což v překladu znamená okraj nebo břeh. Tento název můžeme tedy interpretovat jako ukončení rozsáhlé pouště Sahary, která konečně přechází v krajinu s vegetací (Reid, 2012). Často se setkáme i s termínem sahelosúdánské pásmo, kde pojem súdán z arabského *Bilád al-Súdán*, v překladu země černých, označuje pásmo obývané lidmi sub-saharského původu, tedy pásmo savan (Černý, 2006). Savany dále přecházejí v oblast tropických pralesů, kterými se ale tato práce, stejně jako krajinou Afriky jižně od rovníku, už nebude zabývat.

3.2. Podnebí a vegetace

Velká část území Afriky se nachází mezi obratníky Raka a Kozoroha. Proto je na téměř celém kontinentu tropické podnebí a teplota vzduchu neklesá pod 21°C devět měsíců v roce. V oblasti rovníku se průměrná teplota během nejteplejších a nejchladnějších měsíců mění jenom mírně, čím se ale vzdálenost od něj zvětšuje, tím jsou i tyto sezónní variace patrnější. Podnebí Afriky ovlivňují i oceánské proudy, větry, tlak, převýšení, jezera a přímořská či kontinentální poloha (Grant, 2014).

Stejně, jako jsme vyčlenili biomy severní Afriky v předchozí části, je možné zde rozlišit na základě teploty vzduchu a četnosti srážek jednotlivé klimatické zóny. Tyto zóny úzce korelují s biologickými pásmy. Dle Grosz-Ngaté et al. (2014) v severní tropické Africe¹ rozlišujeme:

- tropické suché (aridní) podnebí – oblast poušti Sahara
- tropické polosuché (semiaridní) podnebí – oblast sahelu a etiopské náhorní plošiny
- tropické střídavě vlhké podnebí – oblast travnatých a stromových savan
- tropické vlhké (ekvatoriální) podnebí – oblast tropických pralesů

3.2.1. Sahel

Území sahelu je ze suššího severu ohraničeno izohyetou² 100–200 mm srážek za rok a z vlhčího jihu, kde přechází sahel v savanu, je to 600–1 000 mm srážek za rok. Spadá do tropického polosuchého podnebí, které je kromě vysokých teplot vzduchu (v průměru 26–30°C) charakterizované i střídáním období sucha a období dešťů. Období dešťů zde trvá dva až pět měsíců, na rozdíl od tropických savan, kde je to šest až deset. Sled těchto cyklů během roku je dán působením suchého horkého větru harmatan, jenž vane ze Sahary na severu a vlhkých monzunů vanoucích od Atlantického oceánu na západě a na jihu sahelu (UNEP, 2012).

S podnebím sahelu úzce souvisí i vegetace, která je závislá na kvantitě srážek, ale i na kvalitě půdy, která se zde vyskytuje. Obecně na celém území rostou různé druhy trav, a jejich variabilita, stejně jako hustota, stoupá směrem na jih, kde je více srážek. Blíže k Sahaře jsou trávy střídány křovinami a ze stromů tady dominují akácie. Rozdíly mezi délkami jednotlivých období sucha a dešťů, právě tak jako mění se počet srážek za rok,

¹ Afrika bez nejsevernější oblasti, jež má subtropické podnebí.

² Izohyeta je čára spojující místa se stejným objemem atmosférických srážek za určité časové období.

způsobují každoroční změny ve složení vegetace, zejména jednorokých trav (UNEP, 2012).

3.2.2. Sahara

Podnebí Sahary je tropické suché, pro něj je typické větrné počasí a vysoké denní teploty. Denní teplota během července většinou převyšuje 37°C, v některých oblastech je dokonce vyšší než 43°C. Jelikož je ale vzduch velmi suchý, po západu slunce dojde k rychlému ochlazení země a noci jsou studené. V zimním období může v noci, zejména ve vyšších polohách mrznout. Srážky jsou zde značně nepravidelné a většinou vznikají během krátkých intenzivních bouří. V nejsušších oblastech Sahary neprší i celé roky. Na tyto nepříznivé klimatické podmínky se adaptovala i zdejší vegetace. Je roztroušená a zakrnělá, v nejsušších oblastech (méně než 20 mm srážek za rok) se nevyskytuje vůbec. V jiných oblastech ale můžeme najít trávy, trnité keře, v oblastech s vyšší nadmořskou výškou rostou akácie. Další druhy stromů se vyskytují ve vyschlých korytech řek zvaných wádí (termín převzatý z arabštiny). Jedná se především o tamaryšky a palmy z rodu *Hyphaene*. V oázách čerpajících vláhu z podzemních zdrojů vod pěstují lidé datlovníky a granátovníky nebo jiné ovocné stromy (Grant, 2014; Mares, 1999).

3.2.3. Změny klimatu Sahary a sahelu v pozdním pleistocénu

Sahara nebyla vždy jenom pouští. V minulosti docházelo ke střídání suchých a vlhkých fází, kdy byla pokryta vegetací. Ty lze identifikovat například na základě zastoupení C₃ a C₄ rostlin v kvartérních sedimentech. Větší obsah C₃ vegetace je charakteristický pro období s větší hustotou stromů a tudíž i vyšší humiditou. Za posledních 192 000 let dle Castañeda et al. (2009) došlo v oblasti Sahary a sahelu ke třem takovým obdobím, jež také korelují s migrací lidských (Castañeda et al., 2009) i zvířecích (Drake et al., 2011) populací napříč jinak nehostinnou Saharou.

Období před 110 000–120 000 lety s vysokým zastoupením C₃ rostlin na Sahaře a v sahelu (Castañeda et al., 2009), koresponduje dle archeologických a dalších paleoklimatologických dokladů s obdobím, kdy docházelo k první migraci anatomicky moderního člověka (AMČ) ze subsaharské Afriky do severní Afriky a Levanty (Drake et al., 2011; Osborne et al., 2008). Přítomnost *Homo sapiens* v oblasti Blízkého východu byla zřejmě jenom krátkodobá, a většinou dnešních badatelů není považována za základ pro migraci a úspěšné přežití AMČ mimo Afriku (Shea, 2008; Soares et al., 2012). Více

podpory získává kolonizace překročením úžiny Báb al-Mandab, k níž došlo podle posledních archeologických nálezů ve stejném období (Armitage et al., 2011; Rose et al., 2011).

Podle divergence prvních eurasijských mtDNA haploskupin AMČ opustil subsaharskou Afriku v období před 50 000–65 000 lety (Endicott and Ho, 2008; Fernandes et al., 2012; Soares et al., 2012). A i v tomto období, přesněji před 45 000–50 000 lety, byla zjištěná expanze C₃ flóry v oblasti Sahary a sahelu (Castañeda et al., 2009). Podmínky pro překonání rozsáhlé Sahary tedy byly mnohem příhodnější než v předešlém aridním období. Ovšem druhá expanze z Afriky neproběhla podél pobřeží Středozemního moře, nýbrž přes Rudé moře do jižní Arábie (Fernandes et al., 2012; Soares et al., 2012). Zvýšení humidity Sahary tedy vedlo spíše k jednodušší dostupnosti potravy, a tím následné populační expanzi a migraci nejenom mimo Afriku, ale i v jejím rámci (Soares et al., 2012).

Poslední glaciální maximum (z angl. *Last Glacial Maximum*, LGM) přineslo před 18 000–22 000 lety výrazné ochlazení klimatu, jež silně ovlivnilo faunu a flóru kontinentů, a stejně tak i lidi na nich žijící. Například severní část Eurasie byla pokryta pevninským ledovcem a její (nejenom lidské) populace se stáhly do jižněji situovaných refugií, kde měly větší množství a diverzitu potravních zdrojů. Pro Afriku znamenalo LGM vysychání. Sahara tehdy rozšířila svou rozlohu a zabrala více než třetinu kontinentu, což je možné doložit písečnými dunami přítomnými za jejími dnešními hranicemi (Stock, 2012).

3.2.4. Změny klimatu Sahary a sahelu v holocénu

Opětovné oteplení klimatu nastalo před 15 000 lety. V Eurasii začaly tát pevninské ledovce a bylo možné opět osídlit její severní části (Stock, 2012). V Africe na Sahaře se toto oteplení projevilo se značným zpožděním, až v období staršího holocénu, kdy se formovala v její jižní části jezera a bahnitě křemičitanové nánosy v Egyptě (Kuper and Kröpelin, 2006). Vlivem zvlhčení klimatu došlo k posunu tropického deštného pralesa severně nejméně o 800 km, což způsobilo i posun dalších klimatických pásem a v neposlední řadě také vzestup hladiny Čadského jezera, které tehdy zasahovalo až k pohoří Tibesti (Černý, 2006). Jelikož Sahara zabírá značnou část afrického kontinentu, není (a nebylo) ve všech jejích částech podnebí stejné. Jižní část Sahary a sahel připomínaly dnešní savany, centrální část byla spíše semiaridní. Nejdůležitější byl však vznik početných vodních zdrojů, díky kterým mohly lidské populace Saharu začít obývat (Drake et al., 2011; Kuper and Kröpelin, 2006; Stock, 2012).

Jedno z největších saharských pohřebišť staršího a středního holocénu s označením Gobero bylo prozkoumáno v severním Nigeru, zhruba 450 km od města Agadez. Toto pohřebiště zahrnuje přibližně 200 hrobů, které jsou umístěné při depozitu, předpokládajícím přítomnost paleojezera. Nejstarší hroby v této lokalitě byly datovány do období před 7 580–7 730 lety a kontinuální osídlení se předpokládá až do období před 6 210–6 380 lety. V hrobech, ale i v okolních depozitech, byla nalezena mikrolitická industrie, kostěné harpuny i keramika. Tyto artefakty byly spojeny s kiffianskou kulturou. Na základě hustoty hrobů, přítomné keramiky, přiloženého náčiní a nahromaděného kostního materiálu zvířat se předpokládá, že tato populace byla usedlá a obživu získávala lovem a rybolovem (Serenio et al., 2008).

Dle Drake et al. (2011) došlo k prvotnímu znovuosídlení Sahary ve starším holocénu (začátek před cca 10 000 lety) právě populací, která se živila lovem ryb a vodních zvířat. Toto osídlování probíhalo ze západu (jihozápadu) na východ a současně zde byla další populace, která migrovala ze severu na jih a byla tvořena lovci užívajícími luk a šíp.

Pohřebiště Gobero ovšem zahrnuje i další období osídlení AMČ a to v rozmezí před 2 500–5 200 lety. Populace žijící v tomto období vykazuje gracilnější rysy než předchozí populace a hrobová výbava poukazuje na tenerianskou kulturu. I když se tato populace živila zejména rybolovem, lovem zvířat, případně sběrem plodin, tak archeologický materiál obsahuje v malé míře také kosti a zuby domestikovaného skotu (Serenio et al., 2008).

Chov hospodářských zvířat byl na Sahaře zaznamenán počátkem středního holocénu, což bylo klíčové pro začátek zdejšího pastevectví (Kuper and Kröpelin, 2006). Předpokládá se, že centrem domestikace koz a ovcí byla jihozápadní Asie, a před 8 000 lety se tato zvířata dostala přes Blízký východ do Afriky. Podle archeologického materiálu byl skot domestikován ve východní Sahaře, v oblasti dnešního Egypta, už někdy před 11 000 lety (Wendorf and Schild, 1998). Jednalo se spíše o první pokusy o pastevectví, které byly stále kombinovány s lovem jako hlavním zdrojem obživy (Gautier, 2002).

Ovšem genetické doklady egyptské domestikace jsou poněkud sporné. Práce Bonfiglio et al. (2012) a Freeman et al. (2006) na základě mtDNA diverzity toto domestikáční centrum nepotvrdily, a za domestikáční centrum skotu *Bos taurus* označily Blízký východ, odkud se potom rozšířil jak do Evropy, tak do Afriky. Bonfiglio et al. (2012) určili stáří této domestikace na 10 000–13 000 let. Nicméně celogenomová studie (tzv. *genome-wide*) Decker et al. (2014) zjistila velký podíl afrického pratora v genofondu dnešních afrických *Bos taurus*.

Nezávisle na tom byl jiný poddruh skotu *Bos indicus* (známý také pod označením zebu) domestikován v severozápadní Indii, odkud se později dostal i do Afriky a dnes zde tvoří majoritní zastoupení (Gautier, 2002; ILRI, 2006).

V polovině středního holocénu (před 5 300 lety) se na Sahaře objevuje i usedlejší způsob života, jímž je zemědělství (Kuper and Kröpelin, 2006). Postupně dochází k opětovnému vysychání Sahary začínajícímu spíše na severu, což způsobuje přesun populací jižněji až do dnešního sahelu, ale i jejich fragmentaci, jelikož některé populace se stáhly do vyšších poloh středo-saharských skalních masivů nebo k velkým vodním zdrojům (Kuper and Kröpelin, 2006; Lernia et al., 2013; Vernet, 2002). V období před 3 500–5 300 lety převládal nomádký způsob života, ale už se nejednalo o lovecko-sběračskou subsistenční strategii, ale pastevectví specializované na chov hovězího dobytka (Kuper and Kröpelin, 2006).

Před 3 000 lety došlo k poměrně rychlému ústupu srážek, Sahara se vylidnila a opět se stala (téměř) nepřekonatelnou bariérou pro lidské populace. Spojením klimaticky příznivějšího severu (pásma středomořské vegetace) a jihu (sahel a savana) zůstalo v podstatě jen povodí Nilu, kde později vznikla civilizace starověkého Egypta (Kuper and Kröpelin, 2006), která byla dle výzkumů některých českých egyptologů saharskými populacemi neolitu výrazně ovlivněna (Bárta, 2010). Sahara se zhruba od poloviny třetího tisíciletí před současností (z angl. *Before Present*, BP) stává takovou, jaká je dnes. Poslední vlhké období nastalo v 5. století n. l. a skončilo mezi desátým a třináctým stoletím, dle oblasti. Sahel se v této době stal ideálním místem pro rozvoj pastevectví a částečně i zemědělství (Vernet, 2002).

Je důležité si uvědomit, že kromě výše uvedených zásadních klimatických změn, docházelo na Sahaře i k méně výrazným klimatickým oscilacím, které probíhaly v rozmezí 10 až 25 let. Holocenní populace byly tudíž nuceny přizpůsobit tomu svoji subsistenční strategii. Zřejmě kvůli těmto klimatickým oscilacím, ale i kvůli sezónním změnám vlhkosti se tehdy na Sahaře prosadil nomádký způsob života lépe než usedlé zemědělství. Oblast poskytovala navíc i dostatek volně rostoucích trav, hlíz a ovoce, takže nebylo nutné zavádět pěstování vyšlechtěných odrůd, jako tomu bylo na Blízkém východě (Hassan, 2002; Kuper and Kröpelin, 2006; Vernet, 2002). Severně od Čadského jezera se mimochodem dodnes sbírají zrna divokých trav, tzv. *kreb*, který je doplňkem obživy v době nedostatku. Uvažuje se i o tom, že v dřívějších obdobích mohl být využíván mnohem častěji (Batello et al., 2004). Objasnění vlivu krátkodobých klimatických změn na

tehdejší faunu a flóru by lépe ozřejmilo vývoj subsistenčních strategií saharských populací (Kuper and Kröpelin, 2006; Vernet, 2002).

4. Populace sahelu

Důležitým faktorem pro osídlování sahelu nebylo jen celkové klima, ale i vodní zdroje, které jsou zde stále přítomné. Na západě jsou to řeky Senegal a zejména Niger se svou vnitřní deltou, v centrální části Čadské jezero a na východě již zmiňovaný Nil. Řeky se v období dešťů rozvodňují v oblasti savan a cestou na sever ve svých údolích vytvářejí úrodné půdy, které dokáží uživit početné lidské populace. K rozvoji zemědělství poskytuje možnosti i Čadské jezero (Reid, 2012). Na jednu stranu rozděluje sahel na část východní a západní, jelikož vytváří zcela unikátní ekosystém (Batello et al., 2004), na druhou stranu tyto části spojuje, protože se jedná o důležitý vodní zdroj, který v minulosti (i v současnosti) přilákal lidské populace rozličného původu (Černý, 2006). Potkávají se zde tři africké jazykové rodiny: afroasijská, nigerokonžská a nilosaharská, stejně jako tři subsistenční strategie: pastevectví, zemědělství a příležitostní lovci-sběrači (Nicolaisen, 2010). Oblast sahelu tedy sloužila jako migrační koridor lidských populací (Černý et al., 2007; Soares et al., 2012; Tishkoff et al., 2009; Triska et al., 2015).

Sahelu dominují dvě subsistenční strategie: pastevectví a zemědělství. Pastevci sem přišli z vysychající Sahary v druhé polovině středního holocénu a jsou koncentrováni blíže k Sahaře, kam během období dešťů migrují se svými stády. Zemědělství se zde prosadilo jenom recentně, spíše v částech, kde sahel prochází v savany. Původně byli pastevci dominantní skupinou sahelu, ale za posledních pár set let velká část z nich přešla k usedlejšímu způsobu života (Černý, 2006; Reid, 2012). Na mnoha místech se potkávají se zemědělci různých etnik, a proto jedni či druzí hovoří některým z rozšířenějších jazyků, např. ve středozápadním sahelu se fulbští pastevci dorozumívají s ostatními skupinami hauštinou, v Senegalů wolofštinou.

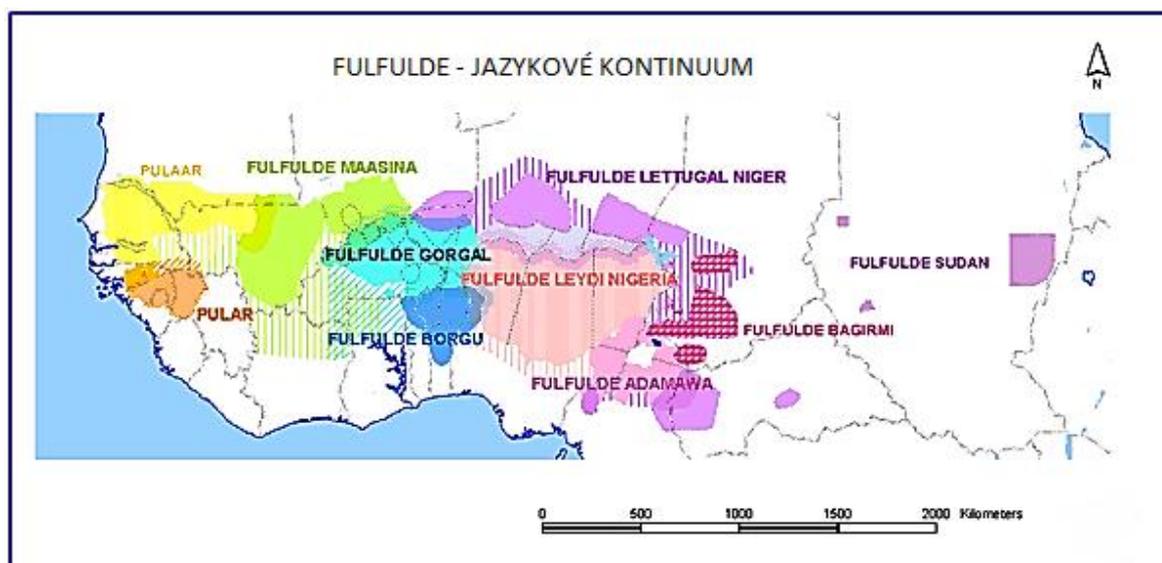
Vztah mezi pastevci a zemědělci je ambivalentní, obě skupiny povětšinou spolupracují (Černý, 2006), ale mohou se mezi nimi objevit i konflikty končící agresivními střety (McGregor, 2014). Jedním z příkladů kladného vztahu dvou ekonomických orientací je prodej mléčných výrobků (především přepuštěného másla) zemědělcům, od kterých na oplátku pastevci kupují obiloviny a řemeslné výrobky. Dalším příkladem je využívání dobytka pastevců na pohnojení půdy polí po sklizni, tzv. košárování. Ke konfliktům dochází především v sušších letech, kdy se snižují jinak běžně dostupné zdroje vody (Černý, 2006; Thébaud, 2002).

Nejpočetnější populací západoafrického sahelu jsou Fulbové, kterým bude věnována další kapitola rovněž i z důvodu, že většina vzorků, na nichž byla tato diplomová práce

založena, pocházela právě od této populace. Zemědělci sahelu jsou reprezentováni například Wolofy (Senegal), Songhajci, Bambarý (Mali), Mossijci (Burkina Faso), Hausy, Kanurijci (Niger, Nigérie) a Kanemby (Čad), pokud zmíníme jen ty nejvýznamnější skupiny, s nimiž Fulbové přicházejí do kontaktu.

4.1. Fulbové

Fulbové (zvaní i Fulbe, Peulh, Peul, či Foulah) obývají především krajinu na západ od Čadského jezera (Černý et al., 2006), ale můžeme je najít i v Súdánu v oblasti Modrého Nilu (Delmet, 1994). Jejich populace čítá kolem 30 milionů lidí, kteří žijí v 17 státech. I když jsou jednotlivé skupiny od sebe častokrát geograficky vzdálené, liší se, ať už jazykově nebo geneticky, pouze minimálně (Černý et al., 2006). Fulbština je řazena do nigero-konžské jazykové skupiny, v originále se nazývá *fulfulde* (v Senegalu *pulaar*, v Guineji *pular*) a má mnoho dialektů (Harrison, 2003), jejichž rozšíření ukazuje obrázek č. 1.



Obrázek 1 : Rozšíření dialektů fulbštiny v africkém sahelu (Tucker, 2003)

4.1.1. Způsob života Fulbů

I když byli Fulbové původně kočovní pastevcí, dnes tomu tak úplně není. Asi polovina jejich populace preferuje usedlý způsob života a živí se zemědělstvím. Druhá polovina zůstává věrná pastevectví. Jak již bylo uvedeno výše, skupiny pastevců a usedlíků vzájemně spolupracují (Binns et al., 2012; Černý, 2006). Jsou mezi nimi ovšem i skupiny, které můžeme podle způsobu života označit za polousedlé (či polonómádské) (Binns et al.,

2012). Lze zkrátka říci, že Fulbové vykazují celou škálu potravně produkčních strategií s ohledem na místo, kde žijí. Severněji lokalizované skupiny jsou více závislé na pastevectví než skupiny žijící více na jih.

Usedlé komunity pěstují obilniny, zejména čirok a chovají menší množství domácích zvířat (Černý, 2006). Někteří si přivydělávají péčí o dobytek dobře situovaných městských spoluobčanů, kteří je chovají jako symbol bohatství a vysokého sociálního statutu. Jiní se zabývají transportem zvířat a obchodováním s masem. Polousedlíci se zabývají chovem dobytka a větší či menší důležitost přikládají i pěstování rostlin. Mají stálá obydlí a migrují jen na kratší vzdálenosti (Binns et al., 2012).

Kočovní Fulbové jsou známí jako *M'Bororo* nebo *Woodabe*. Praktikují transhumace, což jsou sezónní migrace, kdy celé rodiny a jejich stáda putují v období dešťů na sever a v období sucha na jih, aby si zajistily zdroj vody a dostatek pastvy pro dobytek. Délka trasy závisí na konkrétní komunitě, ale v průměru se jedná o 500 km (Dupire, 1962).

Střídání sezón se u Fulbů projevuje i v jejich potravě. V období dešťů, kdy práce pastevců není nijak náročná, je jejich strava vydatná a pestrá. Naopak v období sucha, kdy je i jejich fyzická námaha největší, je jejich potrava značně nedostatečná. Základem je proso, ke kterému se přidává čerstvé či kyselé kravské (u dětí i kozi) mléko, jehož denní konzumace činí dva až pět litrů na osobu. Přechod od „chudé sezóny“ k „sezóně hojnosti“ ovšem není bezproblémový. Jedna z nejvýznamnějších etnoložek Marguerite Dupire, která dlouhodobě pobývala v 50. letech minulého století v Nigeru, popisuje, že se u Fulbů v té době se dostávají střevní potíže, ke kterým se díky vlhkému klimatu může přidat i malárie a reumatismus (Dupire, 1962).

Ať už se jedná o Fulby, kteří praktikují nomádský způsob života, nebo o ty usedlé, vždy je pro ně charakteristický jejich pozitivní vztah k domácím zvířatům (Binns et al., 2012). K chovu dobytka patří i schopnost vnímat individuální potřeby zvířete, nejenom celého stáda, a schopnost poskytnout mu veškerou péči (Černý, 2006). Například Fulbové jsou schopni rozeznat klinické příznaky nejrůznějších zoonóz jako je tuberkulóza, slintavka, kulhavka a nákaza způsobená parazitem *Fasciola hepatica*, což u nefulbských zemědělců chovajících dobytek není vůbec běžné (Kelly et al., 2016).

Společnost Fulbů je charakterizovaná patrilokalitou a patrilinearitou. Fulbové vyznávají islám a mohou mít i více manželek, běžné je to ale u výše postavených osob. Poměrně rozšířené jsou i sňatky mezi bratřenci a sestřenicemi z prvního a druhého kolene, s větší četností u rodin s menším majetkem – stádem dobytka (Hampshire and Smith, 2001).

4.1.2. Historie Fulbů

Historii Fulbů, respektive sahelského pastevectví, které Fulbové v západní části sahelu dnes reprezentují v podstatě jako jediní, je možné spojovat se vznikem a rozvojem pastevectví na Sahaře v první polovině středního holocénu (před 5 300–7 000 lety). Kromě kosterních pozůstatků domestikovaného dobytka z této doby (Gautier, 2002), to dokládá i keramika s přítomností mléčného tuku poukazující na konzumaci a zpracovávání mléka, která je rovněž datovaná do tohoto období (Dunne et al., 2012).

Přítomnost pastevců na Sahaře dokládají pochopitelně i početné skalní malby a rytiny zobrazující každodenní život pastevců, dobytek a dokonce i dojení krav (di Lernia and Gallinaro, 2010; Hampaté Ba and Dieterlen, 1966). Tyto rytiny a malby byly několikrát datovány různými způsoby, a zřejmě vznikaly před 4 000–7 000 lety, jejich přesnou posloupnost jde ale určit jen velmi těžko (di Lernia and Gallinaro, 2010). V oblasti dnešního jihovýchodního Alžírsko v pohoří Tassili-n-Ažžer se vznik maleb přisuzuje předkům Fulbů, protože ti dodnes podle některých autorů praktikují stejné rituály, které jsou na malbách zobrazeny (Hampaté Ba and Dieterlen, 1966). Souvislost prehistorických maleb a současných rituálů byla ale v poslední době zpochybněna (Quelloc, 2004). Výše uvedené poznatky dokládají tedy pouze přítomnost pastevců v oblasti Sahary, z které potom migrovali kvůli desertifikaci do sahelu.

Již první cestovatelé si povšimli, že z antropologického hlediska se Fulbové od sousedních etnik odlišují některými europoidními rysy. Mají protáhlý obličej s jemnými rysy, úzkými rty a delším rovným nosem, rovněž mají světlejší kůži a méně kudrnaté vlasy. Takto vypadající Fulbové se ale vyskytují jenom velice málo, většinou se jedná o kombinaci znaků sub-saharských populací a znaků europoidních (Dupire, 1962). Právě europoidní znaky, jež jsou typické i pro populace na severu Afriky, přiměly některé badatele uvažovat o původu Fulbů v této oblasti, nebo alespoň určité příměsi, jelikož se jedná o nomády. Hovořilo se například o vzniku Fulbů z protoberberské populace, nebo míšením odnože etiopské populace s Berbery na severu a s negroidními populacemi na jihu, předkládána byla také hypotéza o původu Fulbů v Egyptě, nebo v oblasti Blízkého východu (Tauxier, 1937). Naopak zařazení fulbštiny do nigero-konžské jazykové skupiny předpokládá kořeny Fulbů spíše v západní Africe (Blench, 2006). Výše uvedené hypotézy vycházejí zejména z lingvistického, antropologického, případně archeologického hlediska, dnes je ale možné formulovat hypotézy i z pohledu genetiky, jak bude ukázáno dále.

Méně dávná minulost Fulbů je probádána lépe. Dnešní rozložení v sahelo-súdánském pásu je dáno jejich migrací z oblasti dnešního Senegalu směrem na východ až k Čadskému jezeru v rozmezí 11. až 19. století (Reid, 2012; Tauxier, 1937). Oblasti s větší koncentrací Fulbů (všechny v povodí velkých řek) zde dokládají přítomnost fulbských států v minulosti (Boutrais, 1994). Jedná se zejména o imamáty Futa Toro (severovýchodní Senegal), Futa Džallon (severní Guinea), říši Massinu (centrální Mali – delta řeky Niger) a chalífát Sokoto (hranice Nigeru a severní Nigérie). Tyto státy vznikaly v 18. a 19. století, kdy Fulbové přijali islám. Někteří z nich se radikalizovali a iniciovali sérii svatých válek, tzv. džihádů. Asi nejvýznamnějším fulbským reformátorem a dobyvatelem byl šejk Usman dan Fodio (1754–1817), zakladatel chalífátu Sokoto, s jehož podporou vzrostla v 19. století také moc kamerunských Fulbů jižně od řeky Benue (Černý, 2006; Reid, 2012).

Vlivem kolonizace Afriky Evropany koncem 19. století tyto radikalizační tendence ustaly (Reid, 2012).

V poslední době se nicméně objevují hlasy označující právě Fulby za strůjce teroristických útoků organizovaných povstaleckou skupinou Boko Haram v severovýchodní Nigérii. Tato organizace ale nejspíše jen využívá letitého konfliktu mezi kočovnými pastevcí a usedlými zemědělci a snaží se do svých akcí rekrutovat právě mladé fulbské muslimy (McGregor, 2014).

4.1.3. Populační genetika Fulbů

Populační genetika poskytuje důležitý zdroj informací o dávných, ale i méně dávných migracích populací a o jejich míšení. Uniparentální lokusy: mtDNA a Y chromozom, přesněji řečeno nerekombinantní část Y chromozomu (z angl. *non-recombinig region of the Y chromosome*, NRY), tvoří významnou část evolučně-genetických studií lidských populací. Tyto lokusy reprezentují maternální (mtDNA) a paternální (NRY) populační historii. Nevýhodou ovšem je, že snáze podléhají selekci (selekční tlak zasáhne celý lokus) i genetickému driftu, protože mají menší efektivní velikost populace (N_e) v porovnání s autozomy. Je tedy důležité kombinovat jak analýzy mtDNA, tak NRY nejlépe i s autozomálními daty (Scheinfeldt et al., 2010). Jako autozomální markery se používají například transponovatelné elementy, tzv. Alu inzerce, které se hojně vyskytují v lidském genomu (Batzer et al., 1994). Zmodernizování sekvenačních metod, přesněji sekvenování třetí generace a použití DNA čipů již umožňuje i celogenomové studie (Triska et al., 2015).

Výše uvedené genetické markery byly použity i na fulbskou populaci za účelem odhalení oblasti jejich původu. Starší studie se zaměřily zejména na mtDNA, která dokazuje, že většina fulbských haploskupin je západoafrického původu, což odpovídá místu jejich dnešního majoritního výskytu (Černý et al., 2006). Na druhé straně v genofondu Fulbů na rozdíl od usedlých populací sahelu je zvýšená přítomnost eurasijských haploskupin, které poukazují na původ v severní Africe, nebo v západní Eurasii (Cerezo et al., 2011; Černý et al., 2011b, 2006; Rosa et al., 2004). Další výstupy z analýzy mtDNA značí, že pastevecké skupiny Fulbů, i když jsou vzdálené několik tisíců kilometrů, spolu sdílejí většinu mtDNA haplotypů a v porovnání se zemědělskými populacemi jsou celkově více homogenní. Tento fenomén lze vysvětlit přítomností silného genového toku mezi Fulby v rámci sahelu, nebo společnými ancestrálními haplotypy všech Fulbů, které po rozšíření jejich sub-populací do sahelu nebyly zasaženy genetickým driftem, nebo pouze minimálně (Černý et al., 2011b).

Co se týče NRY, tak práce Černý et al. (2011b) ukazuje, že v porovnání s usedlými populacemi sahelu mají Fulbové mnohem větší genofond. Toto je možné vysvětlit větší ancestrální populací pastevců než zemědělců. Opačně je to ale u mtDNA, kde je genofond u Fulbů diverzifikovaný méně než u zemědělců, což je vysvětlováno možným recentním efektem hrdla láhve u ženské populace Fulbů (Černý et al., 2011b).

Analýza NRY ukázala, že nejvíce zastoupená u Fulbů je africká haploskupina E, jejíž subklady se vyskytují jak u západoafrických, tak u východoafrických populací. Stejně jako v případě mtDNA je i zde znatelná eurasijská komponenta zastoupená haploskupinou R1b, která se do sahelu dostala zřejmě ze severní Afriky (Bučková et al., 2013). Studie Hassan et al. (2008) poukazuje spíše na východoafrický či středoafriický původ Fulbů, což ale může být v tomto případě dáno pouze malým množstvím zkoumaných vzorků, které navíc pocházejí pouze ze Súdánu.

K výsledkům této studie se ovšem přiklání i Zuzana Fajkošová ve své diplomové práci, kterou vypracovala na Katedře antropologie a genetiky člověka PŘF UK. Analýzou Alu inzercí u sahelských populací prokázala větší spřízněnost Fulbů se Somálci než s geograficky blíže situovanými populacemi, což předpokládá východoafrickou komponentu Fulbů, nebo severovýchodní, pokud se tyto dvě nomádské populace formovaly v oblasti Sahary během klimaticky příznivých období (Fajkošová, 2012).

Studie Tishkoff et al. (2009) zkoumala 1 327 mikrosatelitů a markerů typu inserce/delece u Afričanů a Afroameričanů. Z genetického hlediska tato práce identifikovala 14 ancestrálních populačních seskupení (klastřů), které docela dobře

odpovídají zařazení jedinců do etnických a lingvistických skupin. Některé populace ovšem představovaly směs jednotlivých ancestrálních populací, což ukazuje na rozsáhlé migrace lidských populací v minulosti. Jednou z nich jsou i Fulbové, u kterých nebylo možné definitivně určit, odkud pocházejí. I když byli zařazeni spíše k populacím z Čadu a Súdánu mluvícím různými jazyky z afroasijské či nilosaharské jazykové rodiny, tak se ukázal v menší míře i jejich eurasijský/středovýchodní původ, ale také určité sdílení genetické informace s nigerokonžskou jazykovou rodinou.

Celogenomová studie Triska et al. (2015) potvrzuje výsledky publikované v práci Tishkoff et al. (2009) do té míry, že ukazuje na smíšení jednotlivých ancestrálních populací u Fulbů. Největší zastoupení má přímořská západoafrická komponenta (až 55%), dále severoafrická/eurasijská (23%), východoafrická (11%) a zbytek je tvořen arabskou a středozápadní africkou komponentou. Triska et al. (2015) předpokládá severoafrickou komponentu jako původní fulbskou a následný genový tok do fulbského genofond je dán migrací ze západní do střední Afriky.

Práce Triska et al. (2015) zkoumala i signál pozitivní selekce v rámci sahelských populací. U Fulbů byl zjištěn v některých genech *TAS2R* (z angl. *Taste 2 Receptors*). Ty jsou zodpovědné za tvorbu chuťových receptorů detekujících hořkou chuť, což může přispět k zabránění požití toxinů vyskytujících se ve volně žijících rostlinách (Kim et al., 2005). Geny této *TAS2R* rodiny se nacházejí na chromozomu 12 a selektované alely jsou neafrického původu (Triska et al., 2015).

Za zmínku stojí i zvýšená odolnost Fulbů vůči malárii v porovnání s ostatními etniky žijícími na stejném území. Byla u nich zjištěna nižší parazitémie a silnější humorální imunitní odpověď (Modiano et al., 1996). Stále ale není jasné, proč je tomu tak (Boström et al., 2012). Recentní výzkum je zaměřen na hledání imunogenů a jejich mutantních alel zodpovědných za tuto vlastnost (Cherif et al., 2016).

Fulbové jsou zkoumáni i v souvislosti se vznikem laktázové persistence, která se u nich rozšířila s potřebou trávení mléčného cukru, laktózy jako zdroje energie v dospělosti (Ranciaro et al., 2014). Diskutována byla také spojitost laktázové persistence s odolností proti malárii. Studie Lokki et al. (2011) ukázala, že Fulbové, kteří nebyli nositeli alely pro laktázovou persistenci, byli nakaženi parazitem *Plasmodium falciparum* častěji než ti, kteří alelu pro laktázovou perzistenci nesli. Je třeba ale doplnit, že tyto výsledky nebyly statisticky signifikantní.

5. Mitochondriální DNA

V cytoplasmě eukaryotních buněk se nachází semiautonomní organely – mitochondrie, které nesou svoji vlastní genetickou informaci – mtDNA. Předchůdci dnešních mitochondrií (bakterie) se do primitivní eukaryotní buňky dostali před 2 miliardami let, kdy se v atmosféře Země objevil kyslík. Některé bakterie byly schopné tento kyslík využívat, ale pro jiné organismy byl toxický. Východiskem byla endosymbióza primitivních eukaryotních buněk s těmito bakteriemi, která jim zajistila přežití. I když dnes už je většina mitochondriálního genomu přesunuta do jaderné DNA, mitochondrie pořád zůstávají nenahraditelným energetickým centrem buňky.

Zastoupení mitochondrií v buňce se liší dle tkáně. Buňky energeticky náročných tkání (např. svalová, nervová tkáň) a také i oocyty jich obsahují tisíce, ty méně energeticky náročné jen stovky. Počet kopií mtDNA v lidské mitochondrii je 1–10 (Jobling et al., 2014). Díky tomuto velkému počtu se mtDNA na rozdíl od jaderné DNA lépe izoluje a následně lépe amplifikuje. Tohoto využívaly i dřívější studie založené na izolaci DNA z kostí (Pääbo et al., 1989).

Všechny mtDNA molekuly v rámci buňky, tkáně nebo v rámci více tkání jednoho jedince nemusí být vždy identické. Mohou se lišit délkou nebo bodovou mutací. Takovýto stav se nazývá heteroplazmie. Odhalit heteroplazmii je poměrně náročné, protože mutované mtDNA jsou přítomné pouze ve velmi malém množství. Detekce Sangerovým sekvenováním je možná, pokud jejich počet přesahuje 10% (Jobling et al., 2014).

Lidská mtDNA je kruhová molekula tvořená dvěma vlákny, která se liší zastoupením dusíkatých bází: guaninu (G) a cytosinu (C). Vlákno bohaté na G báze se nazývá těžké a vlákno s převahou C báze je nazýváno lehké. MtDNA je dlouhá 16569³ párů bází (z angl. *base pair*, bp) a skládá se z kratší nekódující (kontrolní) a delší kódující oblasti. Kontrolní oblast leží mezi pozicemi určenými rCRS jako 16 024–16 569 a pokračuje od pozice 1 do 576. Obsahuje replikační počátek, odkud se replikuje celá mtDNA najednou. Tato oblast je také složená z dvou hypervariabilních segmentů: HVS-I a HVS-II, které mohou obsahovat větší počet mutací než zbytek molekuly. Kódující oblast pojímá 37 genů, které nemají introny, ale mohou se vzájemně překrývat. Tyto geny kódují transferovou RNA (tRNA), ribozomální RNA (rRNA) a proteiny podílející se na oxidativní fosforylaci a syntéze

³ Délka revidované tzv. Cambridžské referenční sekvence mitochondriální DNA (z angl. *revised Cambridge reference sequence*, rCRS) dle Andrews et al. (1999) určuje každé bázi jasně stanovenou pozici mezi čísly 1 až 16569.

mitochondriálních proteinů. Genetický kód mitochondriální DNA se mírně liší od kódu jaderné DNA (Anderson et al., 1981).

MtDNA je haploidní lokus, je přítomná v jedné kopii u obou pohlaví, ale dědí se jenom maternálně, to znamená, že potomci obou pohlaví zdědí z matčiny strany tu samou mateřskou mtDNA (Giles et al., 1980). Pohyblivost bičíku spermie je založená na tvorbě ATP v mitochondriích, čímž vznikají volné kyslíkové radikály způsobující mutace v mtDNA spermií. Dle Allen and Paula (2013) a Paula et al. (2013) je mtDNA vajíčka proti tomu chráněna – mitochondrie oocytů jsou v stavu snížené aktivity nebo úplně inaktivní, takže nedochází k poškození mateřské mtDNA. Z tohoto důvodu dochází v embryogenezi po několika buněčných děleních k destrukci paternální mtDNA. Pokud se tak nestane, obvykle dochází k patologiím (Schwartz and Vissing, 2002).

MtDNA mutuje desetkrát rychleji než jaderná DNA (Brown et al., 1979). Jako důvod se uvádí větší čas strávený v jednořetězcové podobě, více replikací za jednotku času, absence histonů a její vystavení volným kyslíkovým radikálům (Jobling et al., 2014). Pokud jsou skutečně mitochondrie oocytů inaktivní (Allen and Paula, 2013; Paula et al., 2013), pak vznik mutací mtDNA musí probíhat už v embryogenezi během formování germinální linie nebo během oogeneze (či folikulogeneze), kdy dochází k nárůstu počtu mitochondrií.

Vyšší mutabilita, uniparentální dědičnost (Giles et al., 1980), velký počet kopií a to, že mtDNA nerekombinuje (Olivo et al., 1983), ji předurčují pro studium lidské evoluční historie podle mateřské linie.

5.1. Fylogenetika mtDNA

Přestože byl termín fylogeneze vytvořen k popisu evolučních vztahů mezi druhy, v případě člověka (jednoho druhu) je tento pojem používán také. Jedná se o tzv. vnitrodruhové fylogeneze specifických většinou uniparentálních lokusů (Bandelt et al., 1999).

Velká diverzita mtDNA sekvencí v rámci lidské populace je dána mutacemi (insertce, delece, substituce), které se v této molekule během času nahromadily (van Oven and Kayser, 2009). Vzniklé kombinace alel, jež jsou přenášeny společně, se nazývají haplotypy. Skupiny příbuzných haplotypů se řadí do haploskupin, které vytvářejí uzly fylogenetického stromu – společného předka daných haplotypů. Všechny tyto uzly se postupně sbíhají až k poslednímu společnému předkovi (z angl. *the Most Recent Common*

Ancestor, MRCA) všech dnešních mtDNA haplotypů, tzv. „mitochondriální Evě“, která tvoří kořen fylogenetického stromu (Rosenberg and Nordborg, 2002).

Při výpočtu či rekonstrukci MRCA lze rovněž použít metodu koalescence neboli genovou genealogii, jejíž výsledek je fylogenetickému stromu v jistých ohledech podobný, ale hlavní rozdíl je v tom, že taková metoda neupřednostňuje jen jednu cestu, která by evoluční historii reprezentovala (Rosenberg and Nordborg, 2002). Výhodou takového přístupu je pak možnost testování značně komplexních evolučních modelů bez podmínky jediné fylogenetické rekonstrukce (Stoneking and Krause, 2011).

Nejčastějším způsobem sestavení fylogenetického stromu je využití maximální úspornosti (z angl. *Maximum Parsimony*, MP). To znamená, že je potřeba využít co nejmenší počet kroků, abychom se dostali k námi pozorovaným mutacím v haplotypech odvozených od ancestrálního haplotypu. Sdílení stejných mutací je tedy vysvětleno jejich společným původem. Může ale dojít i ke konvergentní evoluci, což znamená, že i když jsou mutace ve dvou, nebo vícero haplotypech stejné, nemají společného předka – jsou shodné stavem, ale ne původem (Jobling et al., 2014; Macholán, 2014). Jedná se například o evolučně horká místa (z angl. *hotspots*), kde mutace vznikají častěji (např. na pozicích 146, 150, 152, 3010, 5460, 16189, 16519 vzhledem k rCRS). Toto je nutné brát do úvahy při konstrukci fylogenetického stromu, případně některé *hotspots* mutace vyloučit úplně (například inserce v pozicích 309.1C, 315.1C, substituci v pozici 16519) (Galtier et al., 2006; Soares et al., 2009; van Oven and Kayser, 2009).

První kompletně osekvenovaná lidská mtDNA je dnes využívána jako referenční sekvence rCRS (Anderson et al., 1981; Andrews et al., 1999). Nově osekvenované lidské mitochondriální genomy jsou s ní porovnávány, a detekované mutace jsou tedy odlišnosti od rCRS. Referenční sekvence ale není výše zmiňovaná „mitochondriální Eva“ (MRCA všech lidských mtDNA haplotypů). Jedná se o relativně recentně vzniklý eurasijský haplotyp klasifikovaný do haploskupiny H2a2a1 (van Oven and Kayser, 2009). A proto porovnáním mitochondriálních genomů s rCRS zjistíme pouze mutace vzhledem k rCRS, ale nedozvíme se, jak se daná pozice změnila v evoluci. Z tohoto důvodu Behar et al. (2012) navrhli přeuspořádaný fylogenetický strom lidské mtDNA, kde rekonstruoval MRCA všech haplotypů lidských mtDNA, k čemu využil i dostupné mitochondriální genomy *Homo neanderthalensis*. Vzniklá referenční sekvence s názvem rekonstruovaná sapientní referenční sekvence (z angl. *Reconstructed Sapiens Reference Sequence*, RSRS) tvoří tedy nejpravděpodobnější kořen fylogenetického stromu (Behar et al., 2012).

Přestože RSRS odráží nejpravděpodobnější stav posledního společného předka, objevily se názory, že pro fylogenetické rekonstrukce a výpočty nijak zvlášť nepřispívá (Bandelt et al., 2014). Z historického hlediska (využití různými programy) je rCRS stále využívána jako referenční sekvence (Kloss-Brandstätter et al., 2011). Nejčastěji používaný fylogenetický strom je z databáze PhyloTree_{mt} – Build 17 z 18. února 2016, je sestavený z 24 275 kompletních lidských mtDNA sekvencí a vytváří více než 5 400 haploskupin (van Oven and Kayser, 2009).

Ne vždy bývají pro rekonstrukci fylogeneze mtDNA použity celé mitochondriální genomy. Jelikož kontrolní úsek mutuje rychleji než zbytek molekuly (akumuluje více mutací), častokrát je využíván pouze ten, přesněji HVS-I, případně i HVS-II. Tato klasifikace ale nemusí ve všech případech odpovídat klasifikaci dle celého mitochondriálního genomu (Ingman et al., 2000; van Oven and Kayser, 2009).

Jednotlivé klady fylogenetického stromu je možné rekonstruovat v čase a prostoru. Jinými slovy, je možné zjišťovat geografické rozložení konkrétních haploskupin (v minulosti i součastnosti), čemuž se věnuje fylogeografie (Awise, 2000; Hickerson et al., 2010), a také je možné tyto haploskupiny datovat použitím rozličných metod.

5.2. Datování mtDNA haploskupin

Datování mtDNA haploskupin je založeno na převedení jejich genetické diverzity do času. Pro tento účel je možné kromě striktních fylogenetických stromů použít také mediánní sítě, tzv. networky, jejichž výhodou je to, že vyjadřují množství stejně platných fylogenetických stromů (Bandelt et al., 1999, 1995). K výpočtu stáří těchto sítí nebo stromů, jinými slovy k výpočtu MRCA se využívá tzv. *ρ* statistika, která pracuje na principu molekulárních hodin, jež předpokládají neměnnou mutační rychlost v rámci všech kladů. *ρ* statistika zjišťuje průměrný počet nukleotidových rozdílů mezi kořenovým, neboli ancestrálním haplotypem a všemi haplotypy z něj vycházejícími. Tato míra sekvenční divergence je pak přenesena do času za pomoci mutační rychlosti mtDNA s určitou standardní chybou (Forster et al., 1996; Saillard et al., 2000; Soares et al., 2009). Celkově lze říci, že *ρ* statistika vykazuje přesnější výsledky při datování starších událostí (Jobling et al., 2014).

Další metoda, která se využívá na datování mtDNA haploskupin, je statistická metoda maximální pravděpodobnosti (z angl. *Maximum Likelihood*, ML). Je založená na porovnávání změn parametrů v rámci jednoho modelu, nebo porovnávání více modelů

mezi sebou a identifikaci modelu s největší pravděpodobností výskytu (Jobling et al., 2014).

Při datování se ML používá na určení délky větvi (genetické distance), která je pak stejně jako při r_o statistice přenesena do času za použití mutační rychlosti. Nicméně při určování genetických vzdáleností poskytuje flexibilnější nastavení parametrů, jako je například různý poměr tranzicí k transverzím, nebo různé zastoupení bazí v jednotlivých lokusech (Yang, 2007, 1997, 1994). Do analýzy se rovněž přidávají větve z jiného než analyzovaného stromu a klady jsou pak porovnávány s těmito „vnějšími“ větvemi. Pokud je rychlost vzniku mutací (využívají se pouze substituce) konstantní, genetické vzdálenosti jsou stejné. Pokud ne, používaný program by měl toto zanést do výpočtu délky větvi (Jobling et al., 2014).

ML umožňuje i použití tzv. uvolněných molekulárních hodin (z angl. *Relaxed Molecular Clock*), známé i pod názvem lokální molekulární hodiny (z angl. *Local Molecular Clock*), což znamená, že mutační rychlosti mezi větvemi fylogenetického stromu se liší, a stejně tak se liší i mutační rychlosti mezi jednotlivými úseky studované molekuly (Yang, 2007; Yoder and Yang, 2000). Uvolněné molekulární hodiny využívá zejména bayesovská statistika (Endicott and Ho, 2008).

Jak vyplývá z textu v této kapitole, tak kromě zjištění sekvenční divergence pomocí různých statistik, je pro datování také velmi důležitá mutační rychlost. Proto je následující kapitola zaměřena na odhad mutační rychlosti.

5.2.1. Odhad mutační rychlost mtDNA

Spontánní mutace v DNA jsou výsledkem chyb polymerázy při replikaci DNA, neopravení chyb reparačními systémy, pohybem transponovaných elementů v DNA (Barrick and Lenski, 2013), výše zmiňovanou přítomností přirozených mutagenních radikálů (Jobling et al., 2014; Paula et al., 2013) atd.

Je možné zjišťovat, kolik mutací vznikne za jednotku času, tedy odhadovat mutační rychlost. Pro tento účel se v případě mtDNA využívají pouze substituce (transverze a tranzice). Pokud je evoluce neutrální, mutační rychlost je rovna rychlosti evoluční (Kimura, 1984) – rychlost, kterou mutace vznikají, je shodná s rychlostí, kterou se v genomu fixují.

Mutační rychlost lze odhadovat fylogenetickým postupem na základě externího kalibračního bodu, většinou se jedná o oddělení předků člověka a šimpanze, nebo interního kalibračního bodu, což může být nějaká novější událost v evoluci člověka, která se dá

dobře datovat za pomoci archeologických dokladů nebo změny klimatických podmínek (například znovu osídlování Evropy po LGM, což je spojeno se vznikem haploskupin H1 a H3) (Endicott and Ho, 2008). Ovšem můžeme ji odhadovat i z rodokmenů, což znamená, že spočítáme mutace, které vznikly za jednu generaci (rozdíl v počtu mutací mezi rodičem a potomkem) (Heyer et al., 2001). Takto určená mutační rychlost ale většinou vychází vyšší (výrazně vyšší je zejména v hypervariabilních úsecích) než mutační rychlost určená na základě fylogenetického postupu s kalibračními body. Důvodem je vznik mírně škodlivých mutací, které přechodně zvyšují mutační rychlost v rodokmenové analýze (a celkově v mladších větvích fylogenetického stromu), ale postupem času jsou odstraněny vlivem purifikační selekce (Ho et al., 2011; Soares et al., 2009). Tímto lze také vysvětlit, proč se ve starších větvích fylogenetického stromu nachází více synonymních mutací (na něž purifikační selekce nepůsobí), než v mladších, kde se vyskytují v genech kódujících proteiny a RNA nesynonymní mutace ve větší míře (Kivisild et al., 2006). Toto může mít vliv na nadhodnocení věku mladých haploskupin fylogenetického stromu (Soares et al., 2009). Na druhé straně, test selekční neutrality v práci Kivisild et al. (2006) ukázal na existenci pozitivní selekce v některých *hotspots* v genech kódujících proteiny, což se také projevuje zvýšením poměru nesynonymních a synonymních mutací.

Odhady mutační rychlosti dle Kivisild et al. (2006) a Mishmar et al. (2003) jsou založené pouze na kódujícím úseku mtDNA, jelikož v kontrolním úseku, který je u většiny haploskupin charakterizován velkým počtem mutací (hlavně v HVS-I a HVS-II úsecích), dochází ke konvergentní evoluci a zřejmě i k vícečetným mutacím v jedné pozici v rámci *hotspots*, které je problematické detekovat, protože nezvyšují sekvenční divergenci. Na druhé straně kontrolní úsek nese asi třetinu celkové variability mitochondriální DNA, a jeho využitím je možno zpřesnit datování haploskupin. A proto Soares et al. (2009) určovali mutační rychlost i kontrolního segmentu. Kontrolní segment obsahuje určité *hotspots*, jež mutují nejrychleji z celého mitochondriálního genomu, a proto u něj byla zjištěna mutační rychlost 1,55krát vyšší než v kódujícím segmentu. Ovšem po vyřadění *hotspots* je mutační rychlost kontrolního a kódujícího úseku přibližně stejná (Soares et al., 2009).

Soares et al. (2009) tedy zohledňuje v odhadu mutační rychlosti fakt, že jednotlivé úseky mitochondriálního genomu nemutují stejnou rychlostí, a to nejenom v rámci kontrolního a kódujícího úseku, ale například i v rámci pozic tripletu. Kromě toho přikládá důraz purifikační selekci v kódujícím segmentu, kterou v dřívějších publikacích někteří

autoři nebrali při odhadu do úvahy (Mishmar et al., 2003), nebo využili pouze synonymní mutace (Kivisild et al., 2006).

V tabulce č. 1 jsou uvedeny odhady mtDNA mutačních rychlostí zmiňovaných prací Soares et al. (2009), Kivisild et al. (2006) a Mishmar et al. (2003) určené za použití externího kalibračního bodu (oddělení předků šimpanze a člověka), dále odhad dle Ho and Endicott (2008) s interní kalibrací (stáří MRCA haploskupiny P a stáří MRCA haploskupin H1 a H3), odhad z rodokmenů ze studie Heyer et al. (2001) a nakonec odhad mutační rychlosti na základě DNA z archeologických vzorků (z angl. *ancient DNA*, aDNA) datovaných pomocí radiokarbonové metody (Fu et al., 2013).

Tabulka 1: Odhady mutačních rychlostí různých úseků mtDNA (substituce/bp/rok x 10⁻⁸)

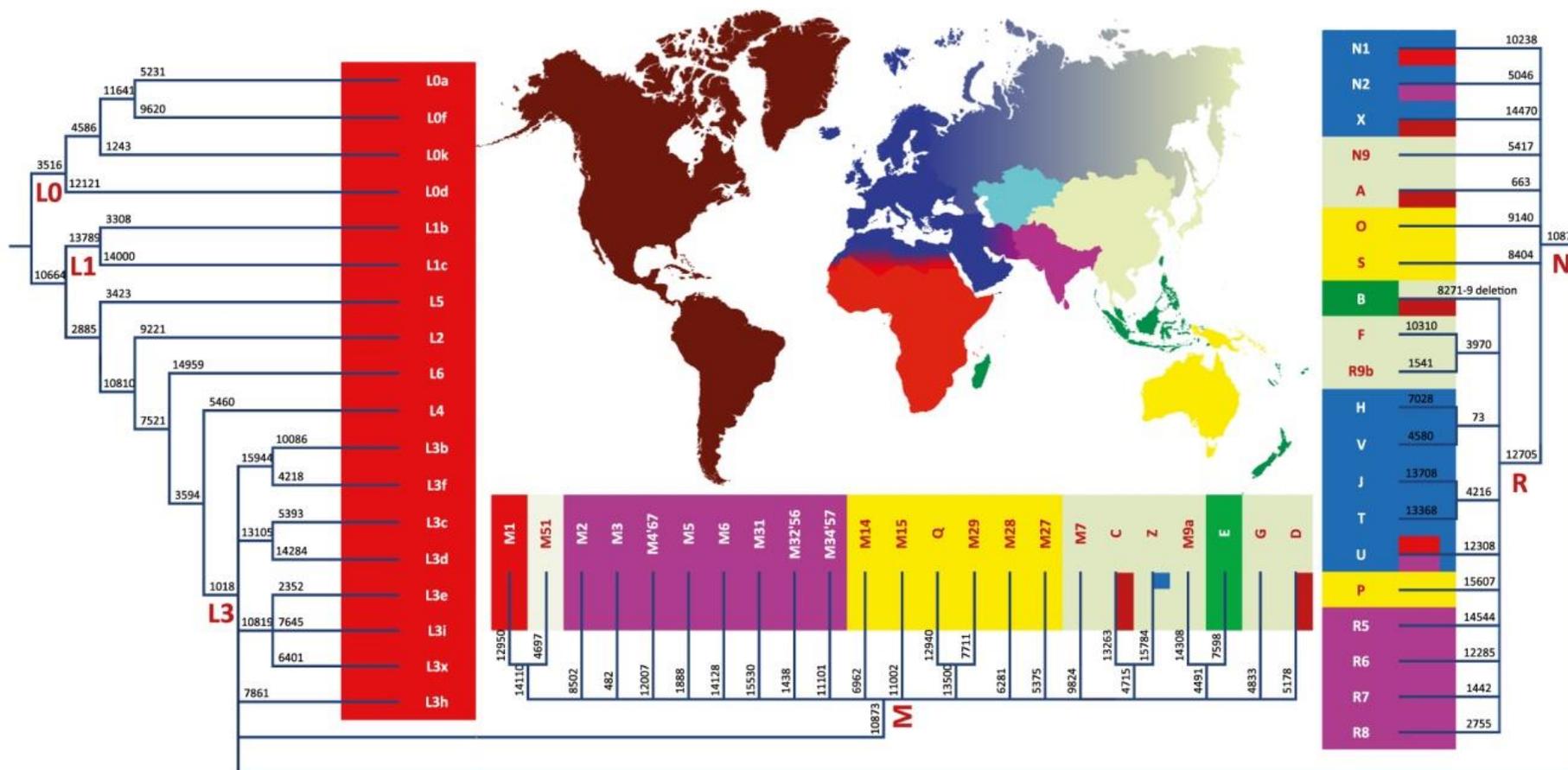
Publikace	mtDNA	Kódující Úsek	Synonymní mutace	HVS-I	HVS-II	Kontrolní úsek
Soares et al. 2009	1,67	1,71	-	16,4	22,9	12,3
Kivisild et al. 2006	-	-	3,41	-	-	-
Mishmar et al. 2003	-	1,26	-	-	-	-
Ho and Endicott 2008	-	2,04	-	-	-	-
Heyer et al. 2001	-	-	-	39	-	-
Fu et al. 2013	2,67	1,57	-	-	-	-

5.3. Rozšíření mtDNA haploskupin

Jak již bylo v této práci dříve zmíněno, všechny dnešní mtDNA mají společného předka – ancestrální haplotyp, tzv. „mitochondriální Evu“. Jelikož mtDNA má největší diverzitu v Africe, předpokládá se, že její původ je právě tam (Behar et al., 2008b). Přesně určit region jejího vzniku v Africe je ale poněkud náročné. Nejstarší nález fosílií AMČ ukazuje na východní, či jihovýchodní Afriku (McDougall et al., 2005). Fylogeografie mtDNA, přesněji divergence z ancestrálního haplotypu, naznačuje spíše původ ve střední Africe (Behar et al., 2012; Rito et al., 2013). K tomuto se přiklání i distribuce parazitů specializujících se na člověka, která předpokládá jejich rozložení v střední a západní Africe, což je interpretováno původem AMČ v této oblasti (Ashford, 2000). Rito et al. (2013) datovali MRCA všech dnešních mtDNA na dobu před cca 180 000 lety. K oddělení

dvou větví z něj vycházejících došlo cca před 130 000 lety (Rito et al., 2013). Jedná se o L0 větev na jihu, jenž dnes zahrnuje především khoisanské populace a dále společnou větev haploskupin L1, L2, L3, L4, L5 a L6 (označovanou L1'6) původně ve střední a východní Africe, ze které vychází mtDNA haplotypy ostatních včetně neafrických populací (Behar et al., 2008b; Mishmar et al., 2003; Torroni et al., 2006), jak ukazuje obrázek č. 2.

Názvosloví mitochondriálních haploskupin zavedl v roce 1993 Antonio Torroni v publikaci zaměřené na mtDNA amerických indiánů. Jejich haplotypy klasifikoval do haploskupin A, B, C a D (Torroni et al., 1993) a brzy poté přibývaly další. S rozšiřujícím se počtem osekvenových mtDNA bylo nutné zavést i subklady haploskupin, označované střídáním číselných a písemných hodnot (Černý and Pereira, 2014).



Obrázek 2: Fylogenetický strom hlavních lidských mtDNA haploskupin a jejich geografické rozložení. Názvy haploskupin odpovídají názvosloví v databázi PhyloTree_{mt} (van Oven and Kayser, 2009). V každé větvi je zobrazena pouze jedna mutace (přednostně z kódujícího úseku), která ji definuje (Kivisild, 2015)

5.3.1. Subsaharské mtDNA haploskupiny

Subsaharské haploskupiny jsou zastoupeny sedmi hlavními větvemi L0 – L6 (Černý and Pereira, 2014). Haploskupina L0 se dále dělí do subkladů L0a, L0b, L0d, L0f a L0k. Jako první od společné větve divergoval subklad L0d a následně L0k. Ty se dnes vyskytují převážně v jižní Africe u lovců-sběračů khoisanské jazykové rodiny, nebo v menší míře u populací Tanzanie a Angoly (Barbieri et al., 2013). Původ větve L0a' b' f' je předpokládán spíše ve východní Africe před 90 000–95 000 lety. Subklad L0f se dnes vyskytuje převážně v Tanzanii a Angole. L0a je nejmladším a nejvíce rozšířeným subkladem haploskupiny L0. Je přítomen v západní, střední, jižní a severní Africe a také v oblasti Blízkého východu (Rito et al., 2013). L0a2 linie se podílela na expanzi bantuských jazyků směrem na jih před 3 000 lety (Rosa and Brehem, 2010).

Haploskupina L1 je tvořena subklady L1b a L1c. Starší L1c subklad je zastoupen zejména v střední a západní/jihozápadní Africe. Nositeli jsou lovci-sběrači tropických deštných pralesů, tzv. pygmejové a zemědělci z bantuské jazykové rodiny. Předpokládá se, že tyto dvě skupiny pocházejí ze společné ancestrální populace v střední Africe. Ta začala divergovat před cca 70 000 lety, kdy se oddělily západní a východní populace pygmejů (Quintana-Murci et al., 2008). Mladší subklad L1b je orientovaný do západní a střední Afriky a podél pobřeží přechází i na sever Afriky (Salas et al., 2002). Ve větší míře se vyskytuje u Fulbů (Černý et al., 2006) a dalších západoafrických populací jako jsou Mandekové, Wolofové a Temnové (Jackson et al., 2005). Za zmínku stojí i vyšší zastoupení u Afroameričanů dané významem západního pobřeží Afriky při obchodu otroky (Salas et al., 2004).

Haploskupiny L2 a L3 tvoří 70% subsaharských mtDNA (Rosa and Brehem, 2010). Nejvíce zastoupeným subkladem Afriky je L2a. Ten je rozšířený na celém území Afriky (i u Afroameričanů), a proto je těžké věrohodně určit původ tohoto subkladu (Salas et al., 2002). Vznik haploskupiny L3 je předpokládán ve východní Africe (Behar et al., 2008b; Kivisild et al., 2006; Salas et al., 2002; Soares et al., 2012), což je dokládáno přítomností větví L3a a L3h a původem subkladů L3eikx a L3f v této oblasti. Diverzifikace a expanze haploskupiny L3 je datována před 60 000–70 000 lety, s následnou migrací AMČ z Afriky a vznikem ne-afrických haploskupin M a N v oblasti Eurasie. Migrace AMČ probíhala i na území samotné Afriky: v rozmezí před 35 000–60 000 lety byly subklady L3bd a L3e zavedeny do střední Afriky. Další velká expanze L3 je datována do období holocénu, zahrnující i bantuskou expanzi před 2 000–3 000 lety (Soares et al., 2012).

Haploskupiny L4, L5 a L6 jsou zastoupeny v Africe v poměrně nízké frekvenci. Jejich oblast výskytu se navíc překrývá, všechny jsou přítomné především ve východní Africe (Fernandes et al., 2015; Kivisild et al., 2004). Haploskupina L5⁴ se nachází v Egyptě, Súdánu, Keni, Tanzanii, Etiopii ale i u západních pygmejů (Quintana-Murci et al., 2008; Salas et al., 2002). Její oddělení ze společné větve L2'3'4'5'6 bylo datováno do období před 120 000–140 000 lety (Behar et al., 2008b; Soares et al., 2009). Haploskupiny L4 a L6 jsou fylogeneticky blízké haploskupině L3 a obě se vyskytují jak ve východní Africe, tak na Arabském poloostrově. L6 je četná v Etiopii a Somálsku, zastoupena je ale i v Jemenu, kam byla zanesena velice brzy po svém vzniku (cca před 23 100 lety). L4 je kromě Etiopie a Somálska rozšířena i v okolních státech jako je Keňa, Tanzanie, Kongo a vyskytuje se i na Blízkém východě. Její oddělení od L3 je datované do období před cca 87 000 lety (Fernandes et al., 2015). Práce Fernandes et al. (2015) ukázala, že přítomnost L4 na Arabském poloostrově není spojená s migrací *out-of-Africa* haploskupiny L3, ale jedná se o recentnější genový tok.

5.3.2. Eurasijské mtDNA haploskupiny v Africe

Haploskupiny M a N vzniklé oddělením od L3, jsou základem pro všechny eurasijské haploskupiny (Metspalu et al., 2004; Quintana-Murci et al., 1999), které se dále šířily do Austrálie a Oceánie (Hudjashov et al., 2007; Soares et al., 2011) a později i do Ameriky (Tamm et al., 2007) (viz. Obrázek č. 2). Kromě toho se ovšem některé jejich klady dostaly zpětnou migrací do Afriky, především do její severní části, ale některé z nich pronikly i dále pod Saharu.

Haploskupina M je rozšířená zejména na jihu a východě Eurasie, čím opisuje migraci AMČ z Afriky přes jih Arabského poloostrova v období pozdního pleistocénu (Metspalu et al., 2004; Olivieri et al., 2006; Quintana-Murci et al., 1999). Tato haploskupina se ve zvýšené míře vyskytuje i ve východní Africe, a dále také v severní Africe, kde kopíruje pobřeží Středozemního moře. Autoři dřívějších publikací se proto domnívali, že divergovala už na území Afriky a posléze se šířila do Eurasie (Quintana-Murci et al., 1999). Pozdější studie ovšem ukázaly, že její subklady v Eurasii jsou starší než subklad v Africe označovaný jako M1, což dokládá zpětnou migraci AMČ do Afriky (González et al., 2007; Olivieri et al., 2006; Pennarun et al., 2012). Olivieri et al. (2006) tuto migraci

⁴ V práci Salas et al. (2002) je označena jako L1e.

datovali do období před 40 000–45 000 lety, kdy došlo ke zlepšení klimatických podmínek.

González et al. (2007) rozdělili africkou M1 podle přítomných mutací do třech subkladů: M1a, M1b a M1c⁵. Subklad M1a je nejfrekventovanější a nejdiverzifikovanější ve východní Africe a Etiopii, ale zastoupen je také na celém území výskytu M1. M1b se vyskytuje ve východní Africe, ale majoritní zastoupení má v Etiopii. Subklad M1c je rozšířen na severozápadě Afriky a v přilehlých oblastech podél Středozevního moře až do oblasti Blízkého východu, zastoupen je i na Pyrenejském poloostrově. Stáří M1c bylo určeno dle González et al. (2007) na $19\,040 \pm 4\,916$ let, což je více než u M1a ($16\,756 \pm 5\,997$ let). Autoři publikace se tudíž domnívají, že zpětná migrace AMČ proběhla přes Sinajský poloostrov před 20 000 až 30 000 lety, čímž nezasáhla Etiopii (kde je dnes M1 nejrozšířenější) a haploskupina M1 nejdříve expandovala v severní Africe až do oblasti Pyrenejského poloostrova (González et al., 2007). I když stáří haploskupiny M1 bylo dle Pennarun et al. (2012) určeno přibližně ve stejném časovém rozmezí, autoři této studie popírají možnost definovat geografický původ zakladatelského haplotypu M1, a tím potvrdit hypotézu studie González et al. (2007).

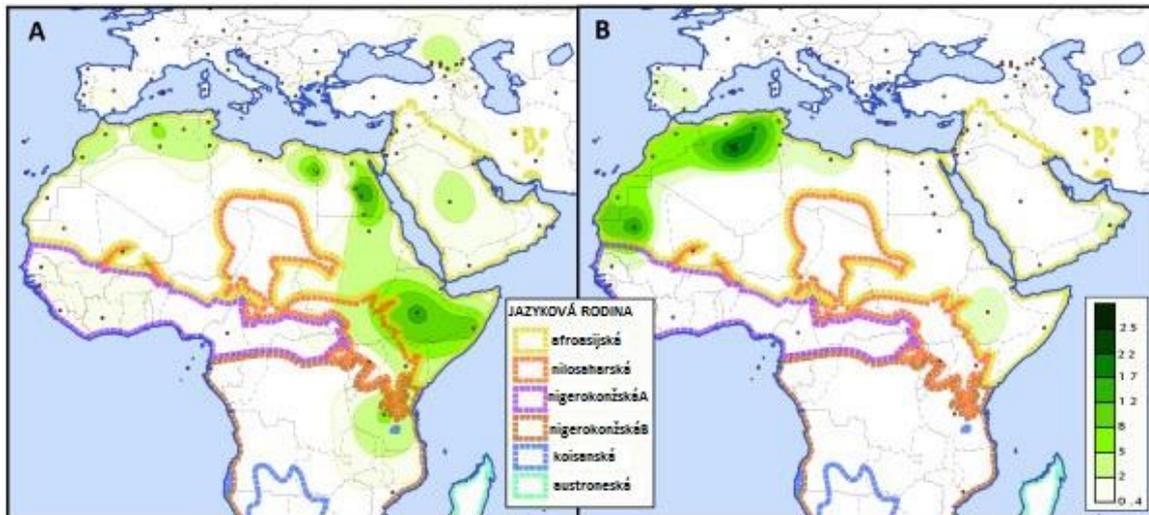
Výskyt haploskupiny M1 je prokázán i u pastevecké populace Tuaregů, kteří kočovali přes Saharu, a tím zajišťovali propojení populací v oblasti Středozevního moře na severu Afriky a subsaharských populací sahelu. Asi polovinu jejich genofondu tvoří eurasijské haploskupiny H1, H3, V a M1, což podporuje hypotézu o původu Tuaregů v severní Africe. Datování subkladu M1a2a do doby před $8\,000 \pm 2\,400$ lety svrchu ohraničuje časový interval migrace Tuaregů do sahelu (Pereira et al., 2010a).

Na rozdíl od haploskupiny M, haploskupina N (a z ní vycházející R haploskupina) a její subklady jsou rozšířené v celé Eurasii, včetně Evropy (viz. Obrázek č. 2). Z haploskupiny R divergovala haploskupina U, která je dnes hojně rozšířená od Evropy až po Indii včetně střední Asie. Její subklad U6 má majoritní zastoupení v severní Africe (González et al., 2007; Metspalu et al., 2004; Pennarun et al., 2012; Secher et al., 2014). Jeho nejvíce diversifikovaný subklad představuje U6a. Ten je přítomný zejména na severozápadě Afriky, v menší míře i v ostatních oblastech přiléhajících ke Středozevnímu

⁵ Studie González et al. 2007 navazuje na názvosloví haploskupiny M1 dle Kivisild et al. 2004; studie Olivieri et al. 2006, Pereira et al. 2010 a Pennarun et al. 2012 subklady M1a a M1b (González et al., 2007; Kivisild et al., 2004) označují jako M1a1 a M1a2 a subklad M1c (González et al., 2007; Kivisild et al., 2004) jako M1b. Klasifikace podle Olivieri et al. 2006, Pereira et al. 2010 a Pennarun et al. 2012 je využita i databází lidských mtDNA PhyloTree_{mt} (van Oven and Kayser, 2009).

moři (v Evropě hlavně na Pyrenejském poloostrově), rozšíření zasahuje také do sahelu a do východní Afriky až na Blízký a Střední východ (Pennarun et al., 2012; Secher et al., 2014).

González et al. (2007) předpokládá, že zakladatelé U6 a M1 migrovaly společně ze zdrojové populace v Asii či na Blízkém východě, do severní Afriky kvůli nepříznivým klimatickým podmínkám před cca 30 000 lety. I když rozšíření těchto dvou haploskupin se více či méně překrývá, značně se liší frekvence jejich výskytu v daném území, jak je patrné na obrázku č. 3 (Pennarun et al., 2012).



Obrázek 3: Rozložení haploskupin M1 a U6, včetně jazykových rodin. Mapa A zobrazuje frekvenci výskytu haploskupiny M1. Mapa B zobrazuje frekvenci výskytu haploskupiny U6. (Pennarun et al., 2012)

Kromě toho datování ukazuje, že U6a je o cca 10 000 let starší než M1a a M1b a jeho subklady divergovaly ještě před LGM. Naopak, většina subkladů vycházejících z M1a a M1b je datována až do období po LGM. Navíc změny N_e v čase ukázaly na dvě populační expanze u obou haploskupin, ale tyto expanze se časově ani rozsahově nepřekrývají (Pennarun et al., 2012). Pennarun et al. (2012) i Secher et al. (2014) předpokládají, že U6 vznikla nezávisle na M1 a stáří haploskupiny U6 bylo odhadnuto na 35 300 (24 600–46 400) let (Secher et al., 2014), což se přibližně shoduje s odhadem podle Soares et al. (2009) a Pennarun et al. (2012).

Původ jedné z nejstarších evropských haploskupin U5 (Richards et al., 2000) je spojován s původem haploskupiny U6 na Blízkém východě, kde podle Macaulay et al. (1999) sdílely MRCA. V období svrchního paleolitu se pak předek haploskupiny U5 šířil podél Středozemního moře do Evropy, která je dnes majoritním místem výskytu U5 (Macaulay et al., 1999). Rozšíření U5 ale zasahuje i do severní Afriky (Achilli et al., 2005;

Maca-Meyer et al., 2001; Torroni et al., 1993) a v nízkých frekvencích ji lze najít i na západě subsaharské Afriky u Fulbů (Achilli et al., 2005; Černý et al., 2006; Rosa et al., 2004) nebo u Wolofů a Sererů (Rando et al., 1998).

Panoramatický graf změn N_e v čase (z angl. *Bayesian Skyline Plot*, BSP) ukazuje nízkou N_e populace haploskupiny U5 od svého vzniku až po expanzi na přelomu pozdního pleistocénu a holocénu (Pereira et al., 2010b). Jedná se o období po LGM, tzv. pozdní glaciál (z angl. *Late Glacial*), kdy příznivější teplotní podmínky umožnily vznik početných subkladů jako je U5a1a1, U5a1d, U5a2, U5a2c, U5b1b a U5b1c. Divergence haploskupiny U5 ale začala již během LGM (vznik U5a, U5a1, U5b, U5b1, U5b2) (Malyarchuk et al., 2010).

Subklady vycházející z U5b1 vykazují původ v oblasti jižní až střední Evropy (Malyarchuk et al., 2010). Subklad U5b1b1 byl nalezen jak u Berberů v severní Africe a Fulbů v subsaharské Africe, tak u Jakutů na Sibiři a Sámů ve Skandinávii. Achilli et al. (2005) předpokládá původ U5b1b1⁶ ve frankokantaberském refugiu na Pyrenejském poloostrově, které sloužilo jako hlavní zdroj lovecko-sběračských populací, jež znovu osídlily střední a severní Evropu během pozdního glaciálu (Achilli et al., 2004; Torroni et al., 2006). Tím poukazuje na maternální spojení mezi africkými proto-Berbery a evropskými lovci-sběrači pravděpodobně přes Gibraltarskou úžinu (Achilli et al., 2005).

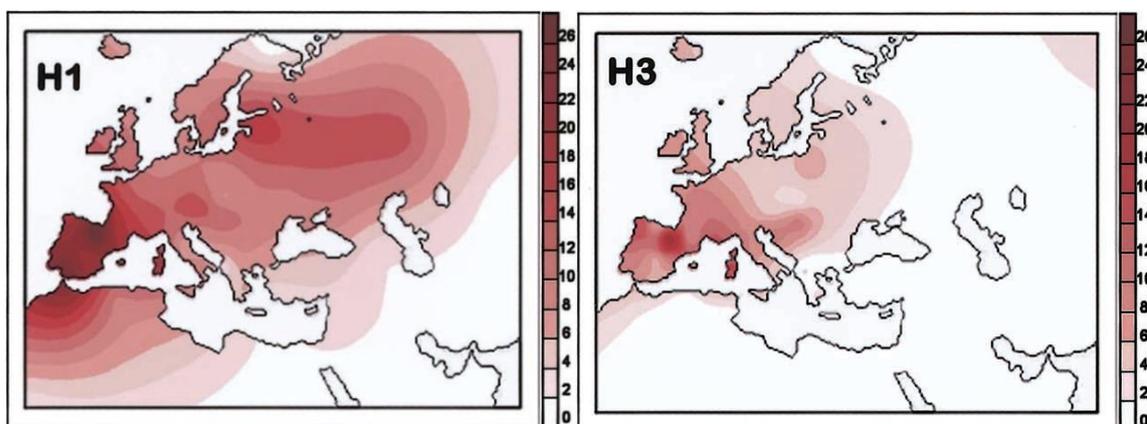
Další velká expanze U5 haploskupiny nastala na přelomu mladší doby kamenné a starší doby bronzové (Pereira et al., 2010b).

Haploskupina H vychází z haploskupiny R a je rozšířená v Evropě, kde tvoří 40–50% z celkové mtDNA variability, dále je přítomná na Blízkém východě a Kavkaze s frekvencí 20–30% (Achilli et al., 2004; Pereira et al., 2005; Richards et al., 2000) a v neposlední řadě se vyskytuje i v severní Africe, kde její zastoupení představuje až 25% (Ennafaa et al., 2009). Stáří haploskupiny H na Blízkém východě bylo odhadnuto na 23 200–28 400 let a v Evropě na 19 200–21 400 let (Richards et al., 2000), což zhruba odpovídá i datování ve studii Pereira et al. (2005). Z toho vyplývá, že původ haploskupiny H je zřejmě v oblasti Blízkého východu (Pereira et al., 2005; Richards et al., 2000).

Haploskupina H je členěná do velkého počtu subkladů. Nejvíce zastoupenými jsou H1 a H3. Nejvyšší frekvence jejich výskytu je na Pyrenejském poloostrově a přilehlých

⁶ U5b1b1 je označení subkladu charakterizovaného mutacemi v pozicích 7385 a 10927 podle databáze mtDNA Phylotree_{mt} (van Oven and Kayser, 2009). Studie Achilli et al. 2005 tento subklad označuje jako U5b1b.

oblastech a směrem na jihovýchod a severovýchod se postupně snižuje (viz. Obrázek č. 4) (Achilli et al., 2004; Pereira et al., 2005; Torroni et al., 2006).



Obrázek 4: Frekvence výskytu haploskupin H1 a H3 (Achilli et al. 2004)

Věk haploskupiny H1 na Pyrenejském poloostrově byl odhadnut podle kódujícího úseku mtDNA na $13\,000 \pm 6\,000$ let a podle HVS-I na $14\,000 \pm 3\,000$ let (Pereira et al., 2005). Tento věk se překrývá s datováním ve studiích Achilli et al. (2004) a Ennafaa et al. (2009). Stáří H1 v severní Africe podle Ennafaa et al. (2009) bylo odhadnuto na $11\,366 \pm 2\,354$ let (podle HVS-I), což se zhruba shoduje s datováním H1 v Tunisku v publikaci Cherni et al. (2009). I když haploskupina H3 ukazuje celkově o něco mladší koalescenci, datování je dost podobné H1, a proto je její molekulární historie spojovaná s H1 (Achilli et al., 2004; Cherni et al., 2009; Ennafaa et al., 2009; Pereira et al., 2005).

Výše uvedené poznatky ukazují na vznik H1 a H3 na jihozápadě Evropy, zřejmě ve frankokantaberském refugiu a jejich rozšíření po LGM směrem na severovýchod Evropy patrně spolu s magdalenienskou kulturou mladopaleolitických lovců-sběračů, ale také směrem na jih Pyrenejského poloostrova a dále až do severní Afriky stejně jako v případě haploskupiny U5b1b1 (Achilli et al., 2005, 2004; Ennafaa et al., 2009; Pereira et al., 2005).

Autoři publikace Ennafaa et al. (2009) ukazují, že polovina H větví v severní Africe není sdílena s jinými regiony, což se ještě umocňuje u Blízkého východu (70%) a Pyrenejského poloostrova (76%). Takto velká míra diferenciace v rámci daných regionů nebyla v dřívějších studiích zjištěna. Zkoumané populace severozápadní Afriky: maroťtí Arabové, obyvatelé Západní Sahary a Mauritánie vykazují větší podobnost (menší genetickou vzdálenost) s populacemi Pyrenejského poloostrova než Tunisané a tunišťtí a maroťtí Berbeři. Toto lze vysvětlit genovým tokem haploskupin H4, H5, H7, H8 a H11 z Blízkého východu, který kvůli menší geografické vzdálenosti zasáhl více populace severovýchodní (Tunisko) než severozápadní Afriky. Naopak pro severozápadní populace

Afriky, které jsou blíže Pyrenejského poloostrova, jsou typické H1 a H3. Stejně vysoká míra diverzity H1 a H3 v rámci těchto regionů je zřejmě dána genovým tokem mezi nimi v období paleolitu (Ennafaa et al., 2009).

Mezi další eurasijské haploskupiny v Africe patří X, která se oddělila z haploskupiny N. Tato haploskupina má nejvyšší frekvenci a diverzitu na Blízkém východě, což naznačuje její vznik právě tam. Stáří X bylo odhadnuto na cca 30 000 let. Její subklad X1 se nachází převážně na Blízkém východě a v severovýchodní Africe. Nejrozšířenějším subkladem haploskupiny X je X2, který kromě jiného zasahuje také do severní Afriky (Fernandes et al., 2012).

Haploskupina N1 s předpokládaným původem v jihozápadní Asii má několik větví, které se vyskytují i v Africe. Například subklad N1a je rozšířen na jihu Arabského poloostrova, ale také ve východní Africe. Na základě diverzifikace N1a arabských a afrických subkladů se předpokládá dávná migrace zpět do Afriky, která zřejmě začala již před 40 000 lety (Fernandes et al., 2015).

Haploskupiny J, T1, R0a vznikaly na Blízkém východě, kde mají i nejvyšší frekvenci zastoupení. Jejich výskyt v Evropě a severní Africe je spojován s migrací zemědělských a pasteveckých skupin v období neolitu (Černý et al., 2010; Fernandes et al., 2015; Kujanová et al., 2009; Richards, 2000). Tyto haploskupiny se ale nacházejí i ve východní Africe (v oblasti Etiopie a Somálska), což je výsledkem zpětných migrací z Arábie do Afriky přes úžinu Báb al-Mandab (Černý et al., 2011a; Fernandes et al., 2015, Kivisild et al. 2004). Hlavní migrace J1d1a a R0a do východní Afriky byla zjištěna před cca 10 000 lety. To je možné spojit s počátky námořního obchodu (Fernandes et al., 2015). Recentnější migrace R0a, T, J (před 2 000 lety), ukazuje podle Fernandes et al. (2015) na arabskou kontrolu nad námořními cestami v Rudém moři.

6. Materiál

Kolekce biologického materiálu laboratoře archeogenetiky obsahuje 544 vzorků populace kočovných Fulbů, jež byly sesbírány v africkém sahelu během expedic vedených doc. Mgr. Viktorem Černým, Dr. v letech 1999–2015. Přesněji se jedná o bukální stěry uchované v lyzačním roztoku⁷ (expedice do roku 2009) a o vzorky slin uchované v komerčních roztocích Oragene a Norgene (expedice pozdější).

Pro analýzu sdílení haplotypů a klasifikaci do haploskupin byly využity sekvence HVS-I Fulbů, osekvenované již dříve doc. Černým nebo jeho předchozími studenty, a také HVS-I publikované sekvence v počtech 1 471 ze severozápadní Afriky, 2 152 ze severovýchodní Afriky a Blízkého východu a 1 970 z východní Afriky. Seznam jednotlivých populací těchto regionů a publikačních zdrojů je uveden v příloze č. 1.

Z fulbských vzorků bylo na celogenomové sekvenování vybráno 17 sekvencí eurasijského původu určených podle HVS-I použitím online programu HaploGrep (Kloss-Brandstätter et al., 2011) založeném na srovnání s volně dostupnou databází lidských mtDNA PhyloTree_{mt} (van Oven and Kayser, 2009). Devět z těchto sekvencí bylo zařazeno do haploskupiny U5b1b1b (16189C-16192T-16270T-16320T) a osm do haploskupiny H3p (16145A-16222T (16167T)).

K těmto fulbským vzorkům byly ještě přidány dva vzorky pocházející od sahelské zemědělské populace Songhajců, kteří jako jediní z celkové kolekce 2 193 afrických vzorků Laboratoře archeogenetiky (vyjma Fulbů) obsahovali v HVS-I stejné mutace. Názvy použitých vzorků jsou uvedeny v tabulce č. 2 a tabulce č. 3 včetně data a místa sběru. Jedná se o nepřibuzné jedince, což bylo zajištěno formou dotazníku zaměřeného mimo jiné na místa narození prarodičů z matčiny i otcovi strany.

Pro konstrukci fylogenetických stromů byly využity sekvence z databáze PhyloTree_{mt}, z projektu 1 000 Genomes (The 1 000 Genomes Project Consortium, 2012) a sekvence z různých publikací dostupné v GenBank (viz. Příloha č. 2).

⁷ Složení lyzačního roztoku: 50mM Tris Ph 8.0; 50mM EDTA; 50mM sacharóza, 100mM NaCl, 1% SDS.

Tabulka 2: Vzorky využitě pro celogenomové sekvenování mtDNA klasifikované podle HVS-I do haploskupiny U5b1b1b

Název vzorku	Populace	Místo sběru	Rok sběru
FAba60	Fulbové	Abalak, Niger	2004
FAba69	Fulbové	Abalak, Niger	2004
FBan58	Fulbové	Banfora, Burkina Faso	2004
FBan99	Fulbové	Banfora, Burkina Faso	2004
FBon21	Fulbové	Bongor, Čad	2003
FBon23	Fulbové	Bongor, Čad	2003
FBon24	Fulbové	Bongor, Čad	2003
FBon33	Fulbové	Bongor, Čad	2003
FDif53	Fulbové	Diffa, Niger	2005
Song61	Songhajci	Hombori, Mali	2006

Tabulka 3: Vzorky využitě pro celogenomové sekvenování mtDNA klasifikované podle HVS-I do haploskupiny H3p

Název vzorku	Populace	Místo sběru	Rok sběru
FAba76	Fulbové	Abalak, Niger	2004
FAde9	Fulbové	Ader, Niger	2004
FBan93	Fulbové	Banfora, Burkina Faso	2004
FDia12	Fulbové	Diafarabe, Mali	2006
FFE17	Fulbové	Ferlo, Senegal	2013
FLin145	Fulbové	Linia, Čad	2004
FTin16	Fulbové	Tindangou, Burkina Faso	2004
FZin26	Fulbové	Zinder, Niger	2005
Song80	Songhajci	Hombori, Mali	2006

7. Metody

Laboratorní část této práce proběhla v archeogenetické laboratoři Archeologického ústavu AV ČR, Praha, v.v.i. Sekvence vzorků byla provedena firmou MacroGen v Koreji a Laboratoří sekvenace DNA na Přírodovědecké fakultě Univerzity Karlovy v Praze. Obdržená data (chromatogramy) byla zpracována v archeogenetické laboratoři a tvorba fylogenetických stromů a datování haploskupin proběhlo v Institutu molekulární patologie a imunologie Univerzity v Portu (IPATIMUP)⁸ v Portugalsku pod vedením Dr. Luísy Pereiry a Dr. Verónicy Fernandes.

7.1. Izolace DNA a nespecifická amplifikace kitem Illustra

V slinách a v bukalních stěrech se nachází buňky, ze kterých je možné izolovat DNA. Jedná se především o odstranění buněčných organel a enzymů, které by mohly inhibovat následnou amplifikaci.

Osmnáct z devatenácti vzorků použitých v této práci byly bukalní stěry skladované v lyzačním roztoku. Vzorek FFE17 byl uchován v komerčním roztoku Oragene a vyizolován byl již dřívějšími studenty. Jelikož jeho koncentrace byla dostatečně vysoká (tabulka č. 4), nebylo nutné jej opět izolovat.

Pro izolaci bukalních stěrů byl využitý QIAquick PCR Purification Kit firmy Qiagen. Protokol pro izolaci se nachází v příloze č. 3.

Následně byla změřena koncentrace vyizolovaných vzorků na spektrofotometru Nanodrop 1000. Koncentrace DNA jsou uvedeny v tabulce č. 4. Využité vzorky byly už více než deset let staré a opakovaně izolované, tudíž jejich koncentrace byla dost nízká. Aby se koncentrace zvýšila, a aby DNA nemusela být ze stěrů izolována vícekrát, byl pro některé izoláty použit nespecifický amplifikační kit Illustra Ready-To-Go GenomiPhi V3 DNA (zkráceně Illustra) firmy GE Health Life Sciences. Tento kit je založený na Phi29 DNA polymeráze s vysokou opravní aktivitou a náhodných hexamerních primerech tak, aby se naamplifikoval celý genom rovnoměrně (GE Healthcare Life Sciences [online], Silander and Saarela, 2008). Protokol pro amplifikaci kitem Illustra se nachází v příloze č. 4, změřené koncentrace DNA před a po amplifikaci jsou uvedené v tabulce č. 4.

⁸ IPATIMUP (*Institute of Molecular Pathology and Immunology of the University of Porto*)

Tabulka 4: Informace o koncentraci izolovaných vzorků a o poměrech absorbancí určujících čistotu DNA po vyzolování DNA kitem QIAquick a po amplifikaci izolátů kitem Illustra

Vzorek	Po izolaci z bukálních stěrů			Po amplifikaci kitem Illustra		
	260/280 ^a	260/230 ^b	C (ng/μl)	260/280 ^a	260/230 ^b	C (ng/μl)
FAba60	2,6	2,17	2,5	1,61	2,07	1 748
FAba69	5,33	1,41	2,3	1,53	1,96	1 746
FBan58	3,48	2,05	4,0	1,56	1,94	1 952
FBan99	2,76	1,69	7,4	1,52	1,92	2 260
FBon21	2,85	1,81	4,6	1,56	1,92	2 086
FBon23	2,55	2,1	7,1	-	-	-
FBon24	2,43	1,74	11,5	-	-	-
FBon33	2,06	1,84	15,0	-	-	-
FDif53	1,94	1,67	8,3	1,58	2,04	2 770
Song61	1,98	1,04	6,2	-	-	-
FAba76	1,18	0,69	8,8	1,59	2,14	2 198
FAde9	1,72	1,61	74,7	1,57	2,08	2 212
FBan93	1,59	1,64	40,2	1,56	2,05	2 280
FDia12	1,83	0,07	51,9	1,6	2,06	2 222
FFE17	1,7	1,12	682,5	-	-	-
FLin145	1,38	0,14	11,6	1,59	2,06	2 328
FTin16	1,65	1,03	18,2	1,56	1,99	2 235
FZin26	1,75	0,91	6,7	1,61	2,09	2 556
Song80	1,67	0,20	17,8	1,57	1,94	2 350

^a ideální poměr 260/280, kdy je DNA považována za čistou, je 1,7 – 2,0

^b ideální poměr 260/230, kdy je DNA považována za čistou, je 2,0 – 2,2

7.2. Amplifikace DNA polymerázovou řetězovou reakcí

Polymerázová řetězová reakce (z angl. *Polymerase Chain Reaction*, PCR) se používá na *in vitro* amplifikaci specifického úseku DNA ohraničeného dvěma oligonukleotidovými řetězci, které se nazývají primery. Pomocí DNA polymerázy je nasyntetizovaná DNA, jež obsahuje jenom námi studovanou sekvenci, kterou je možné použít na další analýzy.

Reakční směs pro PCR se skládá z Taq DNA polymerázy, deoxynukleosidtrifosfátů (dNTP), MgCl₂ a reakčních pufrů. V této práci byla použita směs těchto látek s názvem

GoTaq Green Master Mix firmy Promega. Dále se přidává deionizovaná voda, primery *reverse* a *forward* a templát, tedy vzorek DNA. Pro jednu reakci bylo použito 12,5 µl GoTaq Green Master Mix, 9,5 µl vody, 0,5 µl primeru *forward*, 0,5 µl primeru *reverse* a 2 µl DNA.

PCR je složená ze tří cyklicky opakujících se kroků (obvykle 25–40 opakování): denaturace vláken templátu, nasednutí primerů na templát a syntéza DNA pomocí DNA polymerázy. Jednotlivé kroky se liší teplotou a délkou trvání. Reakce probíhá v termocycleru.

Pro PCR reakci jsou klíčové primery, které zajišťují specifické namnožení studované sekvence. V této diplomové práci bylo využito setu 24 primerů pro celogenomové sekvenování mtDNA z publikace Gonder et al. (2007), které byly optimalizovány Mgr. Eliškou Podgornou během jejího doktorského studia. Seznam primerů, teplot, při kterých hybridizují s templátem, a délka produktu jsou uvedené v příloze č. 5.

Program teplotních cyklů termocycleru Eppendorf Mastercycler použitých v této práci:

1krát	94°C (1 minuta)
30/40krát ⁹	94°C (10 sekund)
	58/56/51°C ¹⁰ (30 sekund)
	72°C (1 minuta)
1krát	72°C (7 minut)

Pro PCR byly vyizolované vzorky naředěné. Vzorek FFE17 v kitu Oragene, byl ředěn 10×. Vzorky amplifikované Illustrou byly ředěné 20×. I když se výsledná koncentrace zdá stále vysoká, při větším naředění (40×) byl výtěžek po PCR velmi nízký. Je to patrně dáno tím, že v bukálních stěrech (i po izolaci) není přítomná jenom lidská DNA a při použití Illustry se amplifikuje všechna DNA bez rozdílu. Ze změřené koncentrace pak není jasné, jakou část z celkové namnožené DNA tvoří lidská. Jenom pro úplnost dodám, že vzorky amplifikované Illustrou, které byly naředěny pro PCR 10×, také nebyly vhodné, protože nadbytečná DNA inhibovala PCR. To se zřejmě stalo i při naředění 20× (v porovnání se vzorky, na které nebyla Illustra použita), ale v menší míře.

⁹ V případě nasedání primerů při teplotě 51°C, jsou cykly opakované 30krát; v případě nasedání primerů při teplotě 56°C a 58°C, jsou cykly opakované 40krát.

¹⁰ Jedna z uvedených teplot podle příslušné teploty nasedání daného primeru (viz. Příloha č. 5).

7.3. Gelová elektroforéza

Gelová elektroforéza je založená na tom, že nukleové kyseliny mají záporný náboj, který je přímo úměrný délce jejich fragmentů. Pomocí elektrického proudu jsou různě dlouhé polymery transportovány v gelu od záporného pólu ke kladnému pólu. Během tohoto putování dojde k jejich rozdělení podle délky (resp. velikosti jejich náboje), kterou lze odečítat za pomoci tzv. žebříčku, jež obsahuje fragmenty DNA o známých délkách.

V této práci byl použitý 1,5% agarózový gel připravený z 0,8 g agarózy, 12 g Tris-Borátového pufru (TBE) a vody v celkovém objemu 60 ml. Pro vizualizaci amplikonů bylo do gelu přidáno barvivo GelRed o objemu 3 μ l. Jako elektroforetický pufr byl použit TBE. Do hotového gelu byly přeneseny PCR produkty o objemu 1 μ l a žebříček pro odečítání koncentrací GeneRuler 50 bp DNA Ladder o objemu 10 μ l (5 μ l žebříčku + 5 μ l vody). Elektroforéza probíhala přibližně 50 minut při napětí 87 V. Po uplynutí tohoto času byl gel prosvícen UV světlem a koncentrace PCR produktů byla odečtena programem SynGene. V tomto kroku byla kontrolována i tzv. negativní kontrola, která ukazuje, zda nedošlo ke kontaminaci vzorků.

7.4. Sekvence

Sekvence slouží na přesné určení sekvence DNA (pořadí jednotlivých nukleotidů). Pro tuto práci bylo využito Sangerovo sekvenování.

Pro tyto účely bylo třeba nejprve naředit PCR produkty na stejnou koncentraci 50ng/ μ l a přenést do 96 jamkové destičky. Do další takovéto destičky byly zrcadlově přeneseny *forward* primery o koncentraci 5 ng/ μ l tak, aby pozice jednotlivých primerů odpovídala jimi amplifikované DNA v předchozí destičce. Takto připravené vzorky byly odeslány na purifikaci a následné Sangerovo sekvenování do firmy Macrogen v Koreji. Pokud se ve výsledných chromatogramech objevila délková či bodová heteroplazmie, byly ještě sekvenovány odpovídajícím *reverse* primerem.

Některé problematické vzorky (s nízkou koncentrací nebo heteroplazmické) musely být sekvenovány opakovaně. Sekvenování těchto vzorků proběhlo na Přírodovědecké fakultě Univerzity Karlovy v Praze v Laboratoři sekvenace DNA.

Pro tuto sekvenaci bylo nutno zbavit PCR produkty veškerých nečistot, jež by mohly narušit její průběh. Na purifikaci byl použit QIAquick PCR Purification Kit firmy Qiagene podle protokolu v příloze č. 6. Koncentrace purifikovaných PCR produktů byla následně změřena na spektrofotometru NanoDrop 1000, a PCR produkty byly dále ředěny tak, aby

jejich výsledná koncentrace odpovídala poměru 10ng DNA/100parů bází. K celkovému objemu purifikovaného PCR produktu (7 µl) byly přidány odpovídající primery o koncentraci 5 ng/µl (1 µl).

7.5. Zpracování dat

7.5.1. Klasifikace haploskupin a sdílení mtDNA a haplotypů

Pro určení sdílení mtDNA sekvencí a haplotypů byl použitý program Arlequin 3.5.1.2., který porovnal HVS-I (pozice 16032–16370) Fulbů s homologními úseky u populací severozápadní Afriky, severovýchodní Afriky a Blízkého východu a východní Afriky (viz příloha č. 1). Následně byly všechny fulbské sekvence zarovnané v programu BioEdit Sequence Alignment Editor 7.0.9.1. podle rCRS (Andrews et al., 1999). Program mtDNA GeneSyn 1.0 (Pereira et al., 2009) z těchto sekvencí exportoval mutace, které byly poté analyzovány programem HaploGrep (Kloss-Brandstätter et al., 2011). Tento program podle přítomných mutací zařadil haplotypy do haploskupin. Je ovšem třeba dodat, že kvalita těchto klasifikací se různí podle haplotypů dostupných v samotné databázi HaploGrep (Kloss-Brandstätter et al., 2011). V případě klasifikace vzorků obsahujících mutace, které v databázi chybí, jsou programem navrženy nejbližší možnosti s danou mírou pravděpodobnosti. Ty však nemusí odpovídat reálné klasifikaci, takže po doplnění informací z ostatních úseků molekuly mohou být klasifikovány jinak.

7.5.2. Datování

Chromatogramy získané po sekvenaci PCR produktů byly poskládané do celogenomových sekvencí v programu Sequencher 4.1.4, kde jako referenční sekvence byla využita rCRS (Andrews et al., 1999). Kompletní sekvence byly přenesené do programu BioEdit Sequence Alignment Editor 7.0.9.1. Následně byl stejně jako v případě analýzy sdílení haplotypů použit program mtDNA GeneSyn 1.0 (Pereira et al., 2009) a HaploGrep (Kloss-Brandstätter et al., 2011). Všechny další analýzy probíhaly v IPATIMUPu ve spolupráci s Dr. Verónicou Fernandes.

Podle detekovaných mutací a určené haploskupiny byly vzorky zařazeny do fylogenetických stromů haploskupin U5 a H1. Tyto stromy byly sestaveny na základě fylogenetického stromu databáze PhyloTree_{mt} mtDNA tree Build 16 (19 Feb 2014) (van Oven and Kayser, 2009), rozšířeny o sekvence z projektu 1000 Genomes (The 1000 Genomes Project Consortium, 2012) a o některé další sekvence dostupné z databáze

GenBank. Kvůli značné prostorové náročnosti nejsou celkové fylogenetické stromy k práci přiloženy, ale jsou dostupné na vyžádání v elektronické podobě. V příloze č. 2 nicméně uvádím seznam použitých sekvencí z databáze GenBank a 1000 Genomes (The 1000 Genomes Project Consortium, 2012).

Z fylogenetických stromů byly zhotoveny vstupní soubory pro datování *ró* statistikou (Forster et al., 1996). Samotné datování proběhlo v programu NewickAge Calculator. Mutační rychlost použitá pro vznik synonymních substitucí byla 1 mutace za 7 884 let a pro vznik všech substitucí celého genomu 1 mutace za 3 624 let (Soares et al., 2009).

Pro zjištění genetické distance (délky větví) byl použitý PAML (z angl. *Phylogenetic Analysis by Maximum Likelihood*), což je vlastně soubor programů, které používají ML analýzy. Konkrétně byl z tohoto balíku využit program BASEML (Yang, 1997). Jelikož se jednalo o datování mladých haploskupin, byly použity pouze vybrané sekvence z fylogenetického stromu a ne celý strom. Sekvence byly získány z databáze GenBank. Tyto sekvence (včetně nových) byly upraveny v BioEdit Sequence Alignment Editor 7.0.9.1 podle rCRS (Andrews et al., 1999) tak, aby neobsahovaly inserce, delece, a ani substituce (*hotspots*) v pozicích 16182, 16183 a 16519. Jako evoluční model byl vybrán Hasagawův-Kihinův-Yanův model, tzv. HKY85, který zohledňuje nestejně zastoupení bází v sekvenci a rozličnou rychlost vzniku tranzice a transverze (Hasegawa et al., 1985). Genetická distance byla počítána zvlášť pro kódující segment (a také nehypervariabilní část kontrolního segmentu) a hypervariabilní části kontrolního segmentu (HVS-I v pozicích 16051–16400 a HVS-II v pozicích 68–263 podle Soares et al. (2009)). To znamená, že mutační rychlosti vzniku transverze a tranzice a nukleotidové frekvence byly určeny pro tyto dva úseky jednotlivě. Výsledné datování haploskupin bylo provedeno v programu PAMLconverter za použití stejné celogenomové mtDNA mutační rychlosti jako v případě *ró* statistiky.

8. Výsledky

8.1. Klasifikace haploskupin Fulbů a jejich sdílení

Celkově bylo analyzováno 544 fulbských mtDNA sekvencí v pozicích 16032–16370, zahrnujících HVS-I. Mezi těmito sekvencemi jsme našli 125 haplotypů, které byly zařazeny do 62 haploskupin a subhaploskupin s pravděpodobností 69,9–100%.

Většina zkoumaných sekvencí patří mezi subsaharské haploskupiny, do tzv. makrohaploskupiny L. Dohromady se jedná o 458 sekvencí (84,2% z celkového počtu), u kterých bylo identifikováno 107 haplotypů zařazených do 47 haploskupin, včetně jejich subkladů. Ve velké míře se vyskytuje L1b, jež s dvanácti různými motivy a třemi subklady čítá na 148 nositelů, nejfrekventovanější je typický západoafrický motiv L1b 16126C-16187T-16189C-16223T-16264T-16270T-16278T-16293G-16311C s kvalitou určení 100%. Počtem 44 jedinců je zastoupen i klad L1b, který kromě těchto mutací obsahuje i 16093C. Další L1b, který obsahuje mutace 16213A a 16260T, má u Fulbů 25 nositelů.

Hojně zastoupená je i haploskupina L3b, která je přítomna u 156 Fulbů. Nejvíce zastoupený subklad z L3b je L3b1a se zpětnou mutací v pozici 16124, jehož nositelů je 101. Z haploskupiny L3 byly ve větším zastoupení i L3d a L3e haploskupiny. Identifikována byla také L2, přesněji subklady patřící L2a1 v počtu 30 vzorků, L2b s počtem 32 a L2e v zastoupení sedmi Fulbů. Další subsaharské haploskupiny a podskupiny byly přítomny už v mnohem menší míře, nebo jen jednotlivě. Celkové zastoupení subsaharských haploskupin u Fulbů je vidět v tabulce č. 5 a v příloze č. 7, kde jsou uvedeny i haplotypy a spolehlivost určení haploskupiny vyjádřena v procentech.

Kromě haploskupin typu L jsou Fulbové nositeli i haploskupin s eurasijským původem. Ty se ale objevují méně, v našem případě je jich 47, což je 8,6% z celkového zkoumaného souboru Fulbů. Identifikováno bylo 14 haplotypů zařazených do 13 haploskupin a jejich subkladů. Toto zastoupení je ale vyšší než u jiných afrických populací žijících ve stejném regionu (Cerezo et al., 2011; Černý et al., 2011b, 2006), proto je věnovaná eurasijským haploskupinám v této práci větší pozornost.

Nositelů motivu 16145A-16222T je 21 a u jednoho Fulba je k němu přidána i substituce v pozici 16167T. Tyto haplotypy byly zařazeny do eurasijské haploskupiny H3p dle programu HaploGrep (Kloss-Brandstätter et al., 2011) se spolehlivostí 81,7% v prvním případě a 69,9% v případě druhém. Zastoupení 11 jedinců má i eurasijská haploskupina U5b1b1b v jediném motivu 16189C-16192T-16270T-16320T se 100% spolehlivostí určení. Další eurasijské haploskupiny jsou zastoupeny ještě méně, většinou

jen jednotlivě a často s menší přesností určení než 100%. Všechny eurasijské haploskupiny u Fulbů jsou uvedeny v tabulce č. 6.

Zbýlých 7,2% (39 sekvencí) je zastoupeno haplotypy, které nevykazují jednoznačné zařazení do haploskupin, a to ani v určení, zda se jedná o eurasijskou nebo subsaharskou haploskupinu. Motiv 16223T-16278T, který je přítomen u 36 jedinců, byl určen se 100% spolehlivostí jako M51, ale se stejnou spolehlivostí i jako blíže nspecifikovaná haploskupina L2. U jednoho jedince byl identifikován také motiv 16214T-16223T-16278T, který byl rovněž klasifikován jako M51 i jako L2 se stejnou spolehlivostí 80,5%. Dva jedinci s dvěma motivy 16223T-16278T-16311C a 16192T-16223T-16278T-16311C byli zařazeni jak do M51b1, tak do větve L2'3'4'6 s kvalitou určení 100% a 85,9%.

Tabulka 5: Zastoupení subsaharských haploskupin podle HVS-I u afrických Fulbů

Haploskupina	N=544 (N _{su} ^a =458)	% z N	Haploskupina	N=544 (N _{su} ^a =458)	% z N
L0a1'4	4	0,7	L2e	7	1,3
L0a2	1	0,2	L3b	47	8,6
L1b	145	26,7	L3b1a+@16124	101	18,6
L1b1a12b	1	0,2	L3b1a3	2	0,4
L1b2	1	0,2	L3b1a9	3	0,6
L1b2a	1	0,2	L3b2a	2	0,4
L1c	1	0,2	L3b3	1	0,2
L1c1d	1	0,2	L3d	5	0,9
L1c3a	1	0,2	L3d1a1'2	22	4,0
L1c3a1b	1	0,2	L3d1b3a	1	0,2
L2a1	7	1,3	L3d1c	3	0,6
L2a1+143+@16309	6	1,1	L3d1d	3	0,6
L2a1+16189 (16192)	5	0,9	L3e1	6	1,1
L2a1+143+16189 (16192)+@16309	1	0,2	L3e1d	1	0,2
L2a1a2	5	0,9	L3e1g	1	0,2
L2a1c2a	1	0,2	L3e2	2	0,4
L2a1c3a1	1	0,2	L3e2a1b2	1	0,2
L2a1c3b	3	0,6	L3e2b	14	2,6
L2a1l3	1	0,2	L3e5	5	0,9
L2a2'3	3	0,6	L3f1b	2	0,4
L2b	3	0,6	L3f1b+16292	2	0,4
L2b1	2	0,4	L3f3	1	0,2
L2b1a	27	5,0	L4b2	1	0,2
L2c1	3	0,6			

^a N_{su} – počet subsaharských mtDNA

Tabulka 6: Zastoupení eurasijských haploskupin podle HVS-I u afrických Fulbů a jejich sdílení

Haploskupina	Spolehlivost určení	Haplotypy	Fulbové (N=544; N _{eu} ^a = 47)	Fulbové (% z N)	severozápadní Afrika	severovýchodní Afrika a Blízký východ	východní Afrika
M18	79,0%	16124C-16223T-16278T- 16318T	1	0,2	0	0	0
M2	88,0%	16223T-16274A-16278T	1	0,2	0	0	0
D4j7	75,35%	16082T-16223T-16264T-16278T-16343G-16362C	1	0,2	0	0	0
D4b2a1	83,4%	16093C-16223T-16278T-16355T-16362C	1	0,2	0	0	0
E1b+16261	89,8%	16223T-16261T-16278T-16362C	1	0,2	0	0	0
HV0	100%	16298C	2	0,4	25	21	0
H2a2a1	-	-	3	0,6	278	144	4
H3p	81,7%	16145A-16222T	21	3,9	2	0	0
H3p	69,9%	16145A-16167T-16222T	1	0,2	0	0	0
H7h	73,3%	16124C-16213A	1	0,2	0	0	0
U3	74,2%	16093C-16260T-16343G	1	0,2	1	0	0
U5b1b1b	100%	16189C-16192T-16270T-16320T	11	2,0	0	0	0
U6a1a	100%	16172C-16189C-16219G-16278T	1	0,2	18	4	8
X2h	100%	16189C-16278T	1	0,2	0	5	0

^a N_{eu} – počet eurasijských mtDNA

Fulbské mtDNA sekvence a haplotypy byly dále porovnávány s jednotlivými regiony Afriky. Vybraných bylo 2 152 sekvencí severovýchodní Afriky a Blízkého východu (965 haplotypů), 1 471 mtDNA sekvencí severozápadní Afriky (478 haplotypů) a 1 970 sekvencí východní Afriky (792 haplotypů). Výsledky sdílení mtDNA sekvencí a haplotypů jsou uvedeny v tabulce č. 7.

Pokud se podíváme pouze na počet sdílených mtDNA sekvencí, je viditelně větší počet sdílení mtDNA mezi populacemi severozápadní Afriky a Fulby. Toto se ale téměř neodráží při hodnocení sdílení haplotypů, důvodem je velké zastoupení (až 278) H2a2a1. Nicméně třeba dodat, že severozápadní Afrika je zastoupena menším počtem vzorků než ostatní regiony, a i tak sdílí s Fulby největší počet haplotypů. Sdílení eurasijských mtDNA sahelských Fulbů s jinými africkými regiony je vidět v tabulce č. 6. Souhrnná tabulka sdílení mtDNA (eurasijské i subsaharské sekvence Fulbů) se nachází v příloze č. 7.

Tabulka 7: Přehled sdílení mtDNA a haplotypů mezi Fulby a vybranými regiony Afriky a Blízkého východu

Vybrané regiony Afriky a Blízký východ	Počet sdílených sekvencí mezi Fulby a daným regionem	Počet sdílených sekvencí mezi daným regionem a Fulby	Počet sdílených haplotypů
Severozápadní Afrika (N=1471)	314 (57,7%)	452 (30,7%)	31
Severovýchodní Afrika a Blízký východ (N=2152)	221 (40,6%)	255 (11,8%)	26
Východní Afrika (N=1970)	291 (53,5%)	224 (11,4%)	24

8.2. Fylogenetické stromy a datování

Pro kompletní sekvenování mtDNA byly vybrány vzorky haploskupin eurasijského původu z předchozí analýzy (přítomnost a sdílení haplotypů), které se u Fulbů vyskytují ve větším zastoupení. Z 22 H3p HVS-I bylo vybráno 8 vzorků a to tak, aby z každého ovzorkovaného regionu byl zvolen jenom jeden jedinec. Z haploskupiny U5b1b1b, která byla identifikovaná u 11 fulbských jedinců, bylo sekvenováno 9 vzorků. Vzorkování v Ziňaré v Burkině Faso proběhlo až v únoru roku 2015, a do analýzy sdílení haplotypů

byly tyto HVS-I sekvence přidány až dodatečně. I když byly haplotypy H3p i U5b1b1b identifikovány i zde, nebyly už použity na celogenomové sekvenování mtDNA v této diplomové práci.

8.2.1. Haploskupina U5b1

U vzorků haploskupiny U5b1b1b proběhla klasifikace v HaploGrep (Kloss-Brandstätter et al., 2011) se spolehlivostí určení 98–100% a tedy se zcela shoduje s určením podle HVS-I. U této haploskupiny nebyly identifikovány žádné nové subklady. Pouze u vzorku FAba69 byla nově objevena tranzice v pozici 9591A a inserce 16191.1C, FBon23 je nositelem substituce 195C a FBon33 substituce 3357A.

Nově osekvenované genomy mtDNA byly zařazeny do fylogenetického stromu haploskupiny U5, konkrétně do subkladu U5b1b1b, který obsahuje vzorky Afroameričanů vzorkovaných v USA (Just et al., 2008) a také jeden vzorek Fulba ze Senegalu (Achilli et al., 2005). Výňatek z uvedeného fylogenetického stromu lze vidět na obrázku č. 5. Výsledky datování kladů obsahujících nově osekvenované genomy jsou uvedené v tabulce č. 8 pro datování r₀ statistiku a v tabulce č. 9 pro datování ML.

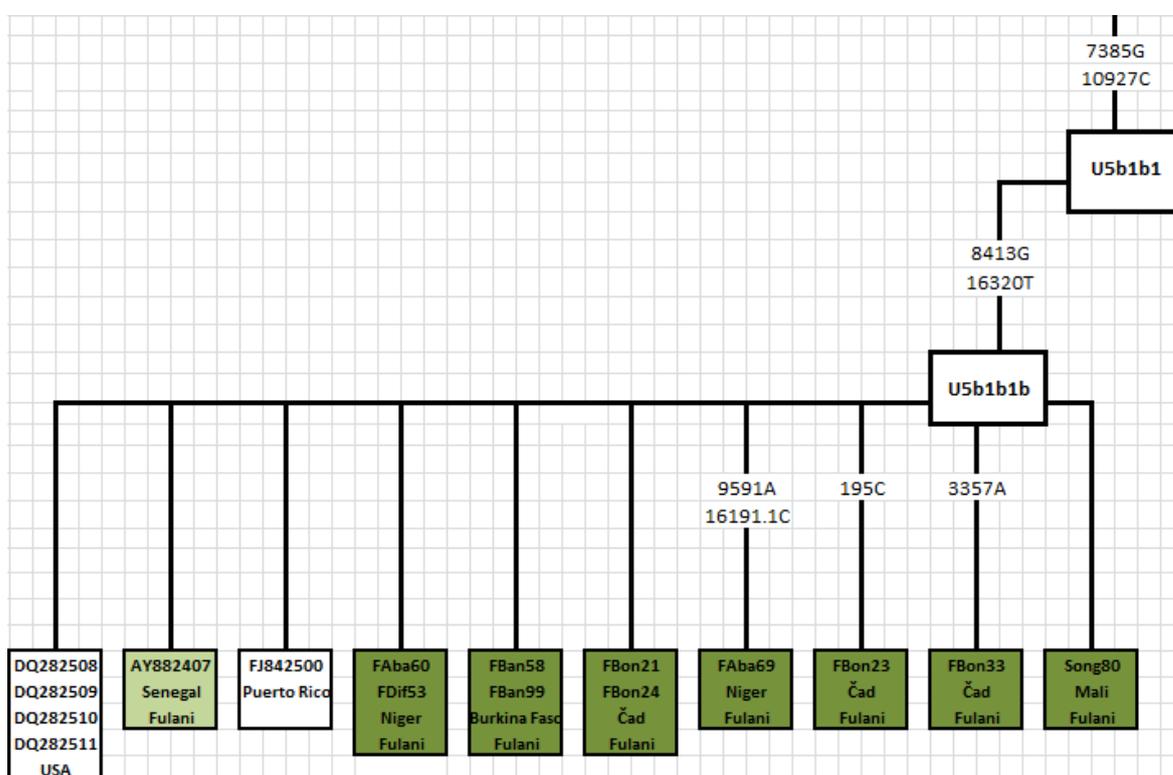
Věk U5b1 + 16189 byl odhadnut r₀ statistikou za použití synonymní mutační rychlosti na 23 528 let, což je vyšší než za použití mutační rychlosti celé mtDNA (16 146 let) a ML datování (12 652 let). U všech kladů datování pomocí synonymních mutací vykazuje širší 95% interval spolehlivosti než datování za použití celé mtDNA r₀ statistikou i metodou ML. Z tabulek je také vidět, že věk získaný r₀ statistikou je vyšší než při ML datování. Stáří subkladu U5b1b1b bylo odhadnuto na cca 500 let pomocí všech tří postupů.

Tabulka 8: Datování U5b1 a jejich subkladů pomocí r₀ statistiky

Haploskupiny (subklady)	Celkové		Synonymní	
	Věk (roky)	95% interval spolehlivosti (roky)	Věk (roky)	95% interval spolehlivosti (roky)
U5b1+16189	16 146	[9 533–22 991]	23 528	[7 081–39 975]
U5b1b	12 815	[5 350–20 590]	19 014	[590–37 439]
U5b1b1	8 974	[4 117–13 972]	6 645	[1 885–11 405]
U5b1b1b	481	[-63–1 028]	493	[-473–1 459]

Tabulka 9: Datování U5b1 a jejich subkladů pomocí ML (PAML)

Haploskupina (subklady)	Věk (roky)	95% interval spolehlivosti (roky)
U5b1+16189	12 652	[7 896–17 534]
U5b1b	8 678	[3 695–13 810]
U5b1b1	4 908	[806–9 119]
U5b1b1b	500	[-153–1 156]



Obrázek 5: Zařazení nově osekvenovaných vzorků do fylogenetického stromu haploskupiny U5, přesněji do subkladu U5b1b1b

8.2.2. Haploskupina H1ca

Vzorky klasifikované podle HVS-I do haploskupiny H3p byly po kompletním osekvenování pomocí programu HaploGrep (Kloss-Brandstätter et al., 2011) zařazeny do haploskupin H1 a H100, se spolehlivostí určení kolem 80%, přesné hodnoty jsou uvedeny v tabulce č. 10. Tyto vzorky sdílejí společné mutace v pozicích 10257T, 16145A a 16222T, což předpokládá přítomnost zatím neidentifikované větve fylogenetického stromu.

Tabulka 10: Zařazení nově osekvenovaných vzorků do haploskupin

		Název vzorku								
		FAba	FAde	FBan	FDia	FFE	FLin	FTin	FZin	Song
		76	9	93	12	17	143	16	26	80
Haploskupina		H1	H100	H100	H1	H1	H100	H1	H100	H100
Spolehlivost určení		85,2%	82,6%	83%	85,2%	85,2%	81,4%	85,2%	84,2%	83,8%

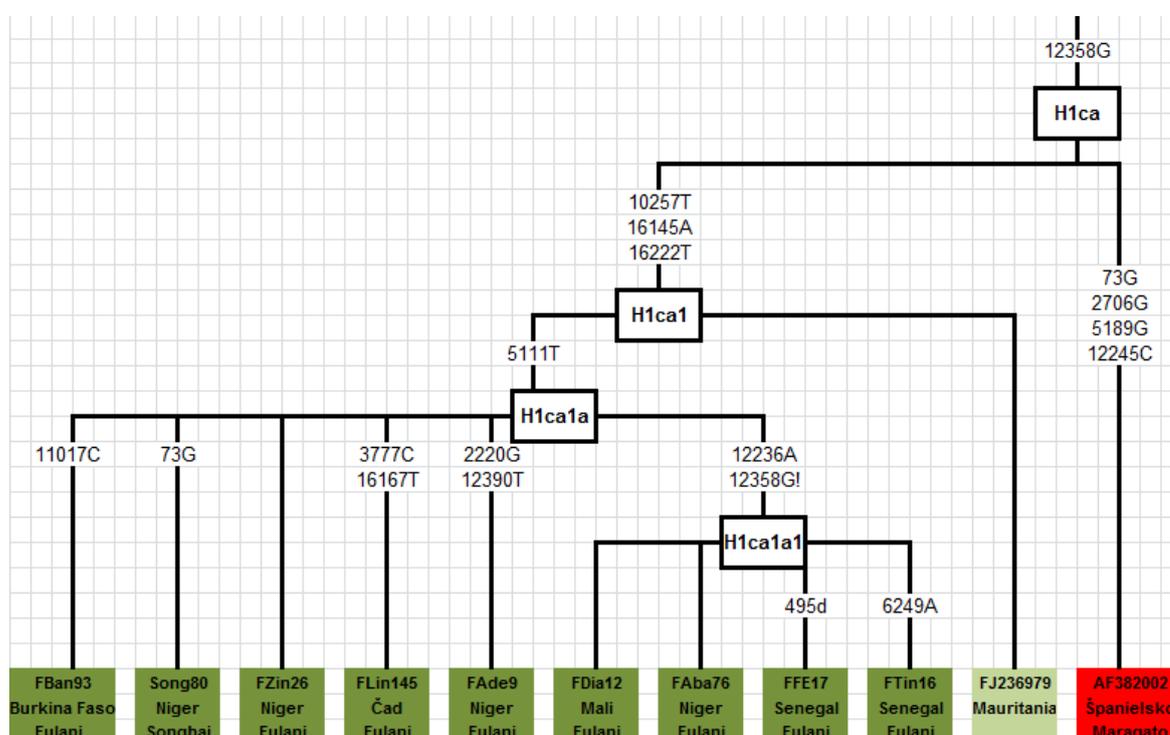
Na základě principu maximální úspornosti byly všechny vzorky zařazeny do haploskupiny H, přesněji do kladu H1 charakterizovaného substitucí 3010A, která byla identifikována u všech zkoumaných vzorků. Následně byla zvolena větev H1ca s přítomností 12358G substituce. Byla zde vytvořena podskupina s názvem H1ca1, jež zahrnuje nově osekvenované genomy a jeden dříve publikovaný genom z Mauritanie (Ennafaa et al., 2009). Songhajský vzorek a všechny fulbské vzorky sdílejí mutaci 5111T, což vedlo k vytvoření dalšího subkladu s názvem H1ca1a. Nepřítomnost mutace 12358G u vzorků FDia12, FAba16, FFE17 a FTin16 předpokládá zpětnou mutaci v této pozici. Zařazení vzorků do fylogenetického stromu je znázorněno na obrázku č. 6. Výsledky datování kladů obsahujících nově osekvenované genomy jsou uvedeny v tabulce č. 11 pro datování r0 statistiku a v tabulce č. 12 pro datování ML.

Tabulka 11: Datování H1ca a jejich subkladů pomocí r0 statistiky

Haploskupina (subklady)	Celkové		Synonymní	
	Věk (roky)	95% interval spolehlivosti (roky)	Věk (roky)	95% interval spolehlivosti (roky)
H1ca	14 893	[4 855–25 477]	17 202	[-1 957–36 360]
H1ca1	7 085	[1 355–13 020]	10 249	[-3 997–24 496]
H1ca1a	4 334	[788–7 964]	2 628	[-346–5 602]
H1ca1a1	642	[-614–1 909]	-	-

Tabulka 12: Datování H1ca a jejich subkladů pomocí ML (PAML)

Haploskupina (subklady)	Věk (roky)	95% interval spolehlivosti (roky)
H1ca	5 692	[3 863–7 543]
H1ca1	3 498	[1 589–5 432]
H1ca1a	2 305	[725–3 902]
H1ca1a1	426	[-408–1 265]



Obrázek 6: Zařazení nově osekvenovaných vzorků do fylogenetického stromu haploskupiny H1 a identifikace nových subkladů H1ca1, H1ca1a a H1ca1a1

Stáří H1ca bylo odhadnuto pomocí statistiky založené na rychlosti celé mtDNA na 14 893 let, což je vyšší, než u odhadu ML metodou (5 692 let). Ró statistikou pomocí synonymních molekulárních hodin byl věk H1ca odhadnut na 17 202 let, ovšem 95% konfidenční interval vykazuje velké rozpětí (až do záporných hodnot). Celkově lze říci, že stáří odhadnuté pomocí statistiky založené na rychlosti celé mtDNA je vyšší, než za použití ML. Věk kladu H1ca1a, který obsahuje výhradně nově osekvenované genomy v této práci, byl pomocí statistiky celé mtDNA odhadnut na 4 334 let a pomocí statistiky založené na rychlosti celé mtDNA na 4 334 let.

pouze synonymních mutací na 2 628 let, což se blíží odhadu podle ML (2 305 let). Subklad H1ca1a1 neobsahuje synonymní mutace a jeho stáří bylo určeno na 642 let pomocí statistikou a 426 let metodou ML.

9. Diskuze

9.1. MtDNA haploskupiny Fulbů určené podle HVS-I

Klasifikace HVS-I ukazuje, že 84,2% zkoumaného genofondu Fulbů je tvořeno subsaharskými haploskupinami. V největší míře jsou zastoupeny západoafrické haploskupiny: L3b, L1b, L3d, L2a, L2b a L3e (González et al., 2006; Rando et al., 1998; Rosa et al., 2004; Salas et al., 2002), což odpovídá dnešní oblasti výskytu Fulbů (Černý, 2006). Majoritní zastoupení západoafrických haploskupin u Fulbů bylo již prokázáno studií Černý et al. (2006), která analyzovala 186 fulbských vzorků z Kamerunu, Burkiny Faso a Čadu a prací Černý et al. (2011b) s počtem 432 jedinců. V předkládané diplomové práci byla tato databáze rozšířena o dalších 112 fulbských sekvencí.

Nejvíce zastoupená haploskupina u Fulbů L1b má kromě základního motivu 16126C-16187T-16189C-16223T-16264T-16270T-16278T-16293G-16311C i další méně zastoupené motivy. Motiv L1b obsahující navíc 16093C a další motiv s mutacemi 16213A a 16260T jsou charakteristické výhradně pro Fulby. To ukazuje i analýza jejich sdílení s jinými regiony Afriky v této práci, kde je vidět zastoupení v jiných regionech v počtu jeden jedinec (viz. Příloha č. 7). Podobné výsledky dokládají i jiné studie (Černý et al., 2011b; González et al., 2006; Rosa et al., 2004; Salas et al., 2002). I další subklady jako L2b1a, či L3b1a se zpětnou mutací v pozici 16124 (16093C-16223T-16278T-16362C) vykazují jak v této práci, tak v dalších studiích omezení na fulbské populace (Černý et al., 2011b; Rosa et al., 2004; Salas et al., 2002). Černý et al. (2011b) poukazuje na velkou genetickou homogenitu v rámci celé fulbské populace (jednotlivé skupiny vzdáleny tisíce kilometrů), ale také velkou diferenciaci od usedlých zemědělců západního sahelu a oblasti Čadské pánve. Z toho plyne, že i když je majoritním výskytem Fulbů západoafrický sahel a haploskupiny, kterých jsou nositeli, jsou zejména západoafrické, muselo dojít k období izolace, kdy se nahromadily mutace v mtDNA liniích mezi Fulby a zemědělci.

Již práce Rosa et al. (2004) poukázala na vyšší zastoupení eurasijské haploskupiny U5 u Fulbů. Studie Černý et al. (2006) potvrdila výskyt U5 a k tomu přidala i identifikaci haploskupin J1b, H a V. Tato eurasijská složka fulbského genofondu tvořila v jejich databázi 8,1%, což je více u okolních usedlých populací (Černý et al., 2006). V této diplomové práci je tato složka téměř stejná (8,6%). Nejvíce zastoupené eurasijské haploskupiny u Fulbů U5b1b1b (11 jedinců) a H3p (22 jedinců) budou rozebrány v následujících kapitolách.

U Fulbů byla nalezena i referenční sekvence H2a2a1 v počtu tří jedinců, která je sdílena velkým počtem sekvencí ze severozápadní Afriky a severovýchodní Afriky a Blízkého východu (viz. Tabulka č. 6), což odpovídá původu H2a v kavkazské oblasti a jejímu následnému šíření do Eurasie a severní Afriky (Cherni et al., 2009; Ennafaa et al., 2009). Autoři studie Behar et al. (2008a), kteří studovali židovskou diasporu, poukázali na limitace klasifikace haploskupin jako H2a2a1 podle HVS-I. Na základě HVS-I bylo určeno velké zastoupení rCRS u marockých Židů, což se ale nepotvrdilo při celogenomovém sekvenování mtDNA, kdy u tří náhodně vybraných vzorků H2a2a1 podle HVS-I bylo po celogenomovém sekvenování zjištěno, že každý z nich patří do jiného subkladu haploskupiny H (Behar et al., 2008a).

V této diplomové práci byly zjištěny i fulbské haplotypy (7,2%), které vykazují dvojitě zařazení do haploskupin, takže na základě HVS-I není jasné, zda se jedná o subsaharskou nebo eurasijskou haploskupinu. V případě 36 jedinců HVS-I obsahuje pouze dvě mutace 16223T a 16278T, které byly se stejnou spolehlivostí zařazeny jak do haploskupiny L2, tak do M51. Haploskupina L2 je typická subsaharská haploskupina rozšířená po celé Africe (Rosa and Brehem, 2010). Ovšem motiv 16223T-16278T nebyl nalezen ve větším zastoupení u populací severozápadní Afriky (2 jedinci), severovýchodní Afriky a Blízkého východu (1 jedinec) a východní Afriky (0 jedinců) v rámci analýzy sdílení haplotypů a ani u jiných sahelských populací (2 jedinci) (Černý et al., 2011b), což poukazuje na její omezení na fulbskou populaci stejně jako dříve zmiňované specifické motivy haploskupin L1b, L2b1a, či L3b1a+@16124. Tudiž by se ale mohlo jednat i o eurasijskou haploskupinu, jelikož fulbský genofond, jak již bylo několikrát zmíněno, eurasijské haploskupiny skutečně obsahuje. Otázkou by pak bylo, kde je zařazení motivu 16223T-16278T do haploskupiny M51 správné.

Haploskupina M51 se oddělila od společné větve M1'20'51 a její výskyt byl zaznamenán pouze na území jihovýchodní Asie (Peng et al., 2010; Zhang et al., 2013). Stáří M51 bylo datováno studií Zhang et al. (2013) na 35 207±13 866 let a studií Peng et al. (2010) na 22 100±5 900 let. V tomto rozmezí se dle různých publikací pohybuje i věk haploskupiny M1 ze stejného regionu (Gonder et al., 2007; Olivieri et al., 2006; Pennarun et al., 2012), která s M51 sdílí společného předka (Peng et al., 2010; Zhang et al., 2013). Šlo by tedy předpokládat, že M51 se dostala do Afriky přes Blízký východ společně s M1. Tomu ale neodpovídá distribuce M51 – absence na Blízkém východě a ve východní Africe. V severní Africe byli identifikováni pouze tři jedinci (viz. výše).

Je možné, že zařazení do haploskupiny podle HVS-I vůbec neodpovídá klasifikaci podle celé mtDNA a motiv 16223T-16278T tvoří zatím neidentifikovanou větev fylogenetického stromu. Pro tuto možnost svědčí i fakt, že pozice 16278 je *hotspot* a tudíž zde dochází ke konvergentní evoluci (Soares et al., 2009). Pro konkrétní závěry je ovšem potřeba osekvenovat celé mtDNA genomy nebo alespoň takovou část, která by ke správné klasifikaci dopomohla.

9.2. MtDNA haploskupiny Fulbů určené podle celé mtDNA a jejich datování

Haploskupiny U5b1b1b, H3p a HV0 (podle Černý et al. (2006) se jedná o subklad V), které v této práci tvoří 6,4% fulbského eurasijského genofondu, mají předpokládaný původ v oblasti frankokantaberského refugia, odkud se rozšířily po LGM do severní a západní Eurasie a severní Afriky (Achilli et al., 2005, 2004; Ennafaa et al., 2009; Torroni et al., 1998). V této kapitole budou rozebrány vzorky U5b1b1b a H3p, které byly vybrány na celogenomové sekvenování.

U haploskupiny U5b1b1b se klasifikace podle HVS-I potvrdila i po zjištění celkové sekvence mtDNA a nebyly zde nalezeny žádné nové subklady. Jak již bylo dříve řečeno, osekvenování celého mtDNA genomu může někdy ukázat na jinou haploskupinu než jakou naznačuje HVS-I (Ingman et al., 2000; van Oven and Kayser, 2009). To se stalo i v případě haploskupiny určené podle HVS-I jako H3p, kdy se podle celé sekvence ukázalo, že tvoří zatím neidentifikované subklady haploskupiny H1ca, které byly nazvány H1ca1, H1ca1a a H1ca1a1. Ve studii Černý et al. (2006) byly tyto klady identifikované jako J1b (haploskupina s původem na Blízkém východě), jelikož tehdy ještě nebyla dostupná databáze PhyloTree_{mt} (van Oven and Kayser, 2009) a program HaploGrep (Kloss-Brandstätter et al., 2011) a haploskupiny se odhadovaly pouze na základě srovnání s dostupnými studiemi.

Datování nově osekvenovaných haploskupin bylo provedeno jak pomocí statistiky, tak metodou maximální věrohodnosti. Již na první pohled je vidět značnou rozdílnost výsledků mezi těmito dvěma metodami, zejména u haploskupiny H1ca (viz. Tabulka č. 11 a č. 12).

Je možné, že tato nesrovnalost vznikla i kvůli na první pohled malému množství sekvencí H1ca. V této práci byly ovšem datované „koncové“ (velice mladé) větve fylogenetického stromu, což zodpovídá i za to, že jsou zastoupeny menším počtem vzorků. Nicméně HVS-I s mutacemi 16145A-16222T bylo u Fulbů v této práci nalezeno 22, ale osekvenovaných celých mtDNA bylo jen 8. Momentálně ještě pracujeme na kompletním

osekvenování zbylých vzorků, kterými rozšíříme databázi, jež budeme opět datovat a uvidíme jak/zdali se toto datování za využití *ró* statistiky a ML změní. Při tomto větším počtu vzorků máme v plánu využít i bayesovskou statistiku, přesněji program BEAST (Drummond and Rambaut, 2007) na určení změn N_e v čase podle panoramatického grafu BSP.

Když se podíváme na datování starších větví, kde je velký počet sekvencí, například L3 v práci Soares et al. (2012), která použila stejné metody datování a stejnou mutační rychlost jako tato diplomová práce, tak i zde jsou vidět velké rozdíly mezi *ró* statistikou a ML. Stáří L3 bylo určeno na 58 900 (51 100–66 900) let *ró* statistikou za použití mutační rychlosti celého genomu mtDNA, na 63 000 (51 100–75 300) let *ró* statistikou za použití mutační rychlosti synonymních mutací genomu mtDNA a na 70 200 (61 600–79 000) let za použití ML. V takovéto dávné minulosti nám ovšem rozdíl v datování 10 000 let nepřipadá tak zásadní. Kromě toho, i paleoklimatologické jevy v prehistorii bývají datovány v podobně širokých intervalech (Castañeda et al., 2009). Směrem k současnosti (například v období holocénu) již jsme schopni datovat změny klimatu (podle složení fauny a flóry, rozlohy jezer atd.) s větší přesností (Armitage et al., 2015; Kuper and Kröpelin, 2006; Vernet, 2002), a tím se zvyšuje i nutnost datovat populační divergence/expanze/migrace v užším intervalu, abychom je byli schopni zařadit do tohoto rámce. Ovšem datování haploskupin je ovlivňováno velkým množstvím parametrů a jednotlivé metody vždy zahrnují jenom některé z nich a proto se výsledné stáří tak liší.

Datování za využití synonymních molekulárních hodin v této práci poukazuje na malé množství synonymních mutací v tak mladých větvích, což se projevuje velmi širokým 95% konfidenčním intervalem zejména u haploskupiny H1ca a jejich subkladů (viz. Tabulka č. 11). Podobný trend je ale patrný i u haploskupiny U5b1b1b (viz. Tabulka č. 8) a i ve studii Soares et al. (2012) v mladších větvích než L3. Na jedné straně by mělo využití výhradně synonymních mutací eliminovat faktor selekce (Kivisild et al., 2006), na druhé straně se ale snižuje využití výpovědní hodnoty mtDNA, a tím klesá i přesnost datování (Soares et al., 2009). Kvůli těmto důvodům datování *ró* statistikou pomocí synonymních molekulárních hodin není použito (nebo pouze minimálně) k interpretaci historie haploskupin v následujících kapitolách.

I když je datování *ró* statistikou velice využívanou metodou, studie Cox (2008) ji značně zpochybnila. Důvodem je hlavně to, že *ró* statistika nebere v úvahu demografické události jako je efekt zakladatele, efekt hrdla láhve nebo změny N_e . Na modelových populacích ukazuje, že chyba prvního typu stoupá například s extrémním efektem hrdla

láhve, nebo s rostoucí N_e . Dále ukazuje, že stáří zjištěné pomocí statistikou je častokrát mírně podhodnocené s asymetrickým konfidenčním intervalem (Cox, 2008).

V této diplomové práci byl ovšem věk haploskupin určen pomocí statistikou za použití celé mtDNA vyšší než při využití ML. Zajímavé také je, že stáří haploskupiny H1 bylo určeno na 11 139 (9 255 – 13 043) let, zatímco subklad H1ca z něj vycházející na 14 893 (4 855–25 477) let. Je možné, že v H1ca se naakumulovala diverzita (relativně vyšší počet mutací), která způsobila při použití konstantní mutační rychlosti nadhodnocení stáří H1ca a jejich subkladů.

Datování metodou ML (v mém případě pomocí PAML) se jeví spolehlivější v tom, že poskytuje flexibilnější nastavení parametrů, jako je například použití vybraného evolučního modelu, možnost rozdílného datování hypervariabilních segmentů a zbytku molekuly atd (viz. Kapitola 5.2.).

Nicméně 95% konfidenční intervaly stáří haploskupin datovaných pomocí statistikou (celý mtDNA genom) a ML, se z velké části překrývají, což je využito při interpretaci historie zmiňovaných haploskupin v následující části.

9.2.1. Haploskupina U5b1

V kapitole 5.3.2. je ukázáno, že dosavadní poznatky o haploskupině U5 poukazují na její velkou populační expanzi po LGM až do začátku holocénu. To je dáno oteplením klimatu, které umožnilo, aby AMČ opustil refugia situované na jihu Eurasie, kde přežíval během LGM. V případě haploskupiny U5 se jednalo o frankokantaberské refugium na Pyrenejském poloostrově (Achilli et al., 2005; Malyarchuk et al., 2010; Pereira et al., 2010b; Torroni et al., 2006).

Na vznik po LGM ukazuje i stáří haploskupiny U5b1+16189¹¹ v této práci, což odpovídá datování 14 700 (8 300–21 200) let v studii Malyarchuk et al. (2010) a také závěrům prací dalších autorů (Achilli et al., 2005; Pereira et al., 2010b; Torroni et al., 2006). Co se týče haploskupiny U5b1b, i tu lze podle našeho datování na základě překryvu intervalů spolehlivosti stejně jako v práci Malyarchuk et al. (2010), kde bylo stáří určeno na 11 100 (4 700–17 600) let, zařadit do období pozdního glaciálu, tedy do období, kdy probíhala největší expanze U5 (Pereira et al., 2010b).

Subklad U5b1b1 byl datovaný pomocí statistikou prací Achilli et al. (2005) na 8 600±2 400 let a prací Malyarchuk et al. (2010) na 7 200 (3 700–10 800) let. V naší práci

¹¹ Haploskupina U5b1+16189 tvoří MRCA subkladů U5b1b, U5b1c a U5b1e, v studii Malyarchuk et al. (2010) je označovaná jako U5b1b'c'e.

byl určen věk 8 974 (4 116–13 971) let pomocí statistikou za použití celého mtDNA genomu a 4 908 (806–9 119) let za použití ML. Překryv těchto datování nicméně neukazuje na vznik v pozdním glaciálu, ale spíše až na přelomu staršího a středního holocénu (období boreálu nebo atlantiku). Ovšem U5b1b1 má subkady, které se vyskytují u Sámů v Skandinávii, Jakutů na Sibiři, Berberů v severní Africe a u Fulbů v subsaharské Africe (Achilli et al., 2005), a tedy místo původu U5b1b1 stále ukazuje na oblast v jihozápadní Eurasii s největší pravděpodobností na Pyrenejském poloostrově, jelikož odtud bylo možné se dostat přes Gibraltar do severní Afriky. Z toho lze usoudit, že oblast frankokantaberského refugia, potažmo Pyrenejského poloostrova sloužila jako zdroj populací od pozdního glaciálu až po střední holocén.

Fulbové jsou zastoupeni subkladem U5b1b1b (v této práci tvoří 2%), který nebyl nalezen při analýze sdílení haplotypů u žádné jiné populace (vyjma již zmiňovaného Songhajce, který byl také využit na celogenomové sekvenování mtDNA). Tento subklad je velice mladý, v této práci byl určen na cca 500 let, jak pomocí statistikou za použití synonymních mutací i celé mtDNA, tak ML. Proto také nově osekvenované genomy neobsahují téměř žádné specifické mutace. Ve fylogenetickém stromě na obrázku č. 5, je vidět zastoupení U5b1b1b i u Afroameričanů, což se dá vysvětlit vývozem otroků z Afriky do Ameriky v letech 1500–1850. Většina těchto otroků byla vyvezena ze západní subsaharské Afriky včetně západního sahelu a savan (Schroeder et al., 2015), kde v tom období již Fulbové žili (Černý, 2006).

9.2.2. Haploskupina H1ca

Podobně jako u U5b1 + 16189 a U5b1b, i u haploskupiny H1 je původ předpokládán v oblasti frankokantaberského refugia v období pozdního glaciálu a následné šíření a expanze této haploskupiny v Evropě a v severní Africe (Achilli et al., 2004; Cherni et al., 2009; Ennafaa et al., 2009; Ottoni et al., 2010; Pereira et al., 2005).

Nově osekvenované mtDNA genomy byly zařazeny do subkladu H1ca (s jedinou mutací 12358G), který byl složen ze vzorku Mauritánce (v publikaci Ennafaa et al. (2009) nebylo uvedeno etnikum) a vzorku Španěla z La Maragaty v provincii León na severu Španělska (Maca-Meyer et al., 2001), kde žije populace, která tvoří geneticky izolovanou skupinu (Larruga et al., 2001). V této diplomové práci byla H1ca datována pomocí statistikou za použití celé mtDNA na 14 893 (4 858–25 477) let a ML na 5 692 (3 862–7 542) let. Pokud se zaměříme na překryv 95% intervalů spolehlivosti, tak je předpokládán vznik H1ca na přelomu staršího a středního holocénu, podobně jako u U5b1b1. Podobně jako u U5b1b1

lze předpokládat i vznik H1ca na Pyrenejském poloostrově a následné šíření do Evropy a do severní Afriky.

Analýza sdílení haplotypů ukázala, že motiv 16145A-16222T (HVS-I), který tuto haploskupinu charakterizuje, byl nalezen v severozápadní Africe u dvou jedinců (zřejmě Berberů) v Tunisku a Alžírsku. Ovšem v Evropě kromě uvedeného vzorku z La Maragata subklad H1ca identifikován nebyl. Původ Maragatů je spojován s Berbery, protože jejich kulturní zvyklosti jsou jim podobné. Jedna z hypotéz o jejich původu praví, že jsou potomky Berberů, kteří se usadili na Pyrenejském poloostrově po muslimské invazi v 7.–8. století n. l. Genetické výzkumy ale naznačují, že africká komponenta Maragatů je mnohem starší, zřejmě z období neolitu a vyskytuje se i u dalších obyvatelů Pyrenejského poloostrova (Larruga et al., 2001). Na genový tok ze severní Afriky na Pyrenejský poloostrov z tohoto období poukazuje i studie Ennafaa et al. (2009). Z toho vyplývá, že část populace nesoucí haploskupinu H1 po LGM migrovala do severozápadní Afriky, kde dala vznik novým subkladům, mezi jinými i H1ca, který se pak zpětnou migrací dostal na Pyrenejský poloostrov, ale byl také přenesen na Saharu jako součást genofondu pozdějších Fulbů, stejně jako U5b1b1.

Subklad H1ca1 zahrnuje již pouze africké vzorky, je tvořen vzorkem Mauritance a společnou větví obsahující Fulby. Divergence proběhla zřejmě v oblasti Sahary během druhé poloviny středního holocénu. Sahara byla tehdy díky semiaridnímu podnebí obývaná pasteveckými populacemi (Kuper and Kröpelin, 2006). Společný subklad Fulbů H1ca1a, který byl datovaný pomocí statistiky za použití kompletní sekvence mtDNA na 4 334 (788–7 964) let a ML na 2 305 (725–3 902) let, vykazuje určitou radiaci, čili obsahuje 9 sekvencí, které se mezi sebou liší. Vzhledem k datování H1ca1a do období konce středního holocénu až začátku mladšího holocénu lze předpokládat, že subklad H1ca1a vznikl v čase, kdy pastevecké populace migrovaly z vysychající Sahary do klimaticky příznivějšího sahelu. Rozložení H1ca1a v celém západním sahelu naznačuje, že fulbská populace se po příchodu ze Sahary do sahelu rozmístila rovnoměrně. Tomu nasvědčuje i radiace H1ca1a.

9.3. Svědectví mtDNA, NRY a autozomů o původu Fulbů

Procentuální zastoupení H1ca1a a U5b1b1b (včetně HVS-I) ve zkoumaném souboru Fulbů je 6,1%. Jak vyplývá z kapitol 9.2.1. a 9.2.2., to, že se dostali předkové těchto haploskupin do sahelu, je dáno migrací v období holocénu. I když se jejich historie značně překrývá,

nelze říci s úplnou jistotou, zda migrovali společně již z Pyrenejského poloostrova, nebo se potkali až na území Sahary, kde na počátku středního holocénu vznikaly pastevecké populace (Kuper and Kröpelin, 2006; Vernet, 2002) a H1ca1 a U5b1b1 se podílely na formování (nebo tvořily základ) té fulbské. Během vysychání Sahary pak tato populace Fulbů migrovala do sahelu.

Práce Keinan and Reich (2010) a Tremblay and Vézina (2010) ukazují, že rozsáhlé migrace jako *out-of-Africa* nebo osídlování provincie Québec byly tvořeny v převážné míře muži, což je prokázáno větší variabilitou NRY (větším počtem paternálních zakladatelů) v porovnání s mtDNA (nebo s X chromozomem). Naopak variabilita nesená ženami u migrací klesá. Podobný rozdíl ve variabilitě uniparentálních znaků byl zjištěn i u Fulbů (Bučková et al., 2013; Černý et al., 2011b). Je tedy možné, že kvůli nižšímu počtu žen v migrující populaci byl příchod Fulbů do západního sahelu doprovázen přijetím žen z lokálních zdrojů nesoucích západoafrické haploskupiny, čímž došlo i k překrytí eurasijských mtDNA haploskupin, resp. byly téměř odstraněny genetickým driftem (Fajkošová, 2012). V tomto období dle Fajkošová (2012) došlo zřejmě i k přijetí nigerokonžského jazyka. Následně se už Fulbové vyvíjeli izolovaně od sahelských zemědělců (bez výraznějšího genového toku), což odpovídá jejich dnešní genetické diferenciaci (Černý et al., 2011b).

I studie, které zkoumají NRY, poukazují na přítomnost severoafrické/eurasijské komponenty Fulbů, která naznačuje saharskou migraci (Bučková et al., 2013; Hassan et al., 2008). Nicméně Hassan et al. (2008) zjistili také přítomnost východní komponenty NRY, což by ale mohlo být dáno tím, že použili pouze 26 fulbských vzorků a všechny byly výhradně ze Súdánu. Ovšem i práce Tishkoff et al. (2009), která se věnuje autosomálním mikrosatelitům a polymorfismům typu inserce/delece, řadí Fulby k súdánským a čadským populacím. Naopak Bučková et al. (2013) u NRY a Černý et al. (2007) u mtDNA tento vztah nenachází. Práce Tishkoff et al. (2009) však zaznamenala také přítomnost eurasijské (i západoafrické) komponenty u Fulbů. Pro eurasijský původ Fulbů svědčí i alela T-13910, zodpovědná za vznik laktázové persistence, která je typická pro evropské populace, ale ve zvýšené míře se vyskytuje i u Fulbů, ovšem u jiných afrických populací se vyskytuje pouze minimálně (Lokki et al., 2011; Ranciaro et al., 2014).

Celogenomová studie Triska et al. (2015), která zkoumala 2,5 milionu jednonukleotidových polymorfizmů (z angl. *Single Nucleotide Polymorphism*, SNP) u 13 sahelských populací (včetně Fulbů), potvrzuje severoafrický/eurasijský příspěvek u dnešní fulbské populace (23% zastoupení), která byla hodnocena ve větším geografickém areálu.

Dále také ukazuje na 55% západoafrickou komponentu Fulbů, zatímco východoafrická tvoří pouze 11%, což autoři studie vysvětlují kontakty se středoafriickými populacemi, od nichž byla východoafrická komponenta do fulbské populace přenesena (Triska et al., 2015).

Je tedy možné, že Fulbové z vysychající Sahary nejdříve přišli do západní Afriky, kde byla nalezena vyšší příbuznost v úrovni mtDNA (Černý et al., 2006), Y chromozomu (Bučková et al., 2013) i celého genomu (Triska et al., 2015), a později migrovali sahelským pásmem do Čadské pánve, čímž vzniklo dnešní rozšíření, včetně genetických příspěvků popsaných výše. Aby se stihly nahromadit mutace v jednotlivých vzorcích H1ca1a charakteristické pro danou oblast, kde byly vzorkovány, musely tyto dvě migrace probíhat v krátkém časovém rozmezí. Pak by ale expanze Fulbů z Futa Toro počínající 11. stoletím (viz. Kapitola 4.1.2.) byla pouze expanzí kulturní, ve smyslu formování etnika, nikoliv populační migrací (Fajkošová, 2012). Na druhé straně stáří haploskupin U5b1b1b a H1ca1a1, které jsou také rozmístěny v západním sahelu, bylo určeno na cca 500 let, což by ukazovalo, že tato expanze byla spíše populační migrací a zasáhla tyto haploskupiny v 15. století. Ovšem lze také předpokládat, že mezi jednotlivými pasteveckými populacemi byl od počátku silný genový tok, který se postaral o tuto homogenizaci (Černý et al., 2011b).

9.4. Fulbové a pastevectví

V předchozích kapitolách bylo naznačeno, že historie haploskupin U5b1b1 a H1ca ukazuje na původ určité frakce dnešních Fulbů v Evropě a její následnou migraci přes Gibraltar do severozápadní Afriky. Otázkou ovšem zůstává, jak a kde se Fulbové stali pastevcí, resp. jak se předkové Fulbů přichozí z Evropy dostali k hovězímu dobytku, k jejich hlavnímu zdroji obživy, který byl domestikován na Blízkém východě, pokud tedy nebereme do úvahy zatím geneticky neprokázanou možnost domestikace skotu v Egyptě (viz. Kapitola 3.2.4.).

Domestikace skotu *Bos taurus* na Blízkém východě byla datována do rozmezí před 10 000–13 000 lety. Následné rozšíření skotu z domestikačního centra kopíruje neolitické migrace AMČ z Blízkého východu (Bonfiglio et al., 2012). I když je původ haploskupin H a U předpokládán na Blízkém východě, jejich stáří a následné migrace byly určeny mnohem starší (před 20 000–40 000 lety) (Macaulay et al., 1999; Pereira et al., 2005; Richards et al., 2000). Z toho vyplývá, že není možné, aby se *Bos taurus* šířil společně

s nimi na Pyrenejský poloostrov a následně do severozápadní Afriky. Ovšem mohl se dostat na Pyrenejský poloostrov pozdější migrací s jinými haploskupinami a následně migrovat s H1 nebo s U5b1b1 do severní Afriky. To by ale došlo ke genovému toku, respektive začlenění těchto haploskupin do proto-fulbského genofondu.

Jak již bylo zmíněno, ve fulbském genofondu byly zjištěny ve větším zastoupení (36 jedinců) HVS-I haplotypy jenom se dvěma mutacemi 16223T-16278T, u kterých zatím nebyl určen ani původ ani datování. Na základě dostupných informací tedy nelze rozhodnout, zda se jedná o eurasijskou nebo subsaharskou haploskupinu. Tedy nelze zamítnout předpoklad, že tento haplotyp je eurasijského původu a mohl se podílet (nebo jeho MRCA) na formování proto-fulbského genofondu na území Sahary společně s H1ca a U5b1b1. Rovněž by se tedy mohlo jednat o haplotyp, s kterým se dostal do Afriky domestikovaný *Bos taurus*. Pokud by tento motiv patřil do haploskupiny M, jak bylo určeno podle HVS-I, tak lze vyloučit výše zmiňovanou neolitickou migraci na Pyrenejský poloostrov, jelikož M se na území Evropy nevyskytuje (Torroni et al., 2006). Pravděpodobnější by pak bylo, že motiv 16223T-16278T má původ v Asii a přes Blízký východ migroval do severní Afriky společně s *Bos taurus*, a až tam došlo k smíšení s H1ca1 a U5b1b1, a také začátku fulbského pastevectví.

I když se jedná pouze o úvahu, kterou povoluje mezera v dosavadních poznatcích, nutno říci, že práce Fajkošová (2012) na základě Alu inzercí předpokládá, že Fulbové se do sahelu dostali migrací ze severovýchodní Sahary. Podobné výsledky, tedy určitou příbuznost Fulbů se severovýchodními populacemi, zjistila i moje kolegyně Martina Čížková (osobní sdělení), která se ve svém doktorském studiu také věnuje Alu inzercím a rozšířila dataset populací použitý v práci Fajkošová (2012). Na úrovni mtDNA by se tedy tato severovýchodní komponenta mohla projevit právě motivem 16223T-16278T (nebo jeho MRCA) příchodem z Blízkého východu a následnou izolací (omezení na fulbské populace), jelikož nebyl ve větší míře nalezen v jiných afrických regionech (viz. Kapitola 9.1.). Jen pro úplnost dodám, že celogenomová studie Petra Třísky, která zjistila 23% severoafrickou/eurasijskou komponentu u Fulbů, použila populace Mozabitů z Alžírka, tedy ze severozápadní Afriky (Triska et al., 2015).

9.5. Songhajci

Kromě fulbských vzorků byly v této práci použity i dva songhajské vzorky, které po osekvenování celé mtDNA byly zařazeny do stejných haploskupin H1ca1a a U5b1b1b jako

Fulbové. Tato kapitola je zaměřená na to, proč se haploskupiny kočovných Fulbů nacházejí také u usedlých songhajských zemědělců.

Songhajci žijí zejména v jihovýchodním Mali v oblasti vnitřní delty Nigeru, v západním Nigeru, ale v menším zastoupení také v Beninu, Burkině Faso a Nigérii. Dohromady jejich populace čítá na 1 500 000 jedinců (Nave, 2010). Samotná oblast jejich výskytu v povodí řeky Niger se překrývá s oblastí, kudy Fulbové migrovali do Čadské pánve (Černý, 2006), takže recentní genový tok může být nejjednodušším vysvětlením přítomnosti fulbských haploskupin u Songhajců.

Diplomová práce Fajkošová (2012) porovnáváním Alu inzercí Songhajců s jinými sahelskými populacemi zjistila, že Songhajci se výrazně neliší od žádné studované populace, a tedy ani od Fulbů, což na základě mtDNA a krátkých tandemových repetitivních sekvencí Y chromozomu (z angl. *Short Tandem Repeats*, STR) potvrzuje i studie Černý et al. (2011b). To lze vysvětlit zahrnutím různých populací do Songhajské říše, která se zejména v 15.–16. století n. l. rozprostírala ve velké části západního sahelu, kde se nejspíše songhajské etnikum utvářelo (Černý, 2006; Nave, 2010). Z toho vyplývá, že Songhajci vznikli poměrně nedávno smíšením různých sahelských populací (Fajkošová, 2012), a tím se vysvětluje i příměs fulbských haploskupin. Navíc, i zařazení songhajštiny do nilosaharské jazykové skupiny je sporné. Někteří autoři se domnívají, že vznikla na afroasijském základě jako *lingua franca*¹² (Nicolai, 2005), což také poukazuje na populační míšení.

¹² Nadregionální dorozumívací jazyk; jazyk využívaný nad rámec rodilých mluvčích.

10. Závěr

Tato diplomová práce je zaměřená na dvě mtDNA haploskupiny eurasijského původu vyskytující se v převážné míře u Fulbů, kteří se dodnes v africkém sahelu věnují kočovnému pastevectví. Na prvotní analýzu bylo použito 544 vzorků nepříbuzných fulbských jedinců. Na základě klasifikace haploskupin podle HVS-I jsme potvrdili výsledky dřívějších studií (Cerezo et al., 2011; Černý et al., 2011b, 2006; Rosa et al., 2004), které ukazují, že většina mitochondriálního fulbského genofondu je tvořena západoafrickými haploskupinami, a že se zde nacházejí i haploskupiny eurasijského původu. Zastoupení eurasijských haploskupin v námi zkoumaném souboru dosáhlo 8,6%.

Analýza sdílení mtDNA haplotypů se severozápadní Afrikou, severovýchodní Afrikou a Blízkým východem a východní Afrikou nepoukázala na žádnou větší shodu Fulbů a těchto regionů. Nicméně v menší míře naznačila jejich spříznění se severozápadní Afrikou.

Pro sekvenování celých mitochondriálních genomů byly vybrány fulbské vzorky z předchozích analýz klasifikované podle HVS-I jako H3p a U5b1b1b. K těmto vzorkům byly přidány ještě dva vzorky sahelských zemědělců Songhajců klasifikované do stejných haploskupin. Na základě celé sekvence mtDNA se potvrdilo zařazení podle HVS-I u haploskupiny U5b1b1b, ovšem vzorky označené původně jako H3p byly na základě celé mtDNA zařazeny do haploskupiny H1, přesněji H1ca. Podle přítomných mutací byly zavedeny nové subklady nazvané H1ca1, H1ca1a a H1ca1a1.

Identifikované klady pocházejí z haploskupin U5b1+16189 a H1, které se formovaly v oblasti Pyrenejského poloostrova, ve frankokantaberském refugiu v období posledního glaciálního maxima a posléze se rozšířily jak do Eurasie, tak do severní Afriky (např. Achilli et al., 2005, 2004; Pereira et al., 2005). Datování a fylogeografická interpretace ukázala na vznik H1ca ve starším až středním holocénu v severozápadní Africe a na vznik U5b1b1 na území Pyrenejského poloostrova v přibližně stejném období.

Klimaticky příznivé podmínky staršího a středního holocénu umožnily osídlování Sahary (Kuper and Kröpelin, 2006; Vernet, 2002). Tato práce předpokládá, že nositelky haploskupin U5b1b1 a H1ca během tohoto klimaticky příznivého období migrovaly na Saharu, kde přispěly k formování fulbské populace. Severoafrický/eurasijský původ části dnešní fulbské populace podporují i studie NRY Bučková et al. (2013) a celogenomová studie SNP Triska et al. (2015). Na základě velkého zastoupení západoafrických mtDNA a NRY haploskupin, lze usoudit, že ze Sahary migrovala původní pastevecká populace do

západní Afriky, kde přijala nigerokonžský jazyk, a kde se mohla zformovat i fulbská identita (Fajkošová, 2012). Fulbští pastevcí posléze osídlili celý západní sahel až po Čadské jezero, kde byla ovšem ekologická nika jejich pastevecké subsistence obsazována arabskými kmeny (Owens, 1996). Fulbská expanze se tudíž stočila povodím Šari a Logone do Středoafričské republiky, odkud několik menších skupin proniklo až do povodí Modrého Nilu v Súdánu.

Zdá se, že Fulbové se patrně vlivem pastevectví vyvíjeli víceméně v izolaci od ostatních, převážně zemědělských populací. Otázkou ovšem zůstává, zda expanze Fulbů v sahelu, která začala v 11. století, byla skutečně expanzí ve smyslu populační migrace Fulbů, nebo se jednalo pouze o formování fulbského etnika a k rozmístění Fulbů v sahelu došlo již mnohem dříve, jak napovídá haploskupina H1ca1a a celogenomová studie Triska et al. (2015).

I když se předkové fulbských haploskupin U5b1b1b a H1ca1a do severní Afriky dostali z Pyrenejského poloostrova (např. Achilli et al., 2005, 2004; Pereira et al., 2005), genetické výzkumy skotu *Bos taurus* ukazují na jeho domestikaci počátkem holocénu v oblasti Blízkého východu. Naskytá se tedy možnost, že předkové zatím neprobádaných fulbských vzorků s HVS-I motivem 16223T-16278T putovali přes Blízký východ do severní Afriky, kde se společně s U5b1b1 a H1ca1 podíleli na počátcích fulbského pastevectví. Takovou hypotézu by ovšem bylo možné ověřit až další fylogeografickou analýzou kompletních sekvencí těchto vzorků.

11. Seznam použitých zkratek

A	adenín
aDNA	DNA z archeologických vzorků (z angl. <i>ancient DNA</i>)
AMČ	anatomicky moderní člověk
AV ČR	Akademie věd České republiky
BP	před přítomností (z angl. <i>Before Present</i>)
bp	parů bazí (z angl. <i>base pair</i>)
BSP	Bayesovský graf změn N_e v čase (z angl. <i>Bayesian skyline plot</i>)
C	cytosin
dNTP	deoxynukleosidtrifosfátů
G	guanin
HKY85	Hasagawův-Kihinův-Yanův model
HVS-I	hypervariabilní segment I
HVS-II	hypervariabilní segment II
IPATIMUP	Institut molekulární patologie a imunologie University v Portu (z angl. <i>Institute of Molecular Pathology and Immunology of the University of Porto</i>)
LGM	poslední glaciální maximum (z angl. <i>Last Glacial Maximum</i>)
STR	krátkých tandemových repetitív Y chromozomu (z angl. <i>Short Tandem Repeats</i>)
ML	metoda maximální pravděpodobnosti (z angl. <i>Maximum Likelihood</i>)
MP	metoda maximální úspornosti (z angl. <i>Maximum Parsimony</i>)
MRCA	poslední společný předek (z angl. <i>the Most Recent Common Ancestor</i>)
mtDNA	mitochondriální DNA
N_e	efektivní velikost populace
n. l.	našeho letopočtu
NR1	nerekombinantní část Y chromozomu (z angl. <i>non-recombinig region of the Y chromosome</i>)
PAML	fylogenetická analýza za použití maximální pravděpodobnosti (z angl. <i>Phylogenetic Analysis by Maximum Likelihood</i>)
PCR	polymerázová řetězová reakce (z angl. <i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PřF UK	Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy
rCRS	revidovaná Cambridžská referenční sekvence

	(z angl. <i>revised Cambridge reference sequence</i>)
rRNA	ribozomální RNA
RSRS	rekonstruovaná sapientní referenční sekvence (z angl. <i>Reconstructed Sapiens Reference Sequence</i>)
SNP	jednonukleotidový polymorfismus (z angl. <i>Single Nucleotide Polymorphism</i>)
T	tymín
TAS2R	chuťové receptory 2 (z angl. <i>TAS2 Receptor</i>)
TBE	Tris-Borátový pufr
tRNA	transferová RNA

12. Seznam použité literatury

- Achilli, A., Rengo, C., Battaglia, V., Pala, M., Olivieri, A., Fornarino, S., Magri, C., Scozzari, R., Babudri, N., Santachiara-Benerecetti, A.S., Bandelt, H.-J., Semino, O., Torroni, A., 2005. Saami and Berbers—An Unexpected Mitochondrial DNA Link. *Am J Hum Genet* 76, 883–886.
- Achilli, A., Rengo, C., Magri, C., Battaglia, V., Olivieri, A., Scozzari, R., Cruciani, F., Zeviani, M., Briem, E., Carelli, V., Moral, P., Dugoujon, J.-M., Roostalu, U., Loogväli, E.-L., Kivisild, T., Bandelt, H.-J., Richards, M., Villems, R., Santachiara-Benerecetti, A.S., Semino, O., Torroni, A., 2004. The molecular dissection of mtDNA haplogroup H confirms that the Franco-Cantabrian glacial refuge was a major source for the European gene pool. *Am J Hum Genet* 75, 910–918.
- Allen, J.F., Paula, W.B.M. de, 2013. Mitochondrial genome function and maternal inheritance. *Biochemical Society Transactions* 41, 1298–1304.
- Anderson, S., Bankier, A.T., Barrell, B.G., de Bruijn, M.H., Coulson, A.R., Drouin, J., Eperon, I.C., Nierlich, D.P., Roe, B.A., Sanger, F., Schreier, P.H., Smith, A.J., Staden, R., Young, I.G., 1981. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature* 290, 457–465.
- Andrews, R.M., Kubacka, I., Chinnery, P.F., Lightowlers, R.N., Turnbull, D.M., Howell, N., 1999. Reanalysis and revision of the Cambridge reference sequence for human mitochondrial DNA. *Nature genetics* 23, 147–147.
- Armitage, S.J., Bristow, C.S., Drake, N.A., 2015. West African monsoon dynamics inferred from abrupt fluctuations of Lake Mega-Chad. *PNAS* 112, 8543–8548.
- Armitage, S.J., Jasim, S.A., Marks, A.E., Parker, A.G., Usik, V.I., Uerpmann, H.-P., 2011. The Southern Route “Out of Africa”: Evidence for an Early Expansion of Modern Humans into Arabia. *Science* 331, 453–456.
- Ashford, R.W., 2000. Parasites as indicators of human biology and evolution. *J Med Microbiol* 49, 771–772.
- Avise, J.C., 2000. *Phylogeography: The History and Formation of Species*. Harvard University Press.
- Bandelt, H.J., Forster, P., Röhl, A., 1999. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Mol Biol Evol* 16, 37–48.
- Bandelt, H.J., Forster, P., Sykes, B.C., Richards, M.B., 1995. Mitochondrial portraits of human populations using median networks. *Genetics* 141, 743–753.
- Bandelt, H.-J., Kloss-Brandstätter, A., Richards, M.B., Yao, Y.-G., Logan, I., 2014. The case for the continuing use of the revised Cambridge Reference Sequence (rCRS) and the standardization of notation in human mitochondrial DNA studies. *J Hum Genet* 59, 66–77.
- Barbieri, C., Vicente, M., Rocha, J., Mpoloka, S.W., Stoneking, M., Pakendorf, B., 2013. Ancient substructure in early mtDNA lineages of southern Africa. *Am J Hum Genet* 92, 285–292.
- Barrick, J.E., Lenski, R.E., 2013. Genome dynamics during experimental evolution. *Nat Rev Genet* 14, 827–839.
- Bárta, M., 2010. *Plavci v písku - K neolitickým počátkům staroegyptské mytologie a symbolismu*. Dryada.
- Batello, C., Marzot, M., Touré, A.H., Kenmore, P.E., Nations, F. and A.O. of the U., 2004. *The Future is an Ancient Lake: Traditional Knowledge, Biodiversity and Genetic Resources for Food and Agriculture in Lake Chad Basin Ecosystems*. Food & Agriculture Org.

- Batzer, M.A., Stoneking, M., Alegria-Hartman, M., Bazan, H., Kass, D.H., Shaikh, T.H., Novick, G.E., Ioannou, P.A., Scheer, W.D., Herrera, R.J., 1994. African origin of human-specific polymorphic Alu insertions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 12288–12292.
- Behar, D.M., Metspalu, E., Kivisild, T., Rosset, S., Tzur, S., Hadid, Y., Yudkovsky, G., Rosengarten, D., Pereira, L., Amorim, A., Kutuev, I., Gurwitz, D., Bonne-Tamir, B., Villems, R., Skorecki, K., 2008a. Counting the Founders: The Matrilineal Genetic Ancestry of the Jewish Diaspora. *PLOS ONE* 3, e2062.
- Behar, D.M., van Oven, M., Rosset, S., Metspalu, M., Loogväli, E.-L., Silva, N.M., Kivisild, T., Torroni, A., Villems, R., 2012. A “Copernican” reassessment of the human mitochondrial DNA tree from its root. *Am J Hum Genet* 90, 675–684.
- Behar, D.M., Villems, R., Soodyall, H., Blue-Smith, J., Pereira, L., Metspalu, E., Scozzari, R., Makkani, H., Tzur, S., Comas, D., Bertranpetit, J., Quintana-Murci, L., Tyler-Smith, C., Wells, R.S., Rosset, S., 2008b. The Dawn of Human Matrilineal Diversity. *Am J Hum Genet* 82, 1130–1140.
- Binns, T., Dixon, A., Nel, E., 2012. *Africa: Diversity and Development*. Routledge.
- Blench, R., 2006. *Archaeology, Language, and the African Past*. Rowman Altamira.
- Bonfiglio, S., Ginja, C., Gaetano, A.D., Achilli, A., Olivieri, A., Colli, L., Tesfaye, K., Agha, S.H., Gama, L.T., Cattonaro, F., Penedo, M.C.T., Ajmone-Marsan, P., Torroni, A., Ferretti, L., 2012. Origin and Spread of *Bos taurus*: New Clues from Mitochondrial Genomes Belonging to Haplogroup T1. *PLOS ONE* 7, e38601.
- Boström, S., Giusti, P., Arama, C., Persson, J.-O., Dara, V., Traore, B., Dolo, A., Doumbo, O., Troye-Blomberg, M., 2012. Changes in the levels of cytokines, chemokines and malaria-specific antibodies in response to *Plasmodium falciparum* infection in children living in sympatry in Mali. *Malaria Journal* 11, 109.
- Boutrais, J., 1994. Pour une nouvelle cartographie des Peuls. *Cahiers d'études africaines* 34, 137–146.
- Brown, W.M., George, M., Wilson, A.C., 1979. Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. *PNAS* 76, 1967–1971.
- Bučková, J., Cerný, V., Novelletto, A., 2013. Multiple and differentiated contributions to the male gene pool of pastoral and farmer populations of the African Sahel. *Am J Phys Anthropol* 151, 10–21.
- Castañeda, I.S., Mulitza, S., Schefuß, E., Santos, R.A.L. dos, Damsté, J.S.S., Schouten, S., 2009. Wet phases in the Sahara/Sahel region and human migration patterns in North Africa. *PNAS* 106, 20159–20163.
- Cerezo, M., Černý, V., Carracedo, Á., Salas, A., 2011. New Insights into the Lake Chad Basin Population Structure Revealed by High-Throughput Genotyping of Mitochondrial DNA Coding SNPs. *PLoS One* 6, e18682.
- Černý, V., 2006. Lidé od Čadského jezera. *Academia*.
- Černý, V., Hájek, M., Bromová, M., Cmejla, R., Diallo, I., Brdicka, R., 2006. MtDNA of Fulani nomads and their genetic relationships to neighboring sedentary populations. *Hum Biol* 78, 9–27.
- Černý, V., Mulligan, C.J., Fernandes, V., Silva, N.M., Alshamali, F., Non, A., Harich, N., Cherni, L., Gaaied, A.B.A.E., Al-Meerri, A., Pereira, L., 2011a. Internal diversification of mitochondrial haplogroup R0a reveals post-Last Glacial Maximum demographic expansions in South Arabia. *Mol Biol Evol* 28, 71-8.
- Černý V, Pereira L. 2014. Archaeogenetics of Africa and of the African Hunter-Gatherers. In: Cummings V, Jordan P, Zvelebil M, editors. *The Oxford Handbook of the Archaeology and Anthropology of Hunter-Gatherers*. Oxford University Press.

- Černý, V., Pereira, L., Musilová, E., Kujanová, M., Vašíková, A., Blasi, P., Garofalo, L., Soares, P., Diallo, I., Brdička, R., Novelletto, A., 2011b. Genetic Structure of Pastoral and Farmer Populations in the African Sahel. *Mol Biol Evol* 28, 2491–2500.
- Černý, V., Salas, A., Hájek, M., Žaloudková, M., Brdička, R., 2007. A Bidirectional Corridor in the Sahel-Sudan Belt and the Distinctive Features of the Chad Basin Populations: A History Revealed by the Mitochondrial DNA Genome. *Annals of Human Genetics* 71, 433–452.
- Cherif, M., Amoako-Sakyi, D., Dolo, A., Pearson, J.-O., Gyan, B., Obiri-Yeboah, D., Nebie, I., Sirima, S.B., Doumbo, O., Troye-Blomberg, M., Bakary, M., 2016. Distribution of FcγR gene polymorphisms among two sympatric populations in Mali: differing allele frequencies, associations with malariometric indices and implications for genetic susceptibility to malaria. *Malar J* 15, 29.
- Cherni, L., Fernandes, V., Pereira, J.B., Costa, M.D., Goios, A., Frigi, S., Yacoubi-Loueslati, B., Amor, M.B., Slama, A., Amorim, A., El Gaaied, A.B.A., Pereira, L., 2009. Post-last glacial maximum expansion from Iberia to North Africa revealed by fine characterization of mtDNA H haplogroup in Tunisia. *Am J Phys Anthropol* 139, 253–260.
- Consortium, T. 1000 G.P., 2012. An integrated map of genetic variation from 1,092 human genomes. *Nature* 491, 56–65.
- Cox, M.P., 2008. Accuracy of molecular dating with the rho statistic: deviations from coalescent expectations under a range of demographic models. *Hum Biol* 80, 335–357.
- Decker, J.E., McKay, S.D., Rolf, M.M., Kim, J., Alcalá, A.M., Sonstegard, T.S., Hanotte, O., Götherström, A., Seabury, C.M., Praharani, L., Babar, M.E., Regitano, L.C. de A., Yildiz, M.A., Heaton, M.P., Liu, W.-S., Lei, C.-Z., Reecy, J.M., Saif-Ur-Rehman, M., Schnabel, R.D., Taylor, J.F., 2014. Worldwide Patterns of Ancestry, Divergence, and Admixture in Domesticated Cattle. *PLOS Genet* 10, e1004254.
- Delmet, C., 1994. Sur la route du pèlerinage: les Peuls au Soudan. *Cahiers d'études africaines* 34, 473–481.
- di Lernia, S., Gallinaro, M., 2010. The date and context of Neolithic rock art in the Sahara: engravings and ceremonial monuments from Messak Settafet (south-west Libya). *Antiquity* 84, 954–975.
- Drake, N.A., Blench, R.M., Armitage, S.J., Bristow, C.S., White, K.H., 2011. Ancient watercourses and biogeography of the Sahara explain the peopling of the desert. *PNAS* 108, 458–462.
- Drummond, A.J., Rambaut, A., 2007. BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC Evolutionary Biology* 7, 214.
- Dunne, J., Evershed, R.P., Salque, M., Cramp, L., Bruni, S., Ryan, K., Biagetti, S., di Lernia, S., 2012. First dairying in green Saharan Africa in the fifth millennium BC. *Nature* 486, 390–394.
- Dupire, M., 1962. Peuls nomades: étude descriptive des Wodaabe du Sahel nigérien. KARTHALA Editions.
- Endicott, P., Ho, S.Y.W., 2008. A Bayesian Evaluation of Human Mitochondrial Substitution Rates. *Am J Hum Genet* 82, 895–902.
- Ennafaa, H., Cabrera, V.M., Abu-Amero, K.K., González, A.M., Amor, M.B., Bouhaha, R., Dzimiri, N., Elgaaied, A.B., Larruga, J.M., 2009. Mitochondrial DNA haplogroup H structure in North Africa. *BMC Genetics* 10, 8.
- Fajkošová, Z., 2012. Populační struktura afrických populací hodnocená pomocí Alu inzercí. Univerzita Karlova.

- Fernandes, V., Alshamali, F., Alves, M., Costa, M.D., Pereira, J.B., Silva, N.M., Cherni, L., Harich, N., Cerny, V., Soares, P., Richards, M.B., Pereira, L., 2012. The Arabian cradle: mitochondrial relicts of the first steps along the southern route out of Africa. *Am J Hum Genet* 90, 347–355.
- Fernandes, V., Triska, P., Pereira, J.B., Alshamali, F., Rito, T., Machado, A., Fajkošová, Z., Cavadas, B., Černý, V., Soares, P., Richards, M.B., Pereira, L., 2015. Genetic Stratigraphy of Key Demographic Events in Arabia. *PLOS ONE* 10, e0118625.
- Forster, P., Harding, R., Torroni, A., Bandelt, H.J., 1996. Origin and evolution of Native American mtDNA variation: a reappraisal. *Am J Hum Genet* 59, 935–945.
- Freeman, A.R., Bradley, D.G., Nagda, S., Gibson, J.P., Hanotte, O., 2006. Combination of multiple microsatellite data sets to investigate genetic diversity and admixture of domestic cattle. *Animal Genetics* 37, 1–9.
- Fu, Q., Mittnik, A., Johnson, P.L.F., Bos, K., Lari, M., Bollongino, R., Sun, C., Giemsch, L., Schmitz, R., Burger, J., Ronchitelli, A.M., Martini, F., Cremonesi, R.G., Svoboda, J., Bauer, P., Caramelli, D., Castellano, S., Reich, D., Pääbo, S., Krause, J., 2013. A Revised Timescale for Human Evolution Based on Ancient Mitochondrial Genomes. *Current Biology* 23, 553–559.
- Galtier, N., Enard, D., Radondy, Y., Bazin, E., Belkhir, K., 2006. Mutation hot spots in mammalian mitochondrial DNA. *Genome Res* 16, 215–222.
- Gautier, A., 2002. The Evidence for the Earliest Livestock in North Africa: or Adventures with Large Bovids, Ovicaprids, Dogs and Pigs, in: Hassan, F.A. (Ed.), *Droughts, Food and Culture*. Springer US, pp. 195–207.
- GE Healthcare Life Sciences “illustra GenomiPhi V2 DNA Amplification Kit” [online], Dostupné z : <http://www.gelifesciences.com/webapp/wcs/stores/servlet/ProductDisplay?categoryId=11760&catalogId=10101&productId=16103&storeId=11786&langId=-1> [cit. 13.3. 2016].
- Giles, R.E., Blanc, H., Cann, H.M., Wallace, D.C., 1980. Maternal inheritance of human mitochondrial DNA. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 77, 6715–6719.
- Gonder, M.K., Mortensen, H.M., Reed, F.A., de Sousa, A., Tishkoff, S.A., 2007. Whole-mtDNA genome sequence analysis of ancient African lineages. *Mol Biol Evol* 24, 757–768.
- González, A.M., Cabrera, V.M., Larruga, J.M., Tounkara, A., Noumsi, G., Thomas, B.N., Moulds, J.M., 2006. Mitochondrial DNA variation in Mauritania and Mali and their genetic relationship to other Western Africa populations. *Ann Hum Genet* 70, 631–657.
- González, A.M., Larruga, J.M., Abu-Amero, K.K., Shi, Y., Pestano, J., Cabrera, V.M., 2007. Mitochondrial lineage M1 traces an early human backflow to Africa. *BMC Genomics* 8, 223.
- Grant, R., 2014. *Africa: Geographies of Change*. Oxford University Press Inc, United States.
- Grosz-Ngaté, M., Hanson, J.H., O’Meara, P., 2014. *Africa, Fourth Edition*. Indiana University Press.
- Hampaté Ba, A., Dieterlen, G., 1966. Les fresques d’époque bovidienne du Tassili N’Ajjer et les traditions des Peul : hypothèses d’interprétation. *Journal de la Société des Africanistes* 36, 141–157.
- Hampshire, K.R., Smith, M.T., 2001. Consanguineous Marriage among the Fulani. *Human Biology* 73, 597–603.

- Harrison, A., 2003. Fulfulde Language Family Report [online]. SIL International. Dostupné z: <http://www-01.sil.org/silesr/2003/silesr2003-009.html#introduction> [cit. 24. 2. 2016].
- Hasegawa, M., Kishino, H., Yano, T., 1985. Dating of the human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA. *J Mol Evol* 22, 160–174.
- Hassan, F.A., 2002. Palaeoclimate, food and culture change in Africa: an overview. Springer.
- Hassan, H.Y., Underhill, P.A., Cavalli-Sforza, L.L., Ibrahim, M.E., 2008. Y-chromosome variation among Sudanese: restricted gene flow, concordance with language, geography, and history. *Am J Phys Anthropol* 137, 316–323.
- Heyer, E., Zietkiewicz, E., Rochowski, A., Yotova, V., Puymirat, J., Labuda, D., 2001. Phylogenetic and Familial Estimates of Mitochondrial Substitution Rates: Study of Control Region Mutations in Deep-Rooting Pedigrees. *Am J Hum Genet* 69, 1113–1126.
- Hickerson, M.J., Carstens, B.C., Cavender-Bares, J., Crandall, K.A., Graham, C.H., Johnson, J.B., Rissler, L., Victoriano, P.F., Yoder, A.D., 2010. Phylogeography's past, present, and future: 10 years after Avise, 2000. *Mol Phylogenet Evol* 54, 291–301.
- Ho, S.Y.W., Endicott, P., 2008. The Crucial Role of Calibration in Molecular Date Estimates for the Peopling of the Americas. *Am J Hum Genet* 83, 142–146.
- Ho, S.Y.W., Lanfear, R., Bromham, L., Phillips, M.J., Soubrier, J., Rodrigo, A.G., Cooper, A., 2011. Time-dependent rates of molecular evolution. *Molecular Ecology* 20, 3087–3101.
- Hudjashov, G., Kivisild, T., Underhill, P.A., Endicott, P., Sanchez, J.J., Lin, A.A., Shen, P., Oefner, P., Renfrew, C., Villems, R., Forster, P., 2007. Revealing the prehistoric settlement of Australia by Y chromosome and mtDNA analysis. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 104, 8726–8730.
- Ingman, M., Kaessmann, H., Pääbo, S., Gyllensten, U., 2000. Mitochondrial genome variation and the origin of modern humans. *Nature* 408, 708–713.
- Jackson, B.A., Wilson, J.L., Kirbah, S., Sidney, S.S., Rosenberger, J., Bassie, L., Alie, J.A.D., McLean, D.C., Garvey, W.T., Ely, B., 2005. Mitochondrial DNA genetic diversity among four ethnic groups in Sierra Leone. *Am J Phys Anthropol* 128, 156–163.
- Jobling, M., Hollox, E., Hurles, M., Kivisild, T., Tyler-Smith, C., 2014. *Human Evolutionary Genetics*, Second Edition. Garland Science.
- Just, R.S., Diegoli, T.M., Saunier, J.L., Irwin, J.A., Parsons, T.J., 2008. Complete mitochondrial genome sequences for 265 African American and US “Hispanic” individuals. *Forensic Science International: Genetics* 2, e45–e48.
- Keinan, A., Reich, D., 2010. Can a Sex-Biased Human Demography Account for the Reduced Effective Population Size of Chromosome X in Non-Africans? *Mol Biol Evol* 27, 2312–2321.
- Kelly, R.F., Hamman, S.M., Morgan, K.L., Nkongho, E.F., Ngwa, V.N., Tanya, V., Andu, W.N., Sander, M., Ndip, L., Handel, I.G., Mazeri, S., Muwonge, A., Bronsvort, B.M. de C., 2016. Knowledge of Bovine Tuberculosis, Cattle Husbandry and Dairy Practices amongst Pastoralists and Small-Scale Dairy Farmers in Cameroon. *PLoS ONE* 11, e0146538.
- Kim, U., Wooding, S., Ricci, D., Jorde, L.B., Drayna, D., 2005. Worldwide haplotype diversity and coding sequence variation at human bitter taste receptor loci. *Hum Mutat* 26, 199–204.

- Kimura, M., 1984. *The Neutral Theory of Molecular Evolution*. Cambridge University Press.
- Kivisild, T., 2015. Maternal ancestry and population history from whole mitochondrial genomes. *Investigative Genetics* 6, 3.
- Kivisild, T., Reidla, M., Metspalu, E., Rosa, A., Brehm, A., Pennarun, E., Parik, J., Geberhiwot, T., Usanga, E., Villems, R., 2004. Ethiopian mitochondrial DNA heritage: tracking gene flow across and around the gate of tears. *Am J Hum Genet* 75, 752–770.
- Kivisild, T., Shen, P., Wall, D.P., Do, B., Sung, R., Davis, K., Passarino, G., Underhill, P.A., Scharfe, C., Torroni, A., Scozzari, R., Modiano, D., Coppa, A., de Knijff, P., Feldman, M., Cavalli-Sforza, L.L., Oefner, P.J., 2006. The Role of Selection in the Evolution of Human Mitochondrial Genomes. *Genetics* 172, 373–387.
- Kloss-Brandstätter, A., Pacher, D., Schönherr, S., Weissensteiner, H., Binna, R., Specht, G., Kronenberg, F., 2011. HaploGrep: a fast and reliable algorithm for automatic classification of mitochondrial DNA haplogroups. *Hum Mutat* 32, 25–32.
- Kujanová, M., Pereira, L., Fernandes, V., Pereira, J.B., Černý, V., 2009. Near Eastern Neolithic genetic input in a small oasis of the Egyptian Western Desert. *Am J Phys Anthropol* 140, 336–346.
- Kuper, R., Kröpelin, S., 2006. Climate-Controlled Holocene Occupation in the Sahara: Motor of Africa's Evolution. *Science* 313, 803–807.
- Larruga, J.M., Díez, F., Pinto, F.M., Flores, C., Gonzalez, A.M., 2001. Mitochondrial DNA characterisation of European isolates: the Maragatos from Spain. *European Journal of Human Genetics* 9, 708–716.
- Lernia, S. di, Tafuri, M.A., Gallinaro, M., Alhaique, F., Balasse, M., Cavorsi, L., Fullagar, P.D., Mercuri, A.M., Monaco, A., Perego, A., Zerboni, A., 2013. Inside the “African Cattle Complex”: Animal Burials in the Holocene Central Sahara. *PLOS ONE* 8, e56879.
- Lokki, A.I., Järvelä, I., Israelsson, E., Maiga, B., Troye-Blomberg, M., Dolo, A., Doumbo, O.K., Meri, S., Holmberg, V., 2011. Lactase persistence genotypes and malaria susceptibility in Fulani of Mali. *Malaria Journal* 10, 9.
- Maca-Meyer, N., González, A.M., Larruga, J.M., Flores, C., Cabrera, V.M., 2001. Major genomic mitochondrial lineages delineate early human expansions. *BMC Genetics* 2, 13.
- Macaulay, V., Richards, M., Hickey, E., Vega, E., Cruciani, F., Guida, V., Scozzari, R., Bonnè-Tamir, B., Sykes, B., Torroni, A., 1999. The emerging tree of West Eurasian mtDNAs: a synthesis of control-region sequences and RFLPs. *Am J Hum Genet* 64, 232–249.
- Macholán, M., 2014. *Základy fylogenetické analýzy*. Muni Press.
- Malyarchuk, B., Derenko, M., Grzybowski, T., Perkova, M., Rogalla, U., Vanecek, T., Tsybovsky, I., 2010. The Peopling of Europe from the Mitochondrial Haplogroup U5 Perspective. *PLOS ONE* 5, e10285.
- Mares, M.A., 1999. *Encyclopedia of Deserts*. University of Oklahoma Press.
- McDougall, I., Brown, F.H., Fleagle, J.G., 2005. Stratigraphic placement and age of modern humans from Kibish, Ethiopia. *Nature* 433, 733–736.
- McGregor, A., 2014. Alleged Connection between Boko Haram and Nigeria's Fulani Herdsmen could Spark a Nigerian Civil War. *Terrorism Monitor* 12.
- Metspalu, M., Kivisild, T., Metspalu, E., Parik, J., Hudjashov, G., Kaldma, K., Serk, P., Karmin, M., Behar, D.M., Gilbert, M.T.P., Endicott, P., Mastana, S., Papiha, S.S., Skorecki, K., Torroni, A., Villems, R., 2004. Most of the extant mtDNA boundaries

- in South and Southwest Asia were likely shaped during the initial settlement of Eurasia by anatomically modern humans. *BMC Genetics* 5, 26.
- Mishmar, D., Ruiz-Pesini, E., Golik, P., Macaulay, V., Clark, A.G., Hosseini, S., Brandon, M., Easley, K., Chen, E., Brown, M.D., Sukernik, R.I., Olckers, A., Wallace, D.C., 2003. Natural selection shaped regional mtDNA variation in humans. *PNAS* 100, 171–176.
- Modiano, D., Petrarca, V., Sirima, B.S., Nebié, I., Diallo, D., Esposito, F., Coluzzi, M., 1996. Different response to *Plasmodium falciparum* malaria in West African sympatric ethnic groups. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 13206–13211.
- Nave, A., 2010. Songhay, in: Appiah, A., Gates, H.L. (Eds.), *Encyclopedia of Africa*. Oxford University Press.
- Nicolaï, R., 2005. Language processes, theory and description of language change, and building on the past - Lessons from Songhay, in: Frajzyngier, Z., Hodges, A., Rood, D.S. (Eds.), *Linguistic Diversity and Language Theories*. John Benjamins Publishing.
- Nicolaisen, I., 2010. *Elusive Hunters: The Haddad of Kanem and the Bahr El Ghazal*. Aarhus University Press.
- Olivieri, A., Achilli, A., Pala, M., Battaglia, V., Fornarino, S., Al-Zahery, N., Scozzari, R., Cruciani, F., Behar, D.M., Dugoujon, J.-M., Coudray, C., Santachiara-Benerecetti, A.S., Semino, O., Bandelt, H.-J., Torroni, A., 2006. The mtDNA legacy of the Levantine early Upper Palaeolithic in Africa. *Science* 314, 1767–1770.
- Olivo, P.D., Van de Walle, M.J., Laipis, P.J., Hauswirth, W.W., 1983. Nucleotide sequence evidence for rapid genotypic shifts in the bovine mitochondrial DNA D-loop. *Nature* 306, 400–402.
- Osborne, A.H., Vance, D., Rohling, E.J., Barton, N., Rogerson, M., Fello, N., 2008. A humid corridor across the Sahara for the migration of early modern humans out of Africa 120,000 years ago. *PNAS* 105(43),16444-7.
- Otoni, C., Primativo, G., Hooshiar Kashani, B., Achilli, A., Martínez-Labarga, C., Biondi, G., Torroni, A., Rickards, O., 2010. Mitochondrial haplogroup H1 in north Africa: an early holocene arrival from Iberia. *PLoS ONE* 5, e13378.
- Owens, J., 1996. *Arabs and Arabic in the Lake Chad region*. Köln: Rüdiger Köppe Verlag.
- Pääbo, S., Higuchi, R.G., Wilson, A.C., 1989. Ancient DNA and the polymerase chain reaction: The emerging field of molecular archaeology (Minireview). *The Journal of biological chemistry* 264, 9709–9712.
- Paula, W.B.M. de, Lucas, C.H., Agip, A.-N.A., Vizcay-Barrena, G., Allen, J.F., 2013. Energy, ageing, fidelity and sex: oocyte mitochondrial DNA as a protected genetic template. *Phil Trans R Soc B* 368, 20120263.
- Peng, M.-S., Quang, H.H., Dang, K.P., Trieu, A.V., Wang, H.-W., Yao, Y.-G., Kong, Q.-P., Zhang, Y.-P., 2010. Tracing the Austronesian footprint in Mainland Southeast Asia: a perspective from mitochondrial DNA. *Mol Biol Evol* 27, 2417–2430.
- Pennarun, E., Kivisild, T., Metspalu, E., Metspalu, M., Reisberg, T., Moisan, J.-P., Behar, D.M., Jones, S.C., Villems, R., 2012. Divorcing the Late Upper Palaeolithic demographic histories of mtDNA haplogroups M1 and U6 in Africa. *BMC Evolutionary Biology* 12, 234.
- Pereira, L., Černý, V., Cerezo, M., Silva, N.M., Hájek, M., Vašíková, A., Kujanová, M., Brdička, R., Salas, A., 2010a. Linking the sub-Saharan and West Eurasian gene pools: maternal and paternal heritage of the Tuareg nomads from the African Sahel. *European Journal of Human Genetics* 18, 915.

- Pereira, L., Freitas, F., Fernandes, V., Pereira, J.B., Costa, M.D., Costa, S., Máximo, V., Macaulay, V., Rocha, R., Samuels, D.C., 2009. The diversity present in 5140 human mitochondrial genomes. *Am J Hum Genet* 84, 628–640.
- Pereira, L., Richards, M., Goios, A., Alonso, A., Albarrán, C., Garcia, O., Behar, D.M., Gölge, M., Hatina, J., Al-Gazali, L., Bradley, D.G., Macaulay, V., Amorim, A., 2005. High-resolution mtDNA evidence for the late-glacial resettlement of Europe from an Iberian refugium. *Genome Res* 15, 19–24.
- Pereira, L., Silva, N.M., Franco-Duarte, R., Fernandes, V., Pereira, J.B., Costa, M.D., Martins, H., Soares, P., Behar, D.M., Richards, M.B., Macaulay, V., 2010b. Population expansion in the North African Late Pleistocene signalled by mitochondrial DNA haplogroup U6. *BMC Evolutionary Biology* 10, 390.
- Queliec, J.-L.L., 2004. *Rock Art in Africa: Mythology and Legend*. Flammarion.
- Quintana-Murci, L., Quach, H., Harmant, C., Luca, F., Massonnet, B., Patin, E., Sica, L., Mougouma-Daouda, P., Comas, D., Tzur, S., Balanovsky, O., Kidd, K.K., Kidd, J.R., van der Veen, L., Hombert, J.-M., Gessain, A., Verdu, P., Froment, A., Bahuchet, S., Heyer, E., Dausset, J., Salas, A., Behar, D.M., 2008. Maternal traces of deep common ancestry and asymmetric gene flow between Pygmy hunter-gatherers and Bantu-speaking farmers. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 105, 1596–1601.
- Quintana-Murci, L., Semino, O., Bandelt, H.J., Passarino, G., McElreavey, K., Santachiara-Benerecetti, A.S., 1999. Genetic evidence of an early exit of *Homo sapiens sapiens* from Africa through eastern Africa. *Nature Genetics* 23, 437–441.
- Ranciaro, A., Campbell, M.C., Hirbo, J.B., Ko, W.-Y., Froment, A., Anagnostou, P., Kotze, M.J., Ibrahim, M., Nyambo, T., Omar, S.A., Tishkoff, S.A., 2014. Genetic Origins of Lactase Persistence and the Spread of Pastoralism in Africa. *Am J Hum Genet* 94, 496–510.
- Rando, J.C., Pinto, F., González, A.M., Hernández, M., Larruga, J.M., Cabrera, V.M., Bandelt, H.-J., 1998. Mitochondrial DNA analysis of Northwest African populations reveals genetic exchanges with European, Near-Eastern, and sub-Saharan populations. *Annals of Human Genetics* 62, 531–550.
- Reid, R.J., 2012. *A History of Modern Africa: 1800 to the Present*. John Wiley & Sons.
- Richards, M., Macaulay, V., Hickey, E., Vega, E., Sykes, B., Guida, V., Rengo, C., Sellitto, D., Cruciani, F., Kivisild, T., Villems, R., Thomas, M., Rychkov, S., Rychkov, O., Rychkov, Y., Gölge, M., Dimitrov, D., Hill, E., Bradley, D., Romano, V., Cali, F., Vona, G., Demaine, A., Papiha, S., Triantaphyllidis, C., Stefanescu, G., Hatina, J., Belledi, M., Di Rienzo, A., Oppenheim, A., Nørby, S., Al-Zaheri, N., Santachiara-Benerecetti, S., Scozzari, R., Torroni, A., Bandelt, H.-J., 2000. Tracing European Founder Lineages in the Near Eastern mtDNA Pool. *Am J Hum Genet* 67, 1251–1276.
- Rito, T., Richards, M.B., Fernandes, V., Alshamali, F., Cerny, V., Pereira, L., Soares, P., 2013. The First Modern Human Dispersals across Africa. *PLOS ONE* 8, e80031.
- Rosa, A., Brehem, A., 2010. African human mtDNA phylogeography at-a-glance. *Journal of anthropological sciences= Rivista di antropologia: JASS/Istituto italiano di antropologia* 89, 25–58.
- Rosa, A., Brehm, A., Kivisild, T., Metspalu, E., Villems, R., 2004. MtDNA Profile of West Africa Guineans: Towards a Better Understanding of the Senegambia Region. *Annals of Human Genetics* 68, 340–352.
- Rose, J.I., Usik, V.I., Marks, A.E., Hilbert, Y.H., Galletti, C.S., Parton, A., Geiling, J.M., Cerný, V., Morley, M.W., Roberts, R.G., 2011. The Nubian Complex of Dhofar, Oman: an African middle stone age industry in Southern Arabia. *PLoS ONE* 6, e28239.

- Rosenberg, N.A., Nordborg, M., 2002. Genealogical trees, coalescent theory and the analysis of genetic polymorphisms. *Nat Rev Genet* 3, 380–390.
- Safeguarding Livestock Diversity: The Time is Now, 2006. International Livestock Research Institute ILRI (aka ILCA and ILRAD).
- Saillard, J., Forster, P., Lynnerup, N., Bandelt, H.J., Nørby, S., 2000. mtDNA variation among Greenland Eskimos: the edge of the Beringian expansion. *Am J Hum Genet* 67, 718–726.
- Salas, A., Richards, M., De la Fe, T., Lareu, M.-V., Sobrino, B., Sánchez-Diz, P., Macaulay, V., Carracedo, A., 2002. The making of the African mtDNA landscape. *Am J Hum Genet* 71, 1082–1111.
- Salas, A., Richards, M., Lareu, M.-V., Scozzari, R., Coppa, A., Torroni, A., Macaulay, V., Carracedo, A., 2004. The African diaspora: mitochondrial DNA and the Atlantic slave trade. *Am J Hum Genet* 74, 454–465.
- Scheinfeldt, L.B., Soi, S., Tishkoff, S.A., 2010. Working toward a synthesis of archaeological, linguistic, and genetic data for inferring African population history. *PNAS* 107, 8931–8938.
- Schroeder, H., Ávila-Arcos, M.C., Malaspinas, A.-S., Poznik, G.D., Sandoval-Velasco, M., Carpenter, M.L., Moreno-Mayar, J.V., Sikora, M., Johnson, P.L.F., Allentoft, M.E., Samaniego, J.A., Haviser, J.B., Dee, M.W., Stafford, T.W., Salas, A., Orlando, L., Willerslev, E., Bustamante, C.D., Gilbert, M.T.P., 2015. Genome-wide ancestry of 17th-century enslaved Africans from the Caribbean. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 112, 3669–3673.
- Schwartz, M., Vissing, J., 2002. Paternal Inheritance of Mitochondrial DNA. *New England Journal of Medicine* 347, 576–580.
- Secher, B., Fregel, R., Larruga, J.M., Cabrera, V.M., Endicott, P., Pestano, J.J., González, A.M., 2014. The history of the North African mitochondrial DNA haplogroup U6 gene flow into the African, Eurasian and American continents. *BMC Evolutionary Biology* 14, 109.
- Serenó, P.C., Garcea, E.A.A., Jousse, H., Stojanowski, C.M., Saliège, J.-F., Maga, A., Ide, O.A., Knudson, K.J., Mercuri, A.M., Jr, T.W.S., Kaye, T.G., Giraudi, C., N'siala, I.M., Cocca, E., Moots, H.M., Dutheil, D.B., Stivers, J.P., 2008. Lakeside Cemeteries in the Sahara: 5000 Years of Holocene Population and Environmental Change. *PLOS ONE* 3, e2995.
- Shea, J.J., 2008. Transitions or turnovers? Climatically-forced extinctions of *Homo sapiens* and Neanderthals in the east Mediterranean Levant. *Quaternary Science Reviews, The Coastal Shelf of the Mediterranean and Beyond: Corridor and Refugium for Human Populations in the Pleistocene* 27, 2253–2270.
- Silander, K., Saarela, J., 2008. Whole Genome Amplification with Phi29 DNA Polymerase to Enable Genetic or Genomic Analysis of Samples of Low DNA Yield, in: Starkey, M., Elsaswarapu, R. (Eds.), *Genomics Protocols, Methods in Molecular Biology*TM. Humana Press, pp. 1–18.
- Soares, P., Alshamali, F., Pereira, J.B., Fernandes, V., Silva, N.M., Afonso, C., Costa, M.D., Musilová, E., Macaulay, V., Richards, M.B., Cerny, V., Pereira, L., 2012. The Expansion of mtDNA Haplogroup L3 within and out of Africa. *Mol Biol Evol* 29, 915–927.
- Soares, P., Ermini, L., Thomson, N., Mormina, M., Rito, T., Röhl, A., Salas, A., Oppenheimer, S., Macaulay, V., Richards, M.B., 2009. Correcting for Purifying Selection: An Improved Human Mitochondrial Molecular Clock. *The American Journal of Human Genetics* 84, 740–759.

- Soares, P., Rito, T., Trejaut, J., Mormina, M., Hill, C., Tinkler-Hundal, E., Braid, M., Clarke, D.J., Loo, J.-H., Thomson, N., Denham, T., Donohue, M., Macaulay, V., Lin, M., Oppenheimer, S., Richards, M.B., 2011. Ancient Voyaging and Polynesian Origins. *The American Journal of Human Genetics* 88, 239–247.
- Stock, R., 2012. *Africa South of the Sahara: A Geographical Interpretation*. Guilford Press.
- Stoneking, M., Krause, J., 2011. Learning about human population history from ancient and modern genomes. *Nat Rev Genet* 12, 603–614.
- Tamm, E., Kivisild, T., Reidla, M., Metspalu, M., Smith, D.G., Mulligan, C.J., Bravi, C.M., Rickards, O., Martinez-Labarga, C., Khusnutdinova, E.K., Fedorova, S.A., Golubenko, M.V., Stepanov, V.A., Gubina, M.A., Zhadanov, S.I., Ossipova, L.P., Damba, L., Voevoda, M.I., Dipierri, J.E., Villems, R., Malhi, R.S., 2007. Beringian Standstill and Spread of Native American Founders. *PLOS ONE* 2, e829.
- Tauxier, L., 1937. *Mœurs et histoire des Peuls*. Payot.
- Thébaud, B., 2002. *Foncier pastoral et gestion de l'espace au Sahel: Peuls du Niger oriental et du Yagha burkinabé*. KARTHALA Editions.
- Tishkoff, S.A., Reed, F.A., Friedlaender, F.R., Ehret, C., Ranciaro, A., Froment, A., Hirbo, J.B., Awomoyi, A.A., Bodo, J.-M., Doumbo, O., Ibrahim, M., Juma, A.T., Kotze, M.J., Lema, G., Moore, J.H., Mortensen, H., Nyambo, T.B., Omar, S.A., Powell, K., Pretorius, G.S., Smith, M.W., Thera, M.A., Wambebe, C., Weber, J.L., Williams, S.M., 2009. The Genetic Structure and History of Africans and African Americans. *Science* 324, 1035–1044.
- Torrioni, A., Achilli, A., Macaulay, V., Richards, M., Bandelt, H.-J., 2006. Harvesting the fruit of the human mtDNA tree. *Trends in Genetics* 22, 339–345.
- Torrioni, A., Bandelt, H.-J., D'Urbano, L., Lahermo, P., Moral, P., Sellitto, D., Rengo, C., Forster, P., Savontaus, M.-L., Bonn -Tamir, B., Scozzari, R., 1998. mtDNA Analysis Reveals a Major Late Paleolithic Population Expansion from Southwestern to Northeastern Europe. *Am J Hum Genet* 62, 1137–1152.
- Torrioni, A., Schurr, T.G., Cabell, M.F., Brown, M.D., Neel, J.V., Larsen, M., Smith, D.G., Vullo, C.M., Wallace, D.C., 1993. Asian affinities and continental radiation of the four founding Native American mtDNAs. *Am J Hum Genet* 53, 563–590.
- Tremblay, M., V zina, H., 2010. Genealogical analysis of maternal and paternal lineages in the Quebec population. *Hum Biol* 82, 179–198.
- Triska, P., Soares, P., Patin, E., Fernandes, V., Cerny, V., Pereira, L., 2015. Extensive Admixture and Selective Pressure Across the Sahel Belt. *Genome Biol Evol* 7, 3484–3495.
- Tucker, I., 2003. Fulfulde Language Family Report [online]. SIL International. Dostupn  z: <http://www-01.sil.org/silesr/2003/silesr2003-009.html#map1> [cit. 23.4. 2016].
- UNEP, 2012. *Sahel Atlas of Changing Landscapes: Tracing trends and variations in vegetation cover soil condition*. United Nations Environment Programme, Nairobi.
- van Oven, M., Kayser, M., 2009. Updated comprehensive phylogenetic tree of global human mitochondrial DNA variation. *Hum Mutat* 30, E386–E394.
- Vernet, R., 2002. Climate During the Late Holocene in the Sahara and the Sahel: Evolution and Consequences on Human Settlement, in: Hassan, F.A. (Ed.), *Droughts, Food and Culture: Ecological Change and Food Security in Africa's Later Prehistory*. Springer US.
- Wendorf, F., Schild, R., 1998. Nabta Playa and its role in northeastern African prehistory. *Journal of Anthropological Archaeology* 17, 97–123.
- Yang, Z., 2007. PAML 4: phylogenetic analysis by maximum likelihood. *Mol Biol Evol* 24, 1586–1591.

- Yang, Z., 1997. PAML: a program package for phylogenetic analysis by maximum likelihood. *Comput Appl Biosci* 13, 555–556.
- Yang, Z., 1994. Maximum likelihood phylogenetic estimation from DNA sequences with variable rates over sites: approximate methods. *J Mol Evol* 39, 306–314.
- Yoder, A.D., Yang, Z., 2000. Estimation of Primate Speciation Dates Using Local Molecular Clocks. *Mol Biol Evol* 17, 1081–1090.
- Zhang, X., Qi, X., Yang, Z., Serey, B., Sovannary, T., Bunnath, L., Seang Aun, H., Samnom, H., Zhang, H., Lin, Q., van Oven, M., Shi, H., Su, B., 2013. Analysis of mitochondrial genome diversity identifies new and ancient maternal lineages in Cambodian aborigines. *Nat Commun* 4, 2599.

13. Přílohy

Příloha č. 1: Seznam populací využitých pro analýzu sdílení haplotypů programem Arlequin 3.5.1.2.

Fulbové

No	Populace/místo sběru	Zkratka	N	Stát	Zeměpisná šířka	Zeměpisná délka	Jazyková skupina	Reference
1	Fulani Diafarabe	FDia	50	Mali	14.1389	-5.0192	Nigerokonžská	Černý et al. 2011
2	Fulani Banfora	FBan	50	Burkina Faso	10.4760	-4.8301	Nigerokonžská	Černý et al. 2011
3	Fulani Tindangou	FTin	50	Burkina Faso	11.9597	1.8376	Nigerokonžská	Černý et al. 2011
4	Fulani Abalak	FAba	26	Niger	15.4613	1.8376	Nigerokonžská	Černý et al. 2011
5	Fulani Ader	FAde	50	Niger	14.1851	5.0974	Nigerokonžská	Černý et al. 2011
6	Fulani Balatungur	FBal	23	Niger	13.7309	13.3589	Nigerokonžská	Černý et al. 2011
7	Fulani Diffa	FDif	32	Niger	13.3138	12.6131	Nigerokonžská	Černý et al. 2011
8	Fulani Zinder	FZin	34	Niger	13.8106	8.9868	Nigerokonžská	Černý et al. 2011
9	Fulani Tcheboua	FTch	40	Kamerun	9.0294	13.1859	Nigerokonžská	Černý et al. 2011
10	Fulani Bongor	FBon	50	Čad	10.2757	15.4112	Nigerokonžská	Černý et al. 2011
11	Fulani Linia	FLin	27	Čad	12.0461	15.3067	Nigerokonžská	Černý et al. 2011
12	Fulani Ziniare	FZR	56	Burkina Faso	12.6206	-1.2413	Nigerokonžská	Nepublikované
13	Fulani Ferlo	FFE	56	Senegal	15.3956	-15.1148	Nigerokonžská	Nepublikované
	total		544					

Severovýchodní Afrika a Blízký východ

No	Populace/místo sběru	Zkratka	N	Stát	Zeměpisná šířka	Zeměpisná délka	Jazyková skupina	Reference
14	Egypt Alexandria	EAL	277	Egypt	31.214	29.944	Afroasijská	Saunier et al. 2009
15	Egypt Lower	EGL	54	Egypt	28.064	30.737	Afroasijská	Krings et al. 1999
16	Egypt Upper 1	EG1	33	Egypt	23.996	32.718	Afroasijská	Krings et al. 1999
17	Egypt Upper 2	EG2	58	Egypt	23.996	32.718	Afroasijská	Stevanovitch et al. 2004
18	al-Hayez	EHA	35	Egypt	29.957	28.592	Afroasijská	Kujanová et al. 2009
19	Nubians 1	NB1	78	Súdán a Egypt	21.887	31.319	Nilosaharská	Krings et al. 1999
20	Berbers Siwa	SIW	78	Egypt	29.209	25.538	Afroasijská	Coudray et al. 2009
21	Libyans	LIB	269	Líbie	31.208	14.463	Afroasijská	Fadhlaoui-Zid et al 2011
22	Libyan Jews	LIJ	83	Izrael	*	*	Afroasijská	Behar et al. 2008
23	Druze 1	DR1	45	Izrael	32.844	35.366	Afroasijská	Macaulay et al. 1999
24	Iraqi 1	IR1	116	Irák	33.885	42.982	Afroasijská	Richards et al. 2000
25	Iraqi 2	IR2	52	Irák	33.346	44.425	Afroasijská	Al-Zahery et al. 2003
26	Palestinians 1	PL1	108	Izrael	31.750	35.229	Afroasijská	Richards et al. 2000
27	Syrians	SY1	68	Sýrie	33.519	36.313	Afroasijská	Richards et al. 2000
28	Northern Syrians	SY2	49	Sýrie	36.216	37.159	Afroasijská	Vernesi et al. 2001
29	Jordanians	JOR	145	Jordánsko	31.949	35.933	Afroasijská	Gonzalez et al. 2008
30	Lebanese	LEB	362	Libanon	33.872	35.522	Afroasijská	Haber et al. 2011
31	Bedouins 2	BE2	57	Izrael	30.673	34.876	Afroasijská	Behar et al. 2008
32	Druze 2	DR2	75	Izrael	32.931	35.336	Afroasijská	Behar et al. 2008
33	Palestinians 2	PL2	110	Izrael	32.590	35.306	Afroasijská	Behar et al. 2008
	total		2152					

Severozápadní Afrika

No	Populace/místo sběru	Zkratka	N	Stát	Zeměpisná šířka	Zeměpisná délka	Jazyková skupina	Reference
23	Tunisians	TUN	51	Tunisko	36.846	10.172	Afroasijská	Cherni et al. 2009
24	Berbers Kesra	BKE	47	Tunisko	35.794	9.301	Afroasijská	Cherni et al. 2005
25	Arabs Zriba	AZR	50	Tunisko	36.300	10.269	Afroasijská	Cherni et al. 2005
26	Berbers Skira	BSK	20	Tunisko	34.817	10.645	Afroasijská	Cherni et al. 2009
27	Berbers Sened	TBS	53	Tunisko	34.561	9.146	Afroasijská	Fadhlaoui-Zid et al. 2004
28	Berbers Matmata	TBM	49	Tunisko	33.454	9.768	Afroasijská	Fadhlaoui-Zid et al. 2004
29	Berbers Chenini-Douiret	TBC	53	Tunisko	32.843	10.263	Afroasijská	Fadhlaoui-Zid et al. 2004
30	Algerians	ALG	240	Alžírsko	35.697	-0.633	Afroasijská	Bekada et al. 2013
31	Berbers Morocco	BEM	60	Maroko	34.474	-4.368	Afroasijská	Rando et al. 1998
32	Arabs Morocco	MAR	32	Maroko	32.681	-7.018	Afroasijská	Rando et al. 1998
33	Berbers Souss Valley	BSV	50	Maroko	30.396	-9.081	Afroasijská	Brakez et al. 2001
34	Berbers Asni	BAS	53	Maroko	31.250	-7.983	Afroasijská	Coudray et al. 2009
35	Berbers Bouhria	BBO	70	Maroko	34.739	-4.134	Afroasijská	Coudray et al. 2009
36	Berbers Figuig	BFI	94	Maroko	32.112	-1.229	Afroasijská	Coudray et al. 2009
37	Arabs North Tunisia	ANT	64	Tunisko	36.450	9.707	Afroasijská	Turchi et al. 2009
38	Arabs North Morocco	ANM	56	Maroko	34.038	-4.111	Afroasijská	Turchi et al. 2009
39	Moroccan Jews	MOJ	147	Izrael	*	*	Afroasijská	Behar et al. 2008
40	Tunisian Jews	TUJ	37	Izrael	*	*	Afroasijská	Behar et al. 2008
41	Tuareg Gor	TGor	38	Burkina Faso	14.4433	-0.2347	Afroasijská	Pereira et al. 2010
42	Tuareg Gos	TGos	21	Mali	15.8211	-1.3077	Afroasijská	Pereira et al. 2010
43	Tuareg Tan	TTan	31	Niger	14.9724	8.8784	Afroasijská	Pereira et al. 2010
44	Tuareg Lybia	AL	129	Líbie			Afroasijská	Otoni et al. 2009
45	Tuareg Watson	TUA	26	Niger			Afroasijská	Watson et al. 1997
	total		1471					

Východní Afrika

46	Dinka	DIN	44	Jižní Súdán	4.927	30.705	Nilosaharská	Krings et al. 1999
47	Sudanese	SUD	102	Súdán	*	*	Nedefinovaná	Soares et al. 2012
48	Ethiopians	ETI	77	Etiópie	*	*	Nedefinovaná	Soares et al. 2012
49	Amhara 1	AM1	71	Etiópie	9.003	39.182	Afroasijská	Thomas et al. 2002
50	Amhara 2	AM2	120	Etiópie	8.091	37.184	Afroasijská	Kivisild et al. 2004
51	Tigráis	TIG	53	Etiópie a Eritrea	13.869	38.824	Afroasijská	Kivisild et al. 2004
52	Oromo 1	OR1	33	Etiópie	8.035	35.046	Afroasijská	Kivisild et al. 2004
53	Oromo 2	OR2	34	Etiópie	*	*	Afroasijská	Kivisild et al. 2004
54	Gurage	GUR	21	Etiópie	6.340	37.192	Afroasijská	Kivisild et al. 2004
60	Turkana 1	TK1	37	Keňa	2.944	38.126	Nilosaharská	Watson et al. 1997
61	Turkana 2	TK2	34	Keňa	3.627	36.002	Nilosaharská	Poloni et al. 2009 ; Al-Abri et al. 2012
62	Somali 1	SO1	27	Somálsko	*	*	Afroasijská	Watson et al. 1997
63	Somali 2	SO2	157	Somálsko	*	*	Afroasijská	Soares et al. 2012; Al-Abri et al. 2012
64	Kikuyu	KIK	25	Keňa	-1.667	38.224	Nigerokonžská	Watson et al. 1997
66	Kenyans (Nairobi)	NAI	100	Keňa	-1.283	36.817	Nedefinovaná	Brandstätter et al. 2004
67	Nyangatom	NYA	112	Etiópie	4.935	36.437	Nilosaharská	Poloni et al. 2009
68	Daasanach	DAA	49	Etiópie	4.772	36.114	Afroasijská	Poloni et al. 2009
69	Ethiopian Jews 1	EJ1	41	Etiópie	*	*	Afroasijská	Non et al. 2011
70	Ethiopian Jews 2	EJ2	29	Izrael	*	*	Afroasijská	Behar et al. 2008
71	Dawro-Konta	DAW	137	Etiópie	7.085	37.167	Afroasijská	Boattini et al. 2013
72	Ongota	ONG	19	Etiópie	4.833	36.982	Afroasijská	Boattini et al. 2013
73	Hamer	HAM	11	Etiópie	4.967	36.483	Afroasijská	Boattini et al. 2013
74	Rendille	REN	17	Keňa	2.806	37.466	Afroasijská	Boattini et al. 2013
75	Elmolo	ELM	52	Keňa	2.748	36.719	Afroasijská	Boattini et al. 2013
76	Luo	LUO	49	Keňa	-0.538	34.475	Nilosaharská	Boattini et al. 2013
77	Maasai	MAA	81	Keňa	0.700	36.851	Nilosaharská	Boattini et al. 2013
78	Samburu	SAM	35	Keňa	1.258	37.065	Nilosaharská	Boattini et al. 2013
79	Turkana 3	TK3	51	Keňa	4.467	35.112	Nilosaharská	Boattini et al. 2013
80	Taita	TAI	157	Keňa	-3.374	38.594	Nigerokonžská	Batai et al. 2013
81	Mijikenda	MIJ	195	Keňa	-4.278	39.469	Nigerokonžská	Batai et al. 2013
	total		1970					

Příloha č. 2: Seznam použitých sekvencí pro konstrukci fylogenetických stromů z databáze

GenBank nebo 1000 Genomes:

a) Pro haploskupinu U5

GU296570	JQ705849	JQ704823	JQ705318	GU296638	JQ705297	JQ705211
JQ705272	HQ588904	GU296601	JQ704695	GU296572	GU296628	EU597499
JQ704918	JQ702871	GU296594	JQ701903	JQ705908	JQ704028	JQ703114
JQ705910	HM852836	GU296573	JQ702809	GU296546	JQ703624	JQ703927
JQ702878	JQ703717	JQ704084	JQ701866	JQ704555	JQ704941	JQ704271
JQ702970	GU296620	JQ702122	GQ160809	GU296589	JQ691414	JQ705398
JQ704026	GU296623	GQ368895	JQ703297	GU296562	JQ705220	JQ702331
AY882399	EU523128	GU296636	JQ701958	GU296569	JQ705245	JQ702347
KC911409	JQ704708	JQ703866	FJ348174	GU296604	JQ706015	GU296603
KC911325	JQ702339	GU296595	FJ348215	GU296616	JQ703963	JQ702160
KC911581	JQ703614	DQ904330	JQ702231	JQ704045	JQ703074	HM852900
GU296640	EU698951	GU296564	GU296547	JQ705935	JQ703928	JQ704962
JQ702913	JQ702078	GU296581	GU296625	JQ703331	JQ702195	JQ704616
KC911532	DQ785296	JQ701834	GU296612	JQ705101	EU915477	JQ702225
HM852782	JQ705243	JQ703906	GU296542	HM804487	JN982470	JQ702735
JN412063	JQ705617	GU296558	JQ702404	GU296592	FJ702790	AY882398
JQ705326	JQ704796	JQ702085	EU140332	DQ862536	GU296550	KT366045
GU296543	JQ705621	GU296652	JQ705737	HM171295	JQ704679	JQ702310
JQ705777	JQ704930	JQ704725	GU123032	JN897375	GU296619	JQ705530
JQ704701	JQ582984	JQ703937	FJ147317	FJ702775	GU296608	JN707685
JQ704991	JQ705132	GU206811	HM173090	JQ704734	GU296649	GU296615
JQ705279	JQ704590	JQ704723	JQ704001	JQ704046	GU296614	HM142902
JQ702030	JQ704915	JQ705065	JQ704700	JN809915	HQ336051	JQ702072
JQ702053	JQ704920	JQ702038	GU296655	JQ701970	JQ704035	JQ702244
JQ705886	JQ702922	JQ705430	GU296599	AY714003	JQ703748	HM144108
JQ702496	JQ703590	JQ701869	GU296556	JQ702552	FJ702714	GU296580
JQ702806	JQ702437	JQ703965	JQ705498	EU140744	GU936107	GU296605
GU296557	JQ702696	JQ701913	JQ705290	JQ703945	GU296555	GU296635
JQ705855	JQ704022	HM852873	GU296606	EU140330	JQ705693	EF177408
GU123037	JQ704658	HM852852	GU296588	GU296610	JQ703227	GQ214520
JQ704990	EU597527	JQ704961	GU296617	FJ493508	GU296575	GU296574
JQ703926	GU296583	GU459066	JQ705573	HM775995	JQ702400	GU296602
JQ702568	JQ702730	JQ705479	JQ702836	GU296584	GU296576	GU797137

JQ703626	GU296637	JQ702230	JQ702376	JQ704065	GU122991	JQ702543
GU391321	JQ703831	GU296646	AY882411	JQ705613	GU296645	JQ702720
EU007851	JQ703979	GU296587	HQ287879	DQ902697	GU296639	GU296627
GU296597	JQ702165	JQ702184	HM043711	AY882406	JQ705608	JQ703780
GU296613	FJ460558	GU371930	JF436855	DQ902700	FJ493517	JQ705577
GU296650	HM536179	GU296559	EF420876	DQ902696	JQ705405	JF812598
JQ705359	EU151864	GU296577	HQ840516	DQ902705	GU295665	JQ702843
JQ703642	JQ705817	EF397754	JQ705105	JQ703600	GU296647	FJ916904
JQ703335	GU296624	HM490393	EU367993	AY882404	FJ499497	JQ705070
EU215455	GU296632	JN604831	JQ705355	HM116534	GU296585	JQ703790
GU122993	GU296653	JQ705123	JQ702152	JQ702845	GU296571	JQ702046
JQ704074	GU296593	JQ705228	GU296566	JQ705184	GU296631	JQ702136
JQ704645	JQ702746	JQ703280	AY882407	GU296598	AY882409	DQ523650
EU124886	GU296618	JQ702144	DQ282508	JQ702500	JQ408439	DQ523656
EF363686	GU296549	JN819535	DQ282509	JQ705418	JQ705095	JQ704572
JQ703988	GU296622	GU296561	DQ282510	GU296591	AY882410	EF419891
GU296596	JQ655176	GU296648	DQ282511	GU296565	JQ705870	GQ132188
GU296626	JQ705696	HM625679	FJ842500	JN639531	JQ703983	JQ702713
GU296634	GU296633	JQ703962	AF381989	JQ705675	JQ703934	JQ706019
JQ702355	GU296651	JQ705111	JQ701803	GU296553	DQ661681	JN584175
HM229344	GU296600	JQ704112	DQ781338	AY882400	EU597535	JN210894
HM246245	GU296629	JF330199	AY882408	GU815340	GU296554	JQ703914
GU296548	JQ703087	JN544933	JQ704517	JN807323	JQ703944	JQ702209
JQ623486	GU296656	FJ194437	JN897374	JQ703959	JQ704043	JQ705877
JQ703936	GU296578	JQ704875	JQ704778	JQ702587	JQ705473	JQ705180
JQ704247	GU296607	GU296590	AY882401	GU296644	JQ681270	JQ702531
JQ703187	GU296560	JQ703849	AY882402	JQ704053	JQ705473	JQ702585
GU296611	JQ704044	JX286537	AY882403	JQ703755	KF631319	JF265240
JQ705627	FJ460552	KT277304	GU296643	JQ705183	DQ523645	JQ702791
JQ705779	JQ704895	JX297131	JQ702384	JQ702743	JQ704984	JQ703904
EF660950	JQ702320	HQ675036	JQ703958	JQ704598	JF906114	JQ705500
JQ704067	JQ702392	JQ702807	JQ702524	GU296582	JQ705429	JQ705947
GU012633	JQ703987	JQ704568	GU296579	JQ702054	JQ702927	JQ702625
JX101637	JQ702917	GU977214	AY882405	GU296630	GU296641	EU490797
JQ701922	EU597544	HQ287878	GU296654	JQ705742	EU594543	JQ703980
JF487827	JQ702847	AY882412	EF420877	JQ704302	JQ703905	EU694385
EU049814	JN899603	JQ704335	JQ702837	JQ705267	JQ703741	JQ702688

JQ704820	GU296551	JQ704862	JQ702021	DQ523664	GQ129163	GQ129179
GU997135	GU296552	JQ705502	JQ702510	EU597508	EU926618	GQ129183
JQ704054	JQ702167	JQ702711	JQ704921	GQ129150	JQ702792	GQ129180
HQ435320	JQ705158	FJ887848	EU784076	GQ129151	GQ129182	GQ129145
JQ702468	GU296541	GU296609	JQ703899	GQ129155	GQ129181	GQ129143
JQ702406	JQ702431	GU296545	GU296568	DQ523628	GQ129148	JQ689453
JQ703796	JQ703027	JQ702235	GU296642	GQ129152	JQ705968	GQ129144
JQ704771	JQ705688	JQ703964	EU244000	GQ129153	GQ129170	JQ702295
JQ705419	GU296657	JQ705240	JN969087	DQ523644	GQ129171	GQ129175
JQ705298	EF459670	JQ702712	JQ703896	DQ523669	GQ129172	HQ658737
JQ705337	JN969984	JQ702190	HQ698894	GQ129149	GQ129147	GQ129178
EU233797	JQ703999	AY882414	JQ703942	AF346988	JQ704971	GQ129176
FJ664616	GU296567	GU296621	JQ702387	GQ129156	JQ703971	GQ129177
JQ705316	GU296586	JN411082	GU296544	DQ523624	EU130681	GU296563
JQ290366	HM130562	AY882413	JQ704726	JQ074232	GQ129169	JN315868
JQ702815	JQ014004	GQ853200	GQ129157	GQ129159	GQ129168	GQ129174
EU682506	JQ703628	JQ702964	GQ129158	GQ129160	GQ129166	GQ129173
EF420249	JQ704029	JQ703984	GQ129154	GQ129161	GQ129165	GQ129146
AY882415	JQ705007	JQ702588	DQ523655	GQ129162	JQ702146	
JQ703946	EU182656	JQ701915	DQ523658	GQ129164	GQ129167	

b) Pro haploskupinu H1

JQ702483	JQ324584	JQ703199	GQ150344	JQ324672	JQ324928	JQ324798
JQ704366	JQ704186	JQ704839	AY495153	JQ324557	JQ703371	JQ324782
JQ703635	JQ703390	JQ704424	JQ324874	JQ324719	JQ702983	JQ324904
JQ704781	JQ704544	KC158585	JQ324852	JQ324536	JQ702907	JQ324884
AY738977	KF429262	NA20769	JQ324835	EU372628	JQ324614	JQ324646
JQ705940	JQ324593	NA19648	JQ324823	JQ705362	JQ324562	JQ324892
JQ702570	JQ704465	JQ704564	JQ324602	JQ704538	EU597511	JQ702623
EF556177	JQ704279	JQ702269	JQ324552	GU214208	JQ705078	JQ703324
JQ705579	JQ704263	HQ114015	JQ324605	JQ705584	JQ705371	AY738979
JQ704794	JQ704557	AY495099	JQ324830	JQ704466	JQ704669	HQ658478
JQ704756	JQ704470	JQ703277	JQ324841	JQ704066	JQ702494	JQ702557
JQ703668	JQ704447	JQ703484	JQ324822	JQ703974	NA12777	JQ704170
JQ704647	JQ704230	JQ324713	JQ324717	FJ858266	JQ704429	GQ175058
JQ703148	JQ705157	JQ704411	JQ324700	JQ702275	JQ324915	JQ703938
JQ704588	GQ153528	JQ704154	JQ324768	JQ703224	JQ324862	KF055863

JQ324561	JQ324838	GQ478575	HG00278	JQ704199	JQ324736	JQ702497
JQ704657	JQ324803	EU080974	JQ703765	JQ704398	JQ324658	JQ702634
JQ704485	JQ324802	JQ324840	JQ702043	JQ702288	JQ324754	JQ704162
JQ704448	JQ324801	GQ888727	HQ658482	EF491001	JQ324722	HM628905
JQ704381	JQ324800	JQ324824	FJ348200	JQ704358	JQ324607	JQ703477
JQ703811	JQ324784	KF493878	FJ348199	JQ324660	JQ324560	JQ801295
JQ701863	JQ324748	JQ702236	JQ702161	JQ703856	JQ703243	JQ705135
JQ703316	JQ324856	JQ702007	JQ702077	JQ703536	JQ324554	JQ705107
JX021729	JQ324752	JQ705944	JQ702009	JQ324863	JQ324887	HQ663876
HM171280	JQ324770	AF346981	EU089747	JQ324864	JQ324860	JQ704369
HM171279	JQ324825	JQ324580	JQ705930	JQ324797	JQ324857	JQ702584
HM171278	JQ324726	JQ324535	JQ704095	JQ324808	JQ324763	JQ702262
HM171277	JQ324921	JQ702657	JQ704566	JQ324760	JQ324805	JQ702628
HM171276	JQ324905	JQ324843	JQ704307	JQ324923	JQ324793	JQ703751
HM171275	GQ888723	HQ662225	KC409356	JQ324920	JQ324919	JQ703907
HM171274	JQ324644	JQ704373	JQ703319	JQ324901	JQ324935	JQ703669
HM171273	JQ324589	HG00362	JQ704655	JQ324898	JQ324865	JQ703170
HM171272	JQ324551	JQ705716	NA20832	JQ324878	JQ324859	JQ324934
HM171271	GQ888724	JQ702828	JQ702362	JQ324902	JQ324807	HQ841014
HM171270	JQ324746	JQ704630	JQ701825	JQ324883	JQ324705	JQ704743
FJ460532	JQ324816	JQ705848	JQ704202	JQ324849	JQ324686	AY495144
JQ703465	JQ324815	JQ324626	FJ348196	JQ324826	JQ324525	AY495124
JQ324636	JQ324747	NA20811	JQ705987	JQ324796	JQ324615	JQ703198
JQ703879	JQ324688	JQ704720	JQ704459	JQ324786	JQ324563	JQ702335
JQ703541	JQ324681	JQ704667	JQ703995	JQ324698	JQ702542	JQ324529
JQ703311	JQ324631	JQ704277	JQ065050	JQ324656	JQ705872	JQ324893
JQ705867	JQ324624	JQ703742	FJ917552	JQ324604	JQ705294	JQ324780
AY495103	JQ324609	NA20790	AY495152	JQ324834	JQ703420	JQ324773
JQ702971	JQ324543	JQ703216	AY495106	JQ324911	JQ703218	JQ324894
JQ702726	JQ324674	NA07345	JQ704193	JQ324870	JQ702870	JQ703403
JQ705383	JQ324866	EF556184	JQ705493	JQ324657	JQ701806	JQ703709
JN604117	JQ324889	JQ324809	EF177436	JQ324539	FJ711775	JQ702223
JN224991	JQ324897	JQ324594	JQ705914	JQ324813	JX092101	JQ705039
JQ702577	JQ324877	JQ704613	JQ703631	JQ324650	EU372630	JQ701978
EF177427	JQ324837	JQ703312	JQ703147	JQ324909	JQ705976	JQ703251
GQ888726	JQ324728	JQ702856	AY495119	JQ324599	JQ704444	JQ324664
GQ888725	JQ704194	HQ839859	JQ704090	JQ324743	JQ704462	HM622671

FJ236979	JQ324742	JQ705799	NA12144	JQ702349	JQ703810	HM245920
FJ940865	JQ324721	NA20514	HG00110	JQ703603	JQ705027	GU433215
EU568371	JQ324720	NA20513	EF177428	JN400598	JQ702215	GU289555
JQ702334	HQ663877	JQ702649	JQ705586	JQ705256	AY495141	AF382002
JQ703270	EU555475	JQ704656	JQ705555	JQ705024	JQ701993	HG00272
JQ704819	JQ703207	JQ702104	JQ705462	NA20810	JQ704310	JQ705182
EU597532	JQ702992	JQ735910	JQ705330	JQ705903	JQ704776	GQ332765
JQ702132	JQ704343	JQ702833	JQ704805	JQ705657	JQ704294	JQ704618
JQ702846	JQ704327	HM852868	JQ704693	JQ702313	JQ702867	NA11930
HQ676806	JQ705170	JQ324756	JQ705427	JQ702328	JQ703430	JQ703142
FJ460534	JQ704128	JQ324737	NA12891	EF556181	JQ702873	JQ704119
JQ703664	JQ705050	JQ324691	JQ705331	DQ523657	JQ702850	JQ324917
AY339421	NA20504	JQ324879	JQ704464	HM100712	JQ702679	JQ324895
JQ704717	HG00125	EU914954	JQ702480	FJ348214	JQ706002	JQ704832
JQ702140	JQ705717	HQ658480	JQ703438	JQ703383	JQ704259	JQ704718
JQ705618	JQ704292	JQ705496	JQ704501	JQ702607	NA07347	JQ703496
HG00382	JQ704567	JQ324771	JQ704311	JQ703998	JQ704080	EF177411
JX021621	JQ704905	JQ324524	JQ704122	HQ843989	GU812902	JQ703719
JQ724862	JQ703698	JF833269	JQ703226	JQ703126	JQ703174	JQ705766
JQ703219	NA20803	JQ324689	JQ703109	JQ705757	JQ703745	JQ705706
JQ703535	JQ702491	JQ324653	JQ702597	JQ705238	JQ702006	JQ704329
JQ701879	NA20767	JQ324579	JQ701952	HQ875780	AY495102	JQ703646
HQ659703	JQ701874	JQ324890	JQ702130	AY495187	JQ704685	JQ702899
JQ705426	EU714270	JQ324842	JQ701980	JQ324739	GU122996	JQ702738
JQ704250	AY495094	JQ324715	JQ324751	HQ658607	JQ701984	JQ705622
HQ268504	AY738971	JQ324659	JQ324667	JQ703342	JQ703499	AY495096
JQ705236	JQ701987	JQ324577	FJ348185	AY495139	JQ704378	JQ705830
JQ703137	JQ702263	JQ324766	JQ705884	JQ702501	JQ705894	JQ704438
JQ702608	JQ703190	JQ324882	JQ324690	HQ658133	JQ324836	AY495113
EU262984	HG00158	JQ324873	JQ324885	JQ704242	JQ324787	JQ704382
EU148452	HG00153	JQ324683	EU715237	HM462218	JQ324871	HQ681884
JQ703196	JQ703115	KC911611	JQ705846	JQ705495	JQ324779	JQ703166
JQ702433	JQ703125	KC911554	JQ704418	JQ704352	JQ324530	JQ702089
JQ704392	NA20531	KC911534	JQ702024	JQ705468	JQ705516	JQ703121
JQ324927	HG00111	KC911429	EU597560	JQ703637	NA11881	JQ703889
JQ324912	HQ880578	KC911376	JQ324908	JQ703459	JQ704934	JQ702237
JQ324777	JQ705809	NA12341	JQ703576	JQ704175	HQ287887	JQ702099

NA12399	AY495158	JQ705918	JQ705985	JQ702763	JQ703364	JQ702703
JQ702436	NA12748	JQ704994	HG00266	JQ703838	JQ703443	HQ284163
JQ704323	NA11919	JQ324517	HG00189	JQ705709	JQ702458	HQ184065
AY495163	HG00150	JQ324516	AY339419	JQ703500	JQ704200	JQ324924
JQ704861	JQ701831	JQ704513	AY339418	JQ702455	JQ705367	JQ324850
AY495160	FJ798928	JQ324765	JQ705607	HG00138	JQ703634	JQ324755
JQ704356	AY495164	AY738982	JQ704916	HG00353	NA20792	JN603189
NA12249	AY495162	JQ704715	HG00335	JQ705126	NA20526	HM060309
EU428754	AY495161	JQ705343	JQ704038	JQ704159	NA20509	FJ156761
JQ706009	AY495157	JQ702565	AY339420	JQ705482	NA12717	JQ703705
JQ705992	HQ287885	JQ702057	AY339417	JQ702527	HG00361	JQ703611
JQ705216	JQ705712	JQ704562	HG00313	JQ701966	JQ705011	HG00232
JQ705195	JQ705722	JQ703839	AY339416	JQ703941	JQ704784	JQ406575
JQ705167	JQ705695	JQ703527	AY339415	AY738975	HM119592	JQ704872
JQ704844	JQ702204	JQ705822	AY339414	HM027898	FJ801039	JQ703411
JQ704719	JQ705159	JQ703245	AY339413	GU122983	JQ704289	HQ659690
JQ704639	JQ704721	JQ704157	JQ703322	HM625678	JQ702114	KC911510
JQ704637	JQ704585	JQ705391	JQ704298	JQ704589	JQ704003	KC911318
JQ704522	JQ704558	JQ703729	JQ324933	JQ702848	JQ324839	KC911297
JQ704487	JQ704368	JQ703220	JQ324831	JQ702028	JQ324886	KC911283
JQ704439	JQ702683	JQ702559	JQ324880	JQ704810	NA12812	KC911277
JQ704431	JQ703617	FJ216960	JQ324829	JQ703848	JQ324799	EU600345
JQ704314	JQ703489	EU779660	JQ704139	JQ704709	JQ324649	JQ704085
JQ704282	JQ703787	HM017858	JQ705350	JQ704636	JQ705845	JQ703112
JQ704134	JQ702382	EU770202	JQ704744	JQ704551	JQ705836	JQ701861
JQ703956	JQ702532	EU768844	JQ704894	JQ704446	JQ703457	JQ704203
JQ703441	JQ702528	JQ703948	JQ703268	JQ704407	JQ705231	JQ702415
JQ703418	JQ702221	GU461664	JQ704882	JQ701873	JQ704881	JQ705678
JQ703153	JQ324669	JQ701945	JQ702566	GU724771	JQ704402	HQ658466
JQ703104	JQ704909	JQ705252	JQ706010	JQ702709	JQ704624	JQ324714
JQ702832	JQ703551	JQ703231	JQ704309	JQ704086	JQ704454	JQ702401
JQ702113	JQ702336	JQ703476	JQ702529	JQ702881	JQ703337	JQ703346
JQ702296	HQ336334	JQ704519	JQ703357	EU200237	HG01519	JN899290
JQ702186	JQ702005	JQ704702	JQ703254	EU219920	HG01167	KJ856786
JQ702016	EU597509	JQ705210	EU600348	JQ324753	JQ705239	JQ704980
AY495159	JQ703473	JQ705615	GU797136	AY195775	JQ702409	JQ704914
HQ287886	JQ704571	KC785095	JQ704913	JQ702359	JQ704486	JN903384

JQ705958	HQ661844	HG00310	AY495193	JQ703758	JQ705756
JQ702575	HQ659848	HM775496	JN202726	KF052033	JQ705649
JQ324643	NA20768	EU687746	AY495194	KC121273	JQ704481
JQ324521	AY738972	AY339424	AY495192	HQ842871	AY738973
FJ236983	JQ705169	HG00378	AY495188	EU130942	JQ703351
JQ704516	JQ704612	HG00269	EF449507	HQ659701	EU828774
NA12890	HM589042	AY339425	JQ324569	JQ703384	AY738981
HG00372	JQ704838	AY339423	HQ588357	JQ705311	JQ705395
HG00159	JQ704050	AY339422	JQ703518	FJ460544	FJ719305
JQ044904	JQ703759	JQ703616	JQ702187	EF177446	FJ719302
JQ704511	JQ702753	JQ703424	JQ704943	JQ705235	JQ703388
FJ460548	JQ702650	AY495190	JQ704877	JQ324590	JQ702102
GU797829	JQ702639	JQ702198	JQ704593	AY738976	JQ705052
JQ705125	JQ702101	NA11920	JQ704507	AY495117	AF381993
JQ702474	EF177447	JQ704265	JQ701950	JQ701931	JQ704391
JQ705205	JQ324542	JF326185	JQ701888	EU074158	JQ704954
JQ704141	JQ704502	AY495189	JQ704091	JQ703525	JQ324732
JQ705306	HQ287892	JQ704413	JQ703563	EF177425	JQ704849
JQ704525	JQ704536	JQ703901	JQ704312	HQ325738	JF825889
JQ704317	JQ704245	JQ702602	JQ703450	AY339412	DQ523641
JQ702535	JQ704204	JQ705764	JQ703052	JQ703305	JQ324523
JQ703238	JQ704106	JQ705763	EU935845	JQ704852	DQ523681
HQ287891	JQ703735	JQ705654	JQ703537	JQ324641	JQ705448
JQ704223	JQ324867	JQ705048	JQ702751	JQ703922	JQ705876
JQ704301	JQ702182	JQ704601	JQ702598	JQ324565	JQ324709
JQ702698	JQ702008	JQ704575	NA20535	JQ705296	HG00182
FJ348176	JQ703274	JQ704880	HQ659685	JQ703399	KC911565
EU979418	JQ701830	JQ704257	HQ287893	JQ704731	HG01786
JQ704243	HG00135	JQ703869	HQ114262	AY738980	JQ898578
JQ703419	EU747355	JQ703814	EU597524	EF526076	EU597492
JQ703428	JQ702174	JQ703472	EU369376	JQ324576	
JQ704927	JX885690	AY495191	EU200235	JQ704659	
JQ705533	HG00180	JQ703315	JQ324876	AY495112	
JQ703683	JQ704117	FJ188716	JQ703925	JQ704414	
JQ702234	JQ702405	JQ702377	HG00342	HQ703482	
JQ703135	EU130562	JQ702226	JQ701944	AY495147	
JQ705993	HG00381	EU215517	HG00380	JQ703143	

Příloha č. 3: Protokol izolace bukálních stěrů přes kolonky QIAquick PCR Purification Kit

V 1,5ml zkumavce se nachází kartáček s bukálním stěrem ponořený do 1ml lyzačního roztoku (složení: 50mM Tris pH 8,0; 50mM EDTA; 50mM Sacharóza; 100mM NaCl; 1% SDS)

Příprava roztoku:

Lyzační roztok (100 ml)

- Do kádinky 1,71g sacharózy
0,58g NaCl
1g SDS (sodium dodecil sulfát)
10ml 0,5M Tris ph 8.0
10ml 0,5M EDTA ph 8.0
- Doplnit do 100ml H₂O

Postup izolace:

- 1) Pustit inkubační box na 60 °C.
- 2) Vortexovat vzorky 1 minutu.
- 3) Odsát 200 µl a přenést do sterilní zkumavky (1,5 – 2ml).
- 4) Přidat 1000 µl extrakčního pufru PB a zvortexovat.
- 5) Inkubovat při 60°C 1 hodinu s míchaním (200 otáček/minuta) a stočit na centrifuze (1 min, 12 000g).
- 6) Supernatant přenést na dvakrát do kolonky a stočit na centrifuze (1,5 min 12 000g). Nejprve přenést 700 µl supernatantu, stočit na centrifuze (1,5 min 12 000g), vylít a osušit okraje zkumavky. Podruhé přenést 500 µl supernatantu, stočit na centrifuze (1,5 min 12 000g), vylít a osušit okraje zkumavky.
- 7) Přidat 200 µl extrakčního pufru PB, stočit na centrifuze (1,5 min 12 000g) a vylít.
- 8) Přidat 700 µl proplachovacího pufru PE s etanolem a stočit na centrifuze (1,5 min 12 000g).
- 9) Vylít kolonku, osušit okraje, stočit na centrifuze (3 min 12 000g), znovu vylít a nechat v boxu v průvanu, aby se odpařil zbylý etanol.
- 10) Vyměnit zkumavku, nanést na membránu kolonky 40 µl elučního pufru EB zahřátého na 37°C, inkubovat 5 minut a stočit na centrifuze (1,5 min 12 000g).
- 11) Vyhodit kolonku a zkumavku s DNA skladovat v mrazáku.

Příloha č. 4: Nespecifická amplifikace DNA kitem Illustra Ready-To-Go GenomiPhi V3 DNA Amplification Kit

- 1) Do 9 μl deionizované vody přidat 1 μl 10 ng templátové DNA. Pokud je koncentrace templátové DNA nižší/vyšší než 10 ng/ μl může být použitý vyšší/nižší objem templátové DNA. Celkový objem DNA plus vody by měl být rovný 10 μl .
- 2) Přidat 10 μl 2krát Denaturačního pufru.
- 3) V termocycleru zahřát na 95°C po dobu 3 minut (denaturace) a poté schladit na 4°C.
- 4) Nanést 20 μl denaturovaného DNA templátu do jednotlivých jamek přiloženého stripu obsahujícího komponenty pro DNA amplifikaci a zavřít víčkami. Tuto manipulaci provádět na led nebo chladicí destičce.
- 5) Inkubovat stripy se směsí v inkubačním boxu na 30°C po dobu 1,5 hodiny (amplifikace).
- 6) V termocycleru zahřát na 65°C po dobu 10 minut (inaktivace DNA polymerázy) a poté schladit na 4°C.
- 7) Skladovat při teplotě -20 °C.

Příloha č. 5: Primery P1-P24 pro cel genomové sekvenování, upraveno Mgr. Eliškou Podgornou podle Gonder et al. 2007

název primeru	sekvence (5'->3')	teplota nasedání primerů [°C]	fragment podle rCRS	velikost [bp]
P1F	CTCCTCAAAGCAATACACTG		592	
P1R	TGCTAAATCCACCTTCGACC	58	1430	839
P2F	CGATCAACCTCACACCTCT		1226	
P2R	TGGACAACCAGCTATCACCA	58	2026	801
P3F	GGACTAACCCCTATACCTTCTGC		1830	
P3R	GGCAGGTCAATTTCACTGGT	58	2688	859
P4F	AAATCTTACCCCGCCTGTTT		2480	
P4R	AGGAATGCCATTGCGATTAG	58	3365	886
P5F	TACTTCACAAAGCGCCTTCC		3150	
P5R	ATGAAGAATAGGGCGAAGGG	58	3980	831
P6F	TGGCTCCTTTAACCTCTCCA		3777	
P6R	AAGGATTATGGATGCGGTTG	58	4679	903
P7F	ACTAATTAATCCCCTGGCCC		4466	
P7R	CCTGGGGTGGGTTTTGTATG	58	5443	958
P8F	CTAACCGGCTTTTTGCC		5238	
P8R	ACCTAGAAGGTTGCCTGGCT	58	6050	813
P9F	GAGGCCTAACCCCTGTCTTT		5835	
P9R	ATTCCGAAGCCTGGTAGGAT	58	6661	827
P10F	CTCTTCGTCTGATCCGTCCT		6450	
P10R	AGCGAAGGCTTCTCAAATCA	58	7334	885
P11F	ACGCCAAAATCCATTTCACT		7129	
P11R	CGGGAATTGCATCTGTTTTT	58	8114	986
P12F	ACGAGTACACCCGACTACGGC		7908	
P12R	TGGGTGGTTGGTGTAATGA	58	8816	909
P13F	TTTCCCCCTCTATTGATCCC		8602	
P13R	GTGTCCTTGGTATGTGCTTT	58	9416	815
P14F	CCCACCAATCACATGCCTAT		9211	
P14R	TGTAGCCGTTGAGTTGTGGT	58	10149	939
P15F	TCTCCATCTATTGATGAGGGTCT		9967	
P15R	AATTAGGCTGTGGGTGGTTG	58	10858	892
P16F	GCCATACTAGTCTTTGCCGC		10653	
P16R	TTGAGAAATGAGTGTGAGGCG	58	11511	859
P17F	TCACTCTCACTGCCCAAGAA		11295	
P17R	GGAGAATGGGGGATAGGTAT	58	12095	801
P18F	TATCACTCTCCTACTTACAG		11929	
P18R	AGAAGGTTATAATTCCTACG	51	12793	846
P19F	AAACAACCCAGCTCTCCCTAA		12551	
P19R	TCGATGATGTGGTCTTTGGA	56	13526	976
P20F	ACATCTGTACCCACGCCTTC		13319	
P20R	AGAGGGGTCAGGGTTCATTC	56	14287	950
P21F	GCATAATTAAACTTTACTTC		14081	
P21R	AGAATATTGAGGCGCCATTG	51	15017	937
P22F	TGAAACTTCGGCTCACTCCT		14837	
P22R	AGCTTTGGGTGCTAATGGTG	58	15997	1161
P23F	TCATTGGACAAGTAGCATCC		15792	
P23R	GAGTGGTTAATAGGGTGATAG	58	31	809
P24F	CACCATCTCCGTGAAATCA		16400	
P24R	AGGCTAAGAGTTTTGAGCTG	58	794	964

Příloha č. 6: Purifikace PCR fragmentů přes kolonky QIAquick Purification Kit

- 1) Přidat k 25 μ l PCR produktu 125 μ l extrakčního PB pufru a promíchat pipetou.
- 2) Tuto směs přenést do kolonky, stočit na centrifuze (1,5 min., 12 000g) a kolonku vylít.
- 3) Přidat 730 μ l proplachovacího pufru PE s etanolem a stočit na centrifuze (1,5 min, 12 000g).
- 4) Vylít kolonku, osušit okraje, stočit na centrifuze (3 min 12 000g), znovu vylít a nechat v boxu v průvanu, aby se odpařil zbylý etanol.
- 5) Vyměnit zkumavku, nanést na membránu kolonky 30 μ l elučního pufru EB zahřátého na 37°C, inkubovat 5 minut a stočit na centrifuze (1,5 min 12 000g).
- 6) Vyhodit kolonku a zkumavku s DNA skladovat v mrazáku.

Příloha č. 7: Zastoupení haploskupin podle HVS-I u afrických Fulbů a jejich sdílení

Haploskupina	Spolehlivost určení	Haplotypy	Fulbové (N=544)	Fulbové (%)	severovýchodní Afrika a Blízký východ	severozápadní Afrika	východní Afrika
L0a1'4	100%	16129A-16148T-16168T-16172C-16187T-16188G-16189C-16223T-16230G-16311C-16320T	2	0,4	21	0	17
L0a1'4	97,09%	16129A-16148T-16168T-16172C-16187T-16188G-16189C-16223T-16230G-16278T-16311C-16320T	1	0,2	1	0	0
L0a1'4	88,9%	16111T-16129A-16148T-16168T-16172C-16173T-16187T-16188G-16189C-16223T-16230G-16256T-16311C-16320T	1	0,2	0	0	0
L0a2	100%	16148T-16172C-16187T-16188G-16189C-16223T-16230G-16311C-16320T	1	0,2	1	0	44
L1b	100%	16126C-16187T-16189C-16223T-16264T-16270T-16278T-16293G-16311C	59	10,8	8	26	3
L1b	93,03%	16126C-16187T-16189C-16223T-16264T-16270T-16278T-16311C	7	1,3	1	3	3
L1b	90,15%	16126C-16187T-16189C-16213A-16223T-16260T-16264T-16270T-16278T-16293G-16311C	25	4,6	1	1	0
L1b	96,43%	16093C-16126C-16187T-16189C-16223T-16264T-16270T-16278T-16293G-16311C	44	8,1	0	1	1
L1b	86,27%	16126C-16187T-16189C-16223T-16264T-16270T-16278T-16311C-16368C	2	0,4	0	0	0
L1b	91,85%	16126C-16170G-16187T-16189C-16223T-16264T-16270T-16278T-16293G-16311C	1	0,2	0	0	0

Haploskupina	Spolehlivost určení	Haplotypy	Fulbové (N=544)	Fulbové (%)	severovýchodní Afrika a Blízký východ	severozápadní Afrika	východní Afrika
L1b	89,92%	16093C-16126C-16187T-16189C-16223T-16255A-16264T-16270T-16278T-16293G-16311C	1	0,2	0	0	0
L1b	90,39%	16069T-16093C-16126C-16187T-16189C-16223T-16264T-16270T-16278T-16293G-16311C	1	0,2	0	0	0
L1b	92,91%	16187T-16189C-16223T-16270T-16278T-16293G-16311C	1	0,2	0	1	0
L1b	90,39%	16126C-16184T-16187T-16189C-16223T-16260T-16264T-16270T-16278T-16293G-16311C	1	0,2	0	0	0
L1b	89,25%	16126C-16187T-16189C-16223T-16264T-16270T-16278T-16293G-16311C-16319A-16352C	2	0,4	0	0	0
L1b	100%	16126C-16187T-16189C-16223T-16249A-16264T-16270T-16278T-16293G-16311C	1	0,2	0	0	0
L1b1a12b	92,88%	16189C-16223T-16264T-16270T-16278T-16293G-16311C	1	0,2	0	0	0
L1b2	100%	16126C-16187T-16189C-16223T-16239T-16264T-16270T-16278T-16293G-16311C	1	0,2	0	2	0
L1b2a	100%	16111T-16126C-16187T-16189C-16223T-16239T-16270T-16278T-16293G-16311C	1	0,2	0	1	0
L1c	93,50%	16129A-16187T-16189C-16223T-16278T-16311C-16360T	1	0,2	0	0	0
L1c1d	87,45%	16038G-16129A-16187T-16189C-16223T-16256T-16278T-16284G-16293G-16294T-16311C-16360T	1	0,2	0	0	0
L1c3a	91,77%	16093C-16183C-16189C-16215G-16223T-16278T-16294T-16311C-16360T	1	0,2	0	0	0

Haploskupina	Spolehlivost určení	Haplotypy	Fulbové (N=544)	Fulbové (%)	severovýchodní Afrika a Blízký východ	severozápadní Afrika	východní Afrika
L1c3a1b	100%	16129A-16180G-16189C-16215G-16223T-16278T-16294T-16311C-16355T-16360T	1	0,2	0	0	0
L2a1	82,08%	16111T-16189C-16223T-16278T-16292T-16294T-16309G	1	0,2	0	0	0
L2a1	100%	16223T-16278T-16294T-16309G	1	0,2	3	13	8
L2a1	95,56%	16189C-16223T-16278T-16294T-16309G	2	0,4	5	7	24
L2a1	83,82%	16278T-16294T-16309G	1	0,2	0	0	0
L2a1	88,64%	16223T-16278T-16284G-16294T-16309G	2	0,4	0	0	0
L2a1+143+@16309	93,90%	16189C-16223T-16278T-16294T	3	0,6	3	10	5
L2a1+143+@16309	93,90%	16182C-16183C-16189C-16223T-16278T-16294T	1	0,2	0	0	0
L2a1+143+@16309	93,90%	16183C-16189C-16223T-16278T-16294T	2	0,4	0	2	0
L2a1+16189 (16192)	100%	16189C-16192T-16223T-16278T-16294T-16309G	3	0,6	6	8	14
L2a1+16189 (16192)	85,62%	16093C-16173T-16189C-16192T-16223T-16278T-16294T-16309G	1	0,2	0	0	0
L2a1+16189 (16192)	92,32%	16189C-16192T-16223T-16245G-16278T-16292T-16294T-16309G	1	0,2	0	0	0
L2a1+143+16189 (16192)+@16309	84,76%	16192T-16223T-16278T	1	0,2	0	0	0
L2a1a2	93,13%	16086C-16223T-16278T-16286T-16294T-16309G	1	0,2	0	0	0
L2a1a2	91,93%	16092C-16223T-16278T-16286T-16294T-16309G	1	0,2	0	0	2
L2a1a2	100%	16223T-16278T-16286T-16294T-16309G	3	0,6	1	2	4
L2a1c2a	100%	16193T-16213A-16223T-16239T-16278T-16294T-16309G	1	0,2	0	0	0
L2a1c3a1	96,38%	16189C-16223T-16278T-16290T-16294T-16309G	1	0,2	0	0	2
L2a1c3b	88,30%	16223T-16278T-16355T	3	0,6	0	0	0

Haploskupina	Spolehlivost určení	Haplotypy	Fulbové (N=544)	Fulbové (%)	severovýchodní Afrika a Blízký východ	severozápadní Afrika	východní Afrika
L2a1l3	95,33%	16093C-16189C-16192T-16223T-16278T-16294T-16309G-16357C	1	0,2	0	0	0
L2a2'3	94,66%	16189C-16223T-16229C-16234T-16278T-16291T-16294T-16311C	1	0,2	0	0	0
L2a2'3	89,95%	16067T-16183C-16189C-16223T-16229C-16278T-16291T-16294T-16311C	1	0,2	0	0	0
L2a2'3	86,81%	16136C-16189C-16223T-16229C-16270T-16278T-16291T-16294T-16311C	1	0,2	0	0	0
L2b	89,29%	16075C-16114A-16129A-16213A-16223T-16278T	3	0,6	0	0	0
L2b1	94,96%	16114A-16213A-16223T-16278T-16362C	2	0,4	0	0	0
L2b1a	93,99%	16114A-16129A-16213A-16223T-16278T-16294T-16355T-16362C	23	4,2	0	1	0
L2b1a	92,48%	16114A-16129A-16213A-16223T-16278T-16355T-16362C-16368C	1	0,2	0	0	0
L2b1a	89,14%	16114A-16213A-16223T-16278T-16294T-16355T-16362C	1	0,2	0	0	0
L2b1a	93,99%	16086G-16114A-16129A-16213A-16223T-16278T-16294T-16355T-16362C	1	0,2	0	0	0
L2b1a	84,55%	16114A-16129A-16213A-16223T-16278T-16294T-16355T-16362C-16365T	1	0,2	0	0	0
L2c1	95,50%	16223T-16278T-16311C-16318G	1	0,4	0	0	0
L2c1	86,75%	16189C-16223T-16261T-16278T-16318G	2	0,2	0	0	0
L2e	100%	16111A-16145A-16155T-16184T-16223T-16239T-16278T-16292T-16355T	1	0,2	0	0	0
L2e	100%	16111A-16145A-16184T-16223T-16239T-16278T-16292T-16355T	6	1,1	0	0	1
L3b	100%	16124C-16223T-16278T-16362C	47	8,6	9	4	8
L3b1a+@16124	89,56%	16093C-16223T-16278T-16362C	81	14,9	0	0	1
L3b1a+@16124	85,71%	16093C-16223T-16278T-16311C-16362C	2	0,2	0	0	0

Haploskupina	Spolehlivost určení	Haplotypy	Fulbové (N=544)	Fulbové (%)	severovýchodní Afrika a Blízký východ	severozápadní Afrika	východní Afrika
L3b1a+@16124	100%	16223T-16278T-16362C	9	1,7	2	1	2
L3b1a+@16124	85,11%	16093C-16189C-16223T-16278T-16362C	1	0,2	0	0	0
L3b1a+@16124	83,60%	16093C-16129A-16223T-16278T-16362C	2	0,4	0	0	0
L3b1a+@16124	93,10%	16189C-16223T-16278T-16362C	1	0,2	1	0	0
L3b1a+@16124	93,10%	16189C-16223T-16278T-16358G-16362C	1	0,2	0	0	0
L3b1a+@16124	89,56%	16093C-16223T-16278T-16333G-16362C	1	0,2	0	0	0
L3b1a+@16124	81,73%	16223T-16240G-16278T-16362C	1	0,2	0	0	0
L3b1a+@16124	89,56%	16093C-16223T-16249A-16278T-16362C	2	0,4	0	0	0
L3b1a3	91,37%	16086C-16124C-16223T-16278T-16311C-16362C	2	0,4	0	0	0
L3b1a9	100%	16051G-16223T-16278T-16362C	3	0,6	0	0	0
L3b2a	100%	16124C-16189C-16223T-16278T-16362C	2	0,4	1	2	0
L3b3	100%	16048A-16124C-16223T-16278T-16362C	1	0,2	0	0	0
L3d	100%	16124C-16223T	1	0,2	0	0	2
L3d	79,02%	16051G-16124C-16223T-16304C	2	0,4	0	0	0
L3d	86,11%	16124C-16223T-16320T	1	0,2	0	0	0
L3d	79,02%	16124C-16153A-16223T-16291T	1	0,2	0	0	0
L3d1a1'2	93,49%	16124C-16223T-16319A-16362C	19	3,5	0	0	0
L3d1a1'2	83,53%	16124C-16223T-16293G-16319A-16362C	1	0,2	0	0	0
L3d1a1'2	79,30%	16124C-16223T-16263G-16300A-16319C	1	0,2	0	0	0
L3d1a1'2	100%	16124C-16223T-16319C	1	0,2	1	0	27
L3d1b3a	89,67%	16124C-16223T-16256T-16294T	1	0,2	0	0	0
L3d1c	100%	16124C-16166G-16223T	3	0,6	0	2	0
L3d1d	100%	16124C-16223T-16256T-16368C	3	0,6	1	0	2
L3e1	87,92%	16086C-16223T-16327T	1	0,2	0	0	0
L3e1	70,77%	16037G-16111T-16167T-16223T-16327T	3	0,6	0	0	0
L3e1	84,79%	16178T-16223T-16327T	1	0,2	0	0	0

Haploskupina	Spolehlivost určení	Haplotypy	Fulbové (N=544)	Fulbové (%)	severovýchodní Afrika a Blízký východ	severozápadní Afrika	východní Afrika
L3e1	83,92%	16124C-16223T-16327T	1	0,2	0	0	0
L3e1d	90,17%	16176T-16223T-16266T-16327T	1	0,2	0	0	0
L3e1g	79,79%	16093C-16172C-16186T-16223T-16327T	1	0,2	0	0	0
L3e2	100%	16223T-16320T	2	0,4	2	4	1
L3e2a1b2	100%	16223T-16311C-16320T	1	0,2	0	1	0
L3e2b	95,43%	16172C-16189C-16223T-16311C-16320T-16358G	1	0,4	0	0	0
L3e2b	78,07%	16172C-16189C-16223T-16239T-16302G-16320T	1	0,2	0	0	0
L3e2b	100%	16172C-16183C-16189C-16223T-16320T	4	0,7	0	1	2
L3e2b	93,56%	16172C-16183C-16189C-16223T-16320T-16362C	1	0,2	0	0	0
L3e2b	77,70%	16172C-16189C-16209C-16223T-16234T-16311C-16319A-16320T	1	0,2	0	0	0
L3e2b	85,50%	16172C-16183C-16189C-16223T-16259T-16320T	2	0,4	0	0	0
L3e2b	75,76%	16150T-16172C-16189C-16223T-16224C-16320T	2	0,2	0	0	0
L3e2b	86,90%	16172C-16189C-16223T-16284C-16320T	1	0,2	0	0	0
L3e2b	93,56%	16172C-16183C-16189C-16223T-16320T-16361T-16362C-16364T	1	0,2	0	0	0
L3e5	89,15%	16041G-16192T-16223T	1	0,2	0	0	0
L3e5	100%	16041G-16223T	3	0,6	2	23	4
L3e5	92,78%	16041G-16192A-16223T	1	0,2	0	0	0
L3f1b	100%	16209C-16223T-16311C	1	0,2	3	5	17
L3f1b	93,20%	16189C-16209C-16223T-16311C	1	0,2	0	0	0
L3f1b+16292	100%	16209C-16223T-16292T-16311C	2	0,4	7	4	18
L3f3	90,73%	16176T-16209C-16223T	1	0,2	0	0	0
L4b2	90,78%	16093G-16223T-16287A-16293T-16301T-16311C-16355T-16362C	1	0,2	0	1	0

Haploskupina	Spolehlivost určení	Haplotypy	Fulbové (N=544)	Fulbové (%)	severovýchodní Afrika a Blízký východ	severozápadní Afrika	východní Afrika
M18	79,0%	16124C-16223T-16278T- 16318T	1	0,2	0	0	0
M2	88,0%	16223T-16274A-16278T	1	0,2	0	0	0
D4j7	75,35%	16082T-16223T-16264T-16278T-16343G-16362C	1	0,2	0	0	0
D4b2a1	83,4%	16093C-16223T-16278T-16355T-16362C	1	0,2	0	0	0
E1b+16261	89,8%	16223T-16261T-16278T-16362C	1	0,2	0	0	0
HV0	100%	16298C	2	0,4	21	25	0
H2a2a1	-	-	3	0,6	144	278	4
H3p	81,7%	16145A-16222T	21	3,9	0	2	0
H3p	69,9%	16145A-16167T-16222T	1	0,2	0	0	0
H7h	73,3%	16124C-16213A	1	0,2	0	0	0
U3	74,2%	16093C-16260T-16343G	1	0,2	0	1	0
U5b1b1b	100%	16189C-16192T-16270T-16320T	11	2,0	0	0	0
U6a1a	100%	16172C-16189C-16219G-16278T	1	0,2	4	18	8
X2h	100%	16189C-16278T	1	0,2	5	0	0
M51/L2	100%	16223T-16278T	36	6,6	1	2	0
M51/L2	80,5%	16214T-16223T-16278T	1	0,2	0	0	0
M51b1/ L2'3'4'6	100%	16223T-16278T-16311C	1	0,2	0	0	0
M51b1/ L2'3'4'6	85,9%	16192T-16223T-16278T-16311C	1	0,2	0	0	0