

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



**Analýza a charakteristika polymorfních
cross-species mikrosatelitů od trubkonosých
u plameňáka karibského
(*Phoenicopterus ruber*)**

Diplomová práce

Beáta Strejčková

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2018

Vedoucí práce: RNDr. Petr Nádvorník, Ph.D.

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně za použití uvedených literárních zdrojů a pod vedením RNDr. Petra Nádvorníka, Ph.D.

V Olomouci dne 23. 4. 2018

Souhrn

Tato diplomová práce se zabývá analýzou a charakteristikou polymorfních *cross-species* mikrosatelitů izolovaných od zástupců z řádu trubkonosí u plameňáka karibského (*Phoenicopterus ruber*) z řádu plameňáci za pomoci *cross-species* PCR amplifikace.

V rámci teoretické části je popsána problematika fylogeneze ptáků a zařazení plameňáka karibského do systému, které v posledních 40 letech doznalo mnoho změn. Dále je zde uvedena základní charakteristika mikrosatelitů, jejich klasifikace, evoluce a tři základní přístupy jejich hledání. Nakonec jsou popsány všechny doposud nalezené *cross-species* mikrosatelity u plameňáka karibského.

V experimentální části práce bylo pomocí *cross-species* PCR amplifikace s genomickou DNA 30 nepříbuzných jedinců plameňáka karibského analyzováno celkem 50 mikrosatelitů, již dříve označených jako polymorfní při testování u 6 nepříbuzných jedinců tohoto druhu (Strejčková, 2016). Jednalo se o 49 mikrosatelitů izolovaných od zástupců z řádu trubkonosí a jeden mikrosatelit od racka novozélandského z řádu dlouhokřídlí. Všechny 50 mikrosatelitů poskytlo PCR produkt, avšak pouze 45 z nich bylo polymorfních. Těchto 45 získaných polymorfních *cross-species* mikrosatelitů bylo testováno pomocí softwaru Genepop 4.1, který mezi lokusy RBG29 a Parm01 zjistil 100% vazbu. Srovnání sekvencí obou mikrosatelitů programem BLASTN 2.8.0 potvrdilo jejich totožnost. Lokus Parm01 byl pro problematiku hodnocení elektroforetogramů ze statistik vyloučen. Celkem tedy bylo programem Cervus 3.0.6 statisticky charakterizováno 44 nezávislých mikrosatelitových lokusů, s průměrným počtem alel na lokus 3,6. U dvou lokusů (Oc87B a Pacbel_03731) byla zjištěna vazba na chromozom Z.

Společně se 44 mikrosatelity z této práce je pro plameňáka karibského v současné době nalezeno 150 polymorfních mikrosatelitových lokusů; 142 *cross-species* a 8 *de novo*. Z těchto 150 mikrosatelitů je 127 nezávislých lokusů statisticky charakterizováno na souboru 30 nepříbuzných jedinců a dalších 23 je třeba v budoucnu ještě charakterizovat.

Summary

This master thesis deals with the analysis and characterization of polymorphic cross-species microsatellites isolated from representatives of the order Procellariiformes in the Caribbean flamingo (*Phoenicopterus ruber*) using cross-species PCR amplification.

In the theoretical part is described the problematic of avian phylogenetics and the taxonomic classification of the Caribbean flamingo, which has changed a lot in the last 40 years. Furthermore, this master thesis is focused on the characteristic of microsatellites, their classification, evolution and three different approaches used for searching new microsatellite loci. In the end, there are described all known microsatellites for the Caribbean flamingo.

In the experimental part of this master thesis was performed cross-species PCR amplification of the 50 microsatellite loci, which formerly showed polymorphism across 6 individuals of this species (Strejčková, 2016), on the genomic DNA of 30 unrelated individuals of the Caribbean flamingo. Forty nine out of 50 tested microsatellites were isolated from representatives of the order Procellariiformes and one microsatellite was derived from the red-billed gull from the order Charadriiformes. Out of the 50 loci, 45 proved to be polymorphic. These 45 polymorphic cross-species microsatellites were tested using software Genepop 4.1, that detected 100% linkage between RBG29 and Parm01. Alignment of the DNA sequences of these two loci made by BLASTN 2.8.0 confirmed their identity. Locus Parm01 was excluded from further analysis for the problematic evaluation. The statistical analysis of the 44 independent loci was ran in Cervus. Two to 11 alleles were detected per locus. Two out of 44 independent microsatellites (Oc87B and Pacbel_03731) are Z-linked.

To summarize, at the moment, 150 polymorphic microsatellite loci are found for the Caribbean flamingo, 142 cross-species and 8 de novo. One hundred and twenty-seven independent loci out of all 150 polymorphic loci were already statistical characterized in the set of 30 unrelated individuals of Caribbean flamingo and 23 need to be characterized in the future.

Tímto bych ráda poděkovala RNDr. Petru Nádvorníkovi, Ph.D. za odborné vedení mé diplomové práce, všechny poskytnuté materiály a cenné rady při zpracování její teoretické i experimentální části, ale především za jeho čas, ochotu a přátelský přístup.

Obsah

1	Úvod.....	1
2	Cíle práce	2
3	Literární přehled	3
3.1	Fylogeneze ptáků	3
3.1.1	Historie taxonomického zařazení plameňáků	4
3.2	Mikrosatelity	6
3.2.1	Klasifikace mikrosatelitů a jejich distribuce v genomu.....	7
3.2.2	Vznik a mutace mikrosatelitů	8
3.2.3	Hledání mikrosatelitů.....	9
3.2.4	<i>Cross-species</i> PCR amplifikace mikrosatelitů u ptáků.....	10
3.2.5	Polymorfní <i>cross-species</i> mikrosatelity u plameňáka karibského	11
4	Materiál a metody	15
4.1	Biologický materiál.....	15
4.2	Testované primery.....	15
4.3	PCR amplifikace mikrosatelitů	17
4.4	Zpracování PCR produktů pomocí elektroforetické separace	18
4.5	Statistické zpracování výsledků testování.....	21
4.6	Použité chemikálie	21
4.7	Použité roztoky.....	22
4.8	Použité laboratorní přístroje	23
5	Výsledky	25
6	Diskuze	37
7	Závěr	52
8	Použitá literatura	53
9	Přílohy.....	63

Seznam tabulek

Tabulka č. 1: Přehled a rozdělení 207 testovaných mikrosatelitů izolovaných od zástupců řádu trubkonosí do čeledí, počet nalezených polymorfních <i>cross-species</i> mikrosatelitů a úspěšnosti <i>cross-species</i> PCR amplifikace u plameňáka karibského (<i>Phoenicopterus ruber</i>) v rámci jednotlivých čeledí. V závorkách jsou uvedeny hodnoty reflektující i 6 <i>cross-species</i> mikrosatelitů polymorfních u druhů z řádu trubkonosí.	12
Tabulka č. 2: Přehled nalezených polymorfních <i>cross-species</i> mikrosatelitů pro plameňáka karibského v jednotlivých bakalářských a diplomových pracích vypracovaných v Laboratoři populační genetiky na Katedře buněčné biologie a genetiky na PřF Univerzity Palackého v Olomouci.	14
Tabulka č. 3: Seznam 49 mikrosatelitových lokusů odvozených od druhů z řádu trubkonosí, polymorfních při <i>cross-species</i> PCR amplifikaci u 6 nepříbuzných jedinců plameňáka karibského (Strejčková, 2016).	15
Tabulka č. 4: Složení PCR reakční směsi pro 30 vzorků.	17
Tabulka č. 5: Charakteristika 45 polymorfních mikrosatelitů testovaných na 30 nepříbuzných jedincích plameňáka karibského.	26
Tabulka č. 6: Porovnání mikrosatelitů polymorfních zároveň u 30 nepříbuzných jedinců plameňáka karibského (tato práce) a u 90 jedinců albatrosa stěhovavého a 50 jedinců albatrosa šedohlavého (Burg, 1999) vzhledem k teplotám <i>annealingu</i> při PCR amplifikaci lokusů a počtu detekovaných alel.	38
Tabulka č. 7: Porovnání mikrosatelitů polymorfních zároveň u 30 nepříbuzných jedinců plameňáka karibského (tato práce) a u 36 jedinců albatrosa černonohého a 12 jedinců albatrosa laysanského (Hernandez <i>et al.</i> , 2014) vzhledem k teplotám <i>annealingu</i> při PCR amplifikaci lokusů a počtu detekovaných alel.	38
Tabulka č. 8: Porovnání mikrosatelitů polymorfních zároveň u 30 nepříbuzných jedinců plameňáka karibského (tato práce) a u 77 jedinců buňáka útlozobého (Moodley <i>et al.</i> , 2015) vzhledem k teplotám <i>annealingu</i> při PCR amplifikaci lokusů a počtu detekovaných alel.	40
Tabulka č. 9: Porovnání mikrosatelitů polymorfních zároveň u 30 nepříbuzných jedinců plameňáka karibského (tato práce) a u 27 jedinců buňáčka madeirského, 22 jedinců buňáčka Monteirova a 24 jedinců buňáčka dlouhokřídlého (Sun <i>et al.</i> , 2009) vzhledem k teplotám <i>annealingu</i> při PCR amplifikaci lokusů a počtu detekovaných alel.	41

Tabulka č. 10: Porovnání mikrosatelitů polymorfních zároveň u 30 nepříbuzných jedinců plameňáka karibského (tato práce) a u 125 jedinců buňňáčka Monteirova (Bried <i>et al.</i> , 2012) vzhledem k teplotám <i>annealingu</i> při PCR amplifikaci lokusů a počtu detekovaných alel.....	42
Tabulka č. 11: Mikrosatelity izolované u zástupců řádu trubkonosí, které vykazovaly polymorfismus zároveň u 30 nepříbuzných jedinců plameňáka karibského (PhRu) (tato práce) i 6 nepříbuzných jedinců plameňáka růžového (PhRo) z řádu plameňáci (Kůrová, 2017), 13 nepříbuzných jedinců potápky roháče (PR) z řádu potápky (Janušová, 2017) nebo 6 nepříbuzných jedinců nesyta indomalajského (NI) z řádu brodiví (Nedvědová, 2015) a počty zjištěných alel (A) pro jednotlivé druhy.	45
Tabulka č. 12: Pět vybraných <i>cross-species</i> mikrosatelitů vhodných pro paternitní studie u plameňáka karibského.....	49

1 Úvod

Mikrosatelity jsou krátké úseky DNA složené z tandemově uspořádaných repetitivních jednotek dlouhých 1–10 párů bazí, které lze díky jejich variabilitě v počtu repeticí využít jako genetické markery. Výhodou je jejich *cross-species* přenositelnost mezi fylogeneticky blízce příbuznými druhy, díky čemuž odpadá nutnost časově a finančně náročné *de novo* izolace těchto lokusů pro každý nově studovaný druh.

Získání skupiny téměř univerzálních polymorfních *cross-species* mikrosatelitů pro klad Aequorlitorornithes, zahrnující velké vodní ptáky vyjma vrubozobých, by usnadnilo například studium variability populací druhů tohoto kladu, jejichž většina je ohrožena například znečištěním životního prostředí nebo ubýváním mokřadů a vodních ploch. Dále by mohlo využití takové skupiny markerů ulehčit parentální analýzu třeba u druhů chovaných v zoologických zahradách.

Pro plameňáka karibského (*Phoenicopterus ruber*) bylo doposud v Laboratoři populační genetiky na Katedře buněčné biologie a genetiky na PřF Univerzity Palackého v Olomouci objeveno 148 *cross-species* mikrosatelitů, z čehož bylo statisticky charakterizováno na souboru 30 nepříbuzných jedinců celkem 75 polymorfních lokusů původně izolovaných od druhů z několika řádů vodních ptáků patřících do kladu Aequorlitorornithes. V této práci navazuji na svoji bakalářskou práci (Strejčková, 2016), ve které jsem pomocí *cross-species* PCR amplifikace u šesti nepříbuzných jedinců plameňáka karibského testovala celkem 213 mikrosatelitových lokusů původně izolovaných od zástupců z řádu trubkonosí, dlouhokřídlí a pěvců, z čehož jsem 50 označila jako polymorfní. V této diplomové práci se zabývám analýzou a charakteristikou těchto nalezených mikrosatelitů u 30 nepříbuzných jedinců plameňáka karibského.

2 Cíle práce

1. Vypracování rešerše na téma diplomové práce.
2. Shromáždění dostupných literárních zdrojů.
3. Amplifikace a charakteristika mikrosatelitových lokusů na DNA třiceti nepříbuzných jedinců plameňáka karibského; jedná se o lokusy označené jako polymorfní v mé bakalářské práci (Strejčková, 2016). Tyto polymorfní lokusy srovnat s polymorfními mikrosatelity charakterizovanými v diplomové práci Aleše Drobka (Drobek, 2010) a Kateřiny Buržákové (Buržáková, 2013).

3 Literární přehled

3.1 Fylogeneze ptáků

Ptáci (Aves) jsou nejrozmanitější větví žijících čtyřnožců (Tetrapoda) a zahrnují více než 10 000 druhů, které se vyznačují neobyčejně různorodou morfologií, ekologií a chováním (Prum *et al.*, 2015). Ranná evoluce ptáků je považována za velice obtížný fylogenetický problém (Hackett *et al.*, 2008, Reddy *et al.*, 2017). Rozřešení fylogenetických vztahů mezi ptáky je ztíženo rychlou divergencí, která nastala v období jejich ranné evoluce (Poe *et Chubb*, 2004). Následkem toho vzniklo mnoho odlišných skupin ptáků s typickou stavbou těla (například sovy nebo papoušci), které mezi sebou spojuje pouze několik či dokonce žádný žijící druh (Hackett *et al.*, 2008). Určení fylogenetických vztahů je pak nejproblematictější u kladu Neoaves, který zahrnuje přibližně 95 % recentních ptačích druhů (Chojnowski *et al.*, 2008), včetně plameňáků (Phoenicopteriformes).

Spojení evoluční biologie a genomiky dalo vzniknout novému oboru – fylogenomice. Ta se snaží zrekonstruovat evoluční historii organismů na základě analýzy jejich genomů (Delsuc *et al.*, 2005). Kladogramy ptáků prezentované v nejnovějších fylogenomických studiích (Jarvis *et al.*, 2014, Prum *et al.*, 2015, Reddy *et al.*, 2017) se od sebe přesto nadále výrazně liší. Jedním z rozporů mezi dvěma z navrhovaných fylogenetických stromů ptáků je například přítomnost kladu převážně vodních ptáků, který popisují Prum *et al.* (2015), ne však Jarvis *et al.* (2014). Prum *et al.* (2015) si tyto rozdílnosti zdůvodňují odlišným počtem použitých vzorků a jiným způsobem interpretace dat. Reddy *et al.* (2017) se ve své studii mimo jiné zaměřili na vysvětlení toho, proč se fylogenetické stromy, které uvádějí Jarvis *et al.* (2014) a Prum *et al.* (2015), od sebe v mnohém liší a zkoumají alternativní hypotézy k tvrzení, že vzorkování většího počtu taxonů, a to bez nutnosti sekvenování celého genomu, je pro stanovení fylogeneze mnohem přesnější, než kompletně osekvenované genomy od malého počtu taxonů (Hillis *et al.*, 2003). Analýzou 90 % nekódujících sekvencí od 235 ptačích druhů (Reddy *et al.*, 2017) bylo zjištěno, že zvýšením počtu vzorkovaných taxonů překvapivě došlo ke zvýšení shody s fylogenetickým stromem z předchozí „na druhy chudé“ studie, která pracovala s daty obsahujícími převážně nekódující sekvence DNA (Jarvis *et al.*, 2014) a ne ke zvýšení shody se studií „na druhy bohatou“, která z velké části zkoumala kódující exony (Prum *et al.*, 2015). Na základě tohoto zjištění došli Reddy *et al.* (2017) k závěru,

že nejdůležitějším faktorem při studiu fylogeneze je typ použitých dat, a ne počet vzorkovaných taxonů, jak předpokládali Hillis *et al.* (2003).

3.1.1 Historie taxonomického zařazení plameňáků

Zařazení plameňáků do systému se v průběhu času měnilo v závislosti na použitém přístupu a vybrané metodě analýzy.

S ohledem na anatomické podobnosti, jako jsou například tvar pánve a žeber, řadili někteří autoři plameňáky k řádu brodiví (Ciconiiformes) (Cracraft, 1981), či dokonce navrhovali zařazení plameňáků jako jeho podřád (del Hoyo *et al.*, 1992). Naopak nohy opatřené plovací blánou, peří umožňující pobyt ve vodě, nebo hlas a chování mláďat plameňáků vedlo k názoru, že jsou plameňáci příbuzní spíše s řádem vrubozobí (Anseriformes) (del Hoyo *et al.*, 1992).

Na základě analýzy sekvencí čtyř mitochondriálních genů a DNA-DNA hybridizace dvou jaderných genů zástupců vodních ptáků a dalších k plameňákům potenciálně příbuzných druhů (jeřáb a chřástal z řádu krátkokřídlí a kachna z řádu vrubozobí) Van Tuinen *et al.* (2001) při studiu konvergence a divergence v evoluci vodních ptáků jako první zařadili plameňáky jako sesterskou skupinu potápek. Výsledek této molekulární analýzy byl následně potvrzen i morfologickou studií, která předkládá morfologické, oologické a parazitologické důkazy o příbuznosti těchto dvou řádů a pokládá tak taxon vzniklý z plameňáků a potápek za jeden z nejlépe podpořených kladů v rámci vodních ptáků (Mayr, 2004). Stejně tak tento klad vzniklý z plameňáků a potápek podporují výsledky analýzy 32 kb jaderné DNA získané od každého ze zástupců 171 ptačích druhů, která u kura domácího (*Gallus gallus*) odpovídá 19 různým lokusům zahrnujícím ze 74 % introny, z 23 % kódující exony a ze 3 % UTRs (*UnTranslated Regions*; nepřekládané oblasti) (Hackett *et al.*, 2008). Tato fylogenomická studie ale staví plameňáky a potápky mimo klad vodních ptáků zahrnující veslonohé, brodivé, trubkonosé, tučňáky a potáplce, což si Hackett *et al.* (2008) vysvětlují tím, že adaptace ptáků na různá prostředí, včetně vodního, nastala nejspíše několikrát.

Přiřazení plameňáků a potápek do jednoho kladu poté zůstává i v rámci novějších fylogenomických studií, avšak umístění tohoto kladu v rámci fylogenetického stromu Neoaves se mezi nimi výrazně liší (Jarvis *et al.*, 2014, Prum *et al.*, 2015, Reddy *et al.*, 2017). Jarvis *et al.* (2014) na základě fylogenetické analýzy celých genomů od 48 druhů ptáků, reprezentujících všechny řády Neoaves, taktéž plameňáky s potápkami k ostatním

[illegible]

Reddy *et al.* (2017) se v nejnovější fylogenomické studii zabývali rozřešením fylogenetických vztahů v rámci ptáků a k analýze zvolili kombinaci sekvencí ptačí DNA získaných již z předchozích studií (Hackett *et al.*, 2008, Braun *et al.*, 2011, Wang *et al.*, 2012, Kimball *et al.*, 2013, Smith *et al.*, 2013) a dat extrahovaných z nových sekvencí. Jako sesterský taxon k potápkám a plameňákům označili klad sestávající z měkkozobých (Columbiformes), mesitů (Mesitornithiformes) a stepokurů (Pterocliiformes) (viz obrázek č. 2).

nasednutí primeru na templátovou DNA při PCR amplifikaci mikrosatelitového lokusu, což vyústí v detekci tzv. nulové alely. Nulová alela mikrosatelitu je tedy definována jako jakákoliv alela, kterou nelze amplifikovat pomocí PCR (Dakin *et al.*, 2004). Její výskyt lze v populačních studiích zjistit otestováním Hardy-Weinbergovy rovnováhy, avšak pouze za předpokladu, že deficeience heterozygotů v populaci není způsobena například Wahlundovým efektem (Chapuis *et al.*, 2007).

Využití mikrosatelitů je široké a tyto vysoce polymorfní genetické markery se uplatňují například při stanovení fylogenetických vztahů mezi druhy, analýze genetické struktury populace, testování rodičovství a identity, ve forenzní genetice či genetickém mapování (Goldstein *et al.*, 1999).

3.2.1 Klasifikace mikrosatelitů a jejich distribuce v genomu

Dle typu repetitivní sekvence jsou mikrosatelity dělené na dokonalé, nedokonalé, přerušované a složené. U dokonalých mikrosatelitů není repetitivní sekvence přerušena (např. TATATATA), naopak u nedokonalých mikrosatelitů se mezi repetitivní sekvencí vyskytuje pár bází, který nezapadá do motivu (např. TATATACTA). U přerušovaných mikrosatelitů se mezi repetitivní sekvencí nachází krátká sekvence, která narušuje motiv (např. TATATAGCTGTA). Složené mikrosatelity obsahují dvě odlišné repetitivní sekvence (např. TATATATAGAGAGAGA). (Oliveira *et al.*, 2006)

Mikrosatelity jsou rozptýleny napříč genomem prokaryot i eukaryot, kde se vyskytují jak v protein-kódujících sekvencích, intronech ale i UTRs (Tóth *et al.*, 2000, Li *et al.*, 2004). Expanze či redukce mikrosatelitů v kódující oblasti může vést ke ztrátě nebo zisku funkce genu (Li *et al.*, 2004). Například expanze počtu repetitivních trinukleotidových mikrosatelitů hraje velkou roli při vzniku několika lidských genetických chorob, jako jsou syndrom fragilního X (Fu *et al.*, 1991), myotonická dystrofie (Brook *et al.*, 1992) či Huntingtonova choroba (Mangiarini *et al.*, 1996). Změny v počtu mikrosatelitů v 5'-UTR oblasti mohou přes transkripci a translaci regulovat genovou expresi, v 3'-UTR oblasti pak expanze mikrosatelitů může vést ke sklouznutí při transkripci (*transcription slippage*) a produkci prodloužené mRNA, která má narušený sestřih a pravděpodobně pak může ovlivňovat i jiné buněčné funkce. Intronicke mikrosatelity pak mohou narušit genovou expresi, sestřih a export mRNA do cytoplazmy. (Li *et al.*, 2004)

Co se týče mikrosatelitů v genomu obratlovců, Neff *et al.* (2001) uvádějí, že nezaznamenali žádné korelace mezi počtem mikrosatelitů a velikostí genomu, přičemž největší výskyt mikrosatelitů zaznamenali u ryb, a naopak nejmenší u ptáků.

Frekvence distribuce mikrosatelitů se liší nejen mezi druhy, ale také v rámci chromozomů jednoho organismu. Například u některých organismů (*Arabidopsis thaliana* a *Drosophila melanogaster*) byla pozorovaná snížená hustota mikrosatelitů v centromerické oblasti chromozomů (Pardue *et al.*, 1987, Lin *et al.*, 1999).

3.2.2 Vznik a mutace mikrosatelitů

Studie evoluce a mutací mikrosatelitů se zaměřují především na lokusy s větším počtem repeticí. U takových mikrosatelitů se může počet repetitivních jednotek následkem mutací zvyšovat či snižovat, a to obvykle o jednu repetici (Levinson *et al.*, 1987), což je pozorováno jako délkový polymorfismus mikrosatelitů mezi jedinci v populaci (Schlötterer *et al.*, 1992). Jako hlavní mechanismus těchto mutací je označován DNA *slippage*, který nastává v průběhu DNA replikace (Levinson *et al.*, 1987, Schlötterer *et al.*, 1992). Jelikož je DNA *slippage* vnímán jako závislý na špatném párování tandemových repetic v průběhu DNA replikace (Levinson *et al.*, 1987), u mikrosatelitů s malým počtem repetitivních jednotek by měl být vzácnější (Zhu *et al.*, 2000). Tomu nasvědčuje například i to, že mikrosatelitové lokusy s méně než pěti repeticemi jsou zřídka polymorfní a míra jejich polymorfismu se zvyšuje s rostoucím počtem repetic (Weber, 1990, Strassmann *et al.*, 1997, Zhu *et al.*, 2000). To, že je DNA *slippage* závislý na určitém počtu repeticí mikrosatelitového lokusu znamená, že pro vznik nového mikrosatelitu je za potřebí existence krátké sekvence DNA označované jako proto-mikrosatelit, která poté může být takto prodlužována (Levinson *et al.*, 1987). Z toho vyplývá, že musí existovat ještě jiný mechanismus pro vznik a brzkou evoluci mikrosatelitů, jejichž počet repetitivních jednotek nedosáhl prahové hodnoty, kterým mohou být například substituce (Levinson *et al.*, 1987, Stephan *et al.*, 1994, Messier *et al.*, 1996, Rose *et al.*, 1998).

Zhu *et al.* (2000) si vznik mikrosatelitů vysvětlují pomocí dvou hypotéz – první hypotéza se zabývá substitucemi a druhá insercemi duplikujícími přilehlé sekvence, přičemž substituce nastávají častěji a jsou hlavním zdrojem nových mikrosatelitových lokusů o dvou repeticích. Méně časté inserce jsou však důležité pro evoluci mikrosatelitů s vyšším počtem repeticí.

Co se týče již existujících mikrosatelitů a jejich mutací, četnost DNA *slippage* klesá od di- k tetranukleotidovým repeticiím (Kruglyak *et al.*, 1998) a naopak roste se zvyšující se délkou mikrosatelitového lokusu, tj. rostoucím počtem jednotek repetice (Anmarkrud *et al.*, 2008). Nekonečnému nárůstu jednotek repetice a prodlužování délky mikrosatelitového lokusu způsobeného DNA *slippage* je podle Kruglyak *et al.* (1998) zamezeno akumulací bodových mutací, konkrétně substitucí.

Mimo DNA *slippage* lze u mikrosatelitů pozorovat také méně časté nerovnoměrné rekombinace nebo bodové mutace (Harding *et al.*, 1992, Tóth *et al.*, 2000, Li *et al.*, 2004). Nerovnoměrný crossing-over může způsobit drastické změny v sekvenci mikrosatelitového lokusu ztrátou či získkem velkého počtu repeticí. V případě, že mikrosatelitové repetitivní sekvence vytvoří během synapse vlásenkovou strukturu, vymění si při crossing-overu homologní chromozomy fragmenty s odlišnou délkou, následkem čehož získá jeden chromozom delší fragment s větším počtem repetic a druhý naopak kratší fragment s menším počtem repetic. (Oliveira *et al.*, 2006)

Pokud nejsou tyto změny v DNA opraveny pomocí reparačních mechanismů, dochází ke vzniku nových mikrosatelitových alel, které mohou regulovat či měnit genové produkty a v některých případech vést až ke změně fenotypu (Li *et al.*, 2004).

Mutační rychlost mikrosatelitů je uváděna jako 10^{-6} až 10^{-2} na lokus a generaci (Harding *et al.*, 1992, Schlötterer, 2000) a mezi faktory, které ji ovlivňují, patří například počet repeticí, typ repeticí a *flanking* sekvence (Schlötterer, 2000).

3.2.3 Hledání mikrosatelitů

Mikrosatelity pro studium vybraného organismu lze získat celkem třemi základními přístupy, a to *de novo*, *in silico* nebo s využitím *cross-species* PCR amplifikace (Zane *et al.*, 2002, Dawson *et al.*, 2010).

Konvenční *de novo* metoda získávání mikrosatelitů z genomických knihoven je drahá a časově náročná (Varshney *et al.*, 2002) jelikož zahrnuje mnoho kroků, jako je konstrukce genomické knihovny obohacené o repetitivní motivy, izolace a sekvenování klonů obsahujících mikrosatelity, navrhování primerů, optimalizace PCR amplifikace pro každý pár primerů a testování polymorfismu na několika nepříbuzných jedincích (Zane *et al.*, 2002).

Konvenční *de novo* izolace mikrosatelitů je proto postupně nahrazována levnějším a rychlejším *in silico* prohledáváním databází sekvencí DNA za pomoci speciálních

programů, jako jsou například MISA (*MicroSatellite*) či TROLL (*Tandem Repeats Occurent Locator*) (Sharma *et al.*, 2007). Pomocí MISA softwaru je možné systematicky prohledávat EST databáze a hledat mikrosatelity pro vývoj nových EST mikrosatelitových markerů (Varshney *et al.*, 2002). Nevýhodou EST odvozených mikrosatelitů je obecně jejich nižší polymorfismus, jelikož jsou asociované s evolučně stabilními transkribovanými geny (Varshney *et al.*, 2002). Naopak výhodou je jejich lepší *cross-species* přenositelnost (Coulibaly *et al.*, 2005), čehož využili například Dawson *et al.* (2010), kteří navrhli set konzervovaných primerů pro celkem 33 ptačích mikrosatelitových lokusů vhodných ke studiu populací či paternity.

Právě *cross-species* PCR amplifikace mikrosatelitových lokusů mezi blízkce příbuznými druhy je další způsob, jak získat mikrosatelity pro nově studovaný druh (Schlötterer *et al.*, 1991). Úspěšnost *cross-species* PCR amplifikace mikrosatelitů negativně koreluje s evoluční divergencí mezi zdrojovým druhem (tj. druhem, u kterého byl mikrosatelit izolován) a cílovým druhem (tj. druhem, u kterého je prováděna *cross-species* amplifikace) (Primmer *et al.*, 1996). *Cross-species* mikrosatelity hrají velkou roli především při studiu ptáků, jejichž genomy obsahují v porovnání s ostatními obratlovci nejméně mikrosatelitových lokusů (Primmer *et al.*, 1997, Neff *et al.*, 2001).

Postupný vývoj sekvenování nové generace umožnil jeho využití taktéž k rychlému a relativně levnému (oproti konvenčnímu *de novo* přístupu) nalezení nových mikrosatelitových lokusů u jakéhokoliv druhu. Hledání mikrosatelitů pomocí genomového sekvenování popisují Abdelkrim *et al.* (2009) – jedná se o *de novo* získání mikrosatelitů za pomoci tzv. *shotgun* sekvenování, které poskytne krátké úseky sekvencí, jenž jsou následně *in silico* prohledávány bioinformatickými nástroji.

3.2.4 *Cross-species* PCR amplifikace mikrosatelitů u ptáků

Hustota mikrosatelitů v ptačím genomu, vypočítaná jako jeden mikrosatelitový lokus na 20–39 kb, je o mnoho nižší než například v lidském genomu, u kterého se udává jeden mikrosatelitový lokus na 6 kb (Primmer *et al.*, 1997). Tato skutečnost může být vysvětlena tím, že genom ptáků obsahuje relativně méně nekódující DNA než genom většiny savců, a dále tím, že ptačí mikrosatelity nejspíše nejsou asociované s krátkými rozptýlenými repetitivními elementy (SINEs), které u savců končí poly(A) sekvencí a poskytují zdroj pro evoluci mikrosatelitů (Beckmann *et al.*, 1992, Acrot *et al.*, 1995, Primmer *et al.*, 1997).

Kromě evoluční vzdálenosti mezi zdrojovým a cílovým druhem patří mezi faktory ovlivňující *cross-species* PCR amplifikaci mikrosatelitů u ptáků například snížení teploty *annealingu* PCR reakce, což zvýší šanci na úspěšnou *cross-species* amplifikaci nezávisle na genetické vzdálenosti mezi zdrojovým a cílovým druhem.

3.2.5 Polymorfní *cross-species* mikrosatelity u plameňáka karibského

Pro plameňáka karibského bylo dosud nalezeno celkem 148 polymorfních *cross-species* mikrosatelitů, z čehož bylo doposud 75 plně charakterizováno.

Deset polymorfních *cross-species* mikrosatelitů pro plameňáka karibského našel Drobek (2008), při testování celkového počtu 70 mikrosatelitů izolovaných od druhů z řádů veslonozí, brodiví a potápky. *Cross-species* PCR amplifikaci těchto lokusů provedl na DNA izolované od 6 nepříbuzných jedinců plameňáka karibského. Ve své diplomové práci Drobek (2010) potom amplifikoval a statisticky charakterizoval těchto 10 získaných polymorfních *cross-species* mikrosatelitů ze své bakalářské práce na DNA 30 nepříbuzných jedinců. Dále otestoval na *cross-species* PCR amplifikaci u plameňáka karibského dalších 214 mikrosatelitů od druhů z řádů brodiví, veslonozí, potápky, potáplice, tučňáci, dlouhokřídli a vrubozobí. Získal celkem 33 polymorfních *cross-species* mikrosatelitů pro plameňáka karibského, které charakterizoval na 30 nepříbuzných jedincích, a označil za vhodné například pro parentální analýzu.

Matošková (2011) ve své bakalářské práci otestovala na *cross-species* PCR amplifikaci u 6 nepříbuzných jedinců plameňáka karibského 78 mikrosatelitových lokusů izolovaných od druhů z řádů plameňáci, veslonozí a brodiví a našla celkem 35 polymorfních mikrosatelitů, z čehož 31 lokusů bylo amplifikováno pomocí primerů původně navržených pro plameňáka růžového (*P. roseus*) z řádu plameňáci. Na prvotní analýzu těchto lokusů navázala svou diplomovou prací Buržáková (2013), která je dále analyzovala a charakterizovala na DNA 30 nepříbuzných jedincích plameňáka karibského, na základě čehož dva lokusy vyloučila – jeden označila za monomorfní a druhý jako nehodnotitelný. Dále našla 5 nových polymorfních mikrosatelitů odvozených od volavky rusohlavé (*Bubulcus ibis*) z řádu veslonozí a od čápa východního (*Ciconia boyciana*) z řádu brodiví, které doposud nebyly na *cross-species* PCR amplifikaci u plameňáka karibského testovány. Opětovným testováním mikrosatelitů, které byly již dříve označeny za polymorfní u plameňáka růžového, avšak za monomorfní u plameňáka karibského (Drobek, 2010, Manišová 2011), našla další 4 polymorfní *cross-*

species mikrosatelity. Celkem tedy Buržáková (2013) pro plameňáka karibského našla a statisticky charakterizovala na 30 nepříbuzných jedincích 42 polymorfních mikrosatelitových lokusů.

Ve své bakalářské práci (Strejčková, 2016) jsem na šesti nepříbuzných jedincích plameňáka karibského otestovala pomocí *cross-species* PCR amplifikace celkem 213 mikrosatelitových lokusů, z čehož 207 bylo původně *de novo* izolovaných od zástupců řádu trubkonosí a u zbylých 6 se jednalo o *cross-species* mikrosatelity polymorfní u zástupců řádu trubkonosí, původně odvozené od zástupců z řádů dlouhokřídlí (Charadriiformes) a pěvci (Passeriformes). Ze všech 213 testovaných lokusů jsem označila 50 za polymorfní, což znamená že hodnota úspěšnosti *cross-species* PCR amplifikace testovaných mikrosatelitových lokusů u plameňáka karibského činila 23 %.

Z počtu 207 testovaných mikrosatelitových lokusů odvozených od zástupců z řádu trubkonosí pocházelo 53 od druhů z čeledi albatrosovití, 100 od druhů z čeledi buřňákovití a 54 od druhů z čeledi buřňáčkovití. V rámci řádu trubkonosí jsem za polymorfní označila 49 mikrosatelitových lokusů z 207 a celková hodnota úspěšnosti *cross-species* PCR amplifikace se rovnala 24 %. Přehled počtu polymorfních mikrosatelitů a úspěšnosti *cross-species* PCR amplifikace pro jednotlivé čeledi řádu trubkonosí uvádím v tabulce č. 1.

Tabulka č. 1: Přehled a rozdělení 207 testovaných mikrosatelitů izolovaných od zástupců řádu trubkonosí do čeledí, počet nalezených polymorfních *cross-species* mikrosatelitů a úspěšnosti *cross-species* PCR amplifikace u plameňáka karibského (*Phoenicopiterus ruber*) v rámci jednotlivých čeledí. V závorkách jsou uvedeny hodnoty reflektující i 6 *cross-species* mikrosatelitů polymorfních u druhů z řádu trubkonosí.

Čeleď	Počet testovaných mikrosatelitů	Počet polymorfních mikrosatelitů	Úspěšnost <i>cross-species</i> PCR amplifikace [%]
Albatrosovití	53	9	17
Buřňákovití	100 (+6)	27 (+1)	27 (26)
Buřňáčkovití	54	13	24
Celkem	207 (+6)	49 (+1)	24 (23)

Co se týče jednotlivých druhů z řádu trubkonosí, největší počet *cross-species* mikrosatelitů polymorfních u plameňáka karibského byl odvozen od buřňáka útlozobého z čeledi buřňákovití; jednalo se o 11 lokusů z 32 testovaných. Nejvyšší úspěšnost *cross-species* PCR amplifikace u plameňáka karibského (46 %) ale vykazovaly mikrosatelity

izolované od buňáka světloňého, který je také řazen do čeledi buňákovití; z 11 mikrosatelitových lokusů jsem označila 5 jako polymorfní.

Na *cross-species* PCR amplifikaci u plameňáka karibského jsem testovala také 6 lokusů odvozených od zástupců z řádu dlouhokřídlí (Charadriiformes) a pěvci (Passeriformes). Z 5 *cross-species* mikrosatelitů polymorfních u zástupců řádu trubkonosí, původně odvozených od zástupců z řádu dlouhokřídlí jsem jako polymorfní označila pouze jeden mikrosatelitový lokus, a to RBG29 od racka novozélandského (*Larus novaehollandiae scopulinus*) z řádu dlouhokřídlí (Charadriiformes), který byl polymorfní při *cross-species* PCR amplifikaci u buňáka taiko z řádu trubkonosí, z čeledi buňákovití (Lawrence, 2008 podle Given *et al.*, 2002). Jediný testovaný mikrosatelit původně izolovaný od zástupce z řádu pěvci, a to konkrétně Dpμ01 od lesňáčka žlutoňého (*Dendroica petechia*) (Welch *et al.* (2011) podle Dawson *et al.* (1997), polymorfismus při *cross-species* PCR amplifikaci u plameňáka karibského nevykazoval.

Zlochová (2017) na šesti nepříbuzných jedincích plameňáka karibského testovala polymorfismus celkem 171 mikrosatelitových lokusů, z nichž bylo 113 izolovaných od zástupců z řádu tučňáci (Sphenisciformes) a u 58 se jednalo o univerzální ptačí mikrosatelity. Celkem nalezla 23 polymorfních mikrosatelitů, z nichž 16 pocházelo od 6 různých druhů tučňáků a zbylých 7 byly univerzální ptačí mikrosatelity. Celková úspěšnost *cross-species* PCR amplifikace testovaných lokusů u plameňáka karibského byla 13,50 %, pro mikrosatelity odvozené od zástupců z řádu tučňáci 14,16 % a pro univerzální ptačí mikrosatelity 12,28 %.

Shrnutí počtů nalezených polymorfních *cross-species* mikrosatelitů pro plameňáka karibského v jednotlivých pracích, jejichž experimentální část byla provedena v Laboratoři populační genetiky na Katedře buněčné biologie a genetiky na PřF Univerzity Palackého v Olomouci, včetně řádů od jejichž zástupců byly tyto lokusy původně odvozeny, je uvedeno v tabulce č. 2. V tabulce je dále vyznačeno, zda u těchto mikrosatelitů již byla provedena podrobná charakteristika na větším počtu jedinců.

Tabulka č. 2: Přehled nalezených polymorfních *cross-species* mikrosatelitů pro plameňáka karibského v jednotlivých bakalářských a diplomových pracích vypracovaných v Laboratoři populační genetiky na Katedře buněčné biologie a genetiky na PřF Univerzity Palackého v Olomouci. V závorce je uveden počet testovaných jedinců.

Práce	Počet nalezených lokusů (6)	Charakteristika lokusů (30)	Zdrojové řády
Drobek (2008, 2010)	33	ano	brodiví, veslonozí, potápky, potáplíce, tučňáci, dlouhokřídlí, vrubozobí
Matošková (2011), Buržáková (2013)	42	ano	brodiví, veslonozí, plameňáci
Strejčková (2016)	50	ne (tato práce)	trubkonosí, dlouhokřídlí
Zlochová (2017)	23	ne	tučňáci, univerzální ptačí mikrosatelity

Dosavadní počet 148 nalezených polymorfních *cross-species* mikrosatelitů pro plameňáka karibského, z čehož je 75 statisticky charakterizováno na 30 nepříbuzných jedincích a 73 pouze označeno za polymorfní po PCR amplifikaci s DNA 6 nepříbuzných jedinců, se po otestování polymorfismu všech lokusů na větším počtu jedinců (30) ještě pravděpodobně sníží. Padesáti polymorfními lokusy, které byly nalezeny v bakalářské práci u 6 nepříbuzných jedinců plameňáka karibského (Strejčková, 2016), se zabývá tato práce. Dalších 23 lokusů, které našla Zlochová (2017) je třeba ještě otestovat na souboru 30 jedinců a poté statisticky charakterizovat pomocí programů Cervus (Kalinowski *et al.*, 2007) a Genepop (Rousset, 2008).

4 Materiál a metody

4.1 Biologický materiál

Biologický materiál pro účely této diplomové práce byl poskytnut pracovníky Zoologické zahrady Dvůr Králové. Třiceti nepříbuzným jedincům plameňáka karibského (*Phoenicopiterus ruber*) byla odebrána krev, z níž můj školitel za použití fenol-chloroformové metody izoloval genomickou DNA, která byla následně rozpuštěná v TE pufru a naředěná na koncentraci od 10 do 50 µg/ml.

4.2 Testované primery

Celkem bylo ke *cross-species* PCR amplifikaci mikrosatelitů u 30 nepříbuzných jedinců plameňáka karibského použito 50 párů primerů, které u 6 nepříbuzných jedinců plameňáka karibského amplifikovaly polymorfní lokus v rámci bakalářské práce (Strejčková, 2016) (viz tabulka č. 3).

Mimo 49 mikrosatelitů odvozených od zástupců řádu trubkonosí byl při *cross-species* PCR amplifikaci použit také lokus RBG29 (GenBank Accession no. AY091853) původně odvozený od racka novozélandského (*Larus novaehollandiae scopulinus*) z řádu dlouhokřídlí (Charadriiformes) (Given *et al.*, 2002), který byl testován, jelikož vykazoval polymorfismus při *cross-species* PCR amplifikaci u buňáka taiko (Lawrence, 2008).

Tabulka č. 3: Seznam 49 mikrosatelitových lokusů odvozených od druhů z řádu trubkonosí, polymorfních při *cross-species* PCR amplifikaci u 6 nepříbuzných jedinců plameňáka karibského (Strejčková, 2016).

Čeď	Zdrojový druh	Název lokusu (GenBank Accession no.)	Literární zdroj
Albatrosovití (Diomedidae)	albatros stěhovavý (<i>Diomedea exulans</i>)	De3 (AF096789)	Burg, 1999
	albatros šedohlavý (<i>D. chrysostoma</i>)	Dc5 (AF096790) Dc22 (AF096803) Dc31 (AF096810)	
	albatros černonohý (<i>Thalassarche melanophris</i>)	BFAL4 (neuvedeno) BFAL14 (neuvedeno)	
	albatros laysanský (<i>Phoebastria immutabilis</i>)	LAAL7 (neuvedeno) LAAL19 (neuvedeno)	Hernandez <i>et al.</i> , 2014
	albatros bělohřbetý (<i>P. albatrus</i>)	STAL18 (neuvedeno)	

Tabulka č. 3: Pokračování 1.

Čeleď	Zdrojový druh	Název lokusu (GenBank Accession no.)	Literární zdroj
Buřňákovití (Procellariidae)	buřňák trinidadský (<i>Pterodroma arminjoniana</i>)	Parm01 (EU360817)	Brown <i>et al.</i> , 2009
	buřňák havajský (<i>P. sandwichensis</i>)	Ptero05 (HQ918222)	Welch <i>et al.</i> , 2011
	buřňák Bulwerův (<i>Bulweria bulwerii</i>)	Bb11 (HM171894) Bb21 (HM171897) Bb22 (HM171898) Bb25 (HM171901)	Andris <i>et al.</i> , 2010
	buřňák bělobradý (<i>Procellaria aequinoctialis</i>)	Paequ3 (AY371071) Paequ7 (AY371073) Paequ8 (AY371074)	Techow <i>et al.</i> , 2004
	buřňák šedý (<i>Calonectris diomedea</i>)	Cd5 (EU029087)	Bried <i>et al.</i> , 2008
	buřňák baleárský (<i>Puffinus mauretanicus</i>)	Puff G2F (EU158899)	Gonzales <i>et al.</i> , 2009
	buřňák světlonohý (<i>P. carneipes</i>)	Pc A105 (JX435471) Pc A107 (JX435472) Pc B109 (JX435475) Pc B115 (JX435476) Pc D103 (JX435479)	Hardesty <i>et al.</i> , 2013
	buřňák útlozobý (<i>Pachyptila belcheri</i>)	Patbel1 (JF288775) Patbel4 (JF288778) Pacbel_00386 (neuvedeno) Pacbel_03731 (neuvedeno) Pacbel_07265 (neuvedeno) Pacbel_08509 (neuvedeno) Pacbel_08988 (neuvedeno) Pacbel_09021 (neuvedeno) Pacbel_09528 (neuvedeno) Pacbel_10033 (neuvedeno) Pacbel_17944 (neuvedeno)	Quillfeldt <i>et al.</i> , 2012 Moodley <i>et al.</i> , 2015
Buřňáčkovití (Hydrobatidae)	buřňáček Monteirův (<i>Oceanodroma monteiroi</i>), buřňáček dlouhokřídý (<i>O. leucorhoa</i>)	Oc28B (FJ238097) Oc49 (FJ238098) Oc63 (FJ238100) Oc79 (FJ238102) Oc87B (FJ238104) Ol10-39 (FJ238106)	Sun <i>et al.</i> , 2009

Tabulka č. 3: Pokračování 2.

Čeď	Zdrojový druh	Název lokusu (GenBank Accession no.)	Literární zdroj
Buňáčkovití (Hydrobatidae)	buňáček Monteiřův (<i>O. monteiřoi</i>)	Omn1 (JQ303226) Omn3 (JQ303228) Omn8 (JQ303232) Omn21 (JQ303238)	Bried <i>et al.</i> , 2012
	buňáček dlouhokřídľý (<i>O. leucorhoa</i>)	Ole02 (FR696378) Ole09 (FR696385) Ole13 (FR696389)	Bicknell <i>et al.</i> , 2011

4.3 PCR amplifikace mikrosatelitů

Každý pár testovaných primerů (viz tabulka č. 3) byl použit k amplifikaci genomické DNA 30 nepříbuzných jedinců plameňáka karibského. Složení PCR reakční směsi je uvedeno v tabulce č. 4.

Tabulka č. 4: Složení PCR reakční směsi pro 30 vzorků.

Složky PCR reakční směsi	Objem (μl)
Deionizovaná voda	222,0
Reakční pufr 10x	33,5
Roztok MgCl ₂ (25 mmol/l)	20,0
Roztok dNTPs (20 μmol/l)	3,5
Primer F (10 μmol/l)	16,5
Primer R (10 μmol/l)	16,5
aTaq DNA polymeráza (5 U/μl)	5,0

1. Chemikálie k přípravě PCR reakční směsi rozmrazit, zvortexovat a zcentrifugovat.
2. Do 1,5ml mikrozkuřavky napipetovat dle tabulky č. 4 jednotlivé složky PCR reakční směsi, tu následně zvortexovat a zcentrifugovat.
3. Do PCR mikrozkuřavek napipetovat po 1 μl genomické DNA plameňáka karibského.
4. Do PCR mikrozkuřavek s genomickou DNA připipetovat 9 μl PCR reakční směsi.
5. Mikrozkuřavky umístit do termocykľeru a nastavit časový a teplotní profil dle schématu č. 1.

Schéma č. 1: Základní časový a teplotní profil PCR reakce

1. 94 °C ... 5 min
2.

94 °C ... 30 s	}	35x
T _a °C ... 30 s		
72 °C ... 30 s		
3. 72 °C ... 7 min

Jako výchozí teplota annealingu (T_a) pro jednotlivé páry primerů byla použita finální T_a uvedená v mé bakalářské práci (Strejčková, 2016). V případě potřeby byla teplota upravována (viz Výsledky).

4.4 Zpracování PCR produktů pomocí elektroforetické separace

Pro elektroforetickou separaci DNA za denaturujících podmínek byla použita vyhřívaná sekvenační elektroforetická komůrka S2 Whatman Biometra, s rozměry skel 330 x 390 mm a 330 x 420 mm a tloušťkou gelu 0,4 mm.

1. Malé i velké sklo omýt pomocí kartáčku vodou se saponátem, poté opláchnout deionizovanou vodou a osušit. Následně plochu, která přijde do kontaktu s gelem, 2x opláchnout 96% ethanolem a osušit papírovou utěrkou.
2. Plochu malého skla, která bude v kontaktu s gelem, ošetřit 1 ml připraveného molekulárního lepidla. Roztok důkladně rozetřít po celé ploše skla papírovou utěrkou a nechat asi 4 minuty zaschnout. Poté sklo 4x opláchnout 96% ethanolem a vždy utřít papírovou utěrkou dosucha.
3. Velké sklo ošetřit na ploše, která se bude dotýkat gelu, pomocí vodoodpudivého přípravku na skla automobilů (Rain-off). Přípravek rozetřít papírovou utěrkou po celé ploše a nechat zaschnout asi 5 minut. Po zaschnutí 2x opláchnout deionizovanou vodou a vždy utřít papírovou utěrkou dosucha.
4. Velké sklo položit na vodorovně umístěnou polystyrenovou desku v digestoři tak, aby jeho ošetřená plocha směřovala nahoru. Po stranách položit 0,4 mm silné spacery a na ně položit malé sklo ošetřenou plochou dolů. Srovnat spacery až k okrajům skel a gumy spacerů přiložit těsně k hraně malého skla. Skla na každé straně v místě spacerů sepnout pomocí dvou klipsů. Na jedné krátké straně jsou hrany skel těsně v zákrytu a na protilehlé jsou hrany skel vzájemně posunuty přibližně o 2,5 cm.

5. Připravit si polyakrylamidový gel do kádinky, roztok promíchat a pomalu nalévat mezi mírně nakloněná skla tak, aby nedošlo ke vzniku vzduchových bublin.
6. Po zaplnění prostoru mezi skly gelem vsunout hřebínek mezi skla v místě plnění rovnou stranou asi 0,5 cm hluboko. V místě hřebínku obě skla sepnout pomocí 4 klipsů a nechat gel nejméně hodinu polymerizovat.
7. Po zpolymerizování gelu odstranit klipsy a skla pomocí vody a kartáčku očistit od zbytků polyakrylamidu. Poté skla osušit papírovou utěrkou a upevnit do elektroforetické komůrky, přičemž čelo s hřebínkem směřuje nahoru a kratší sklo je orientované směrem k hliníkové desce elektroforetické komůrky.
8. Do anodového i katodového prostoru nalít 0,5x TBE pufr. Opatrně vytáhnout hřebínek a vzniklý prostor mezi skly vypláchnout proudem pufru z injekční stříkačky. Uzavřít anodový a katodový prostor, nasadit elektrody a na zdroji stejnosměrného elektrického proudu nastavit výkon na hodnotu 90 W (hodnoty elektrického napětí i proudu jsou nastaveny na maximum: 3000 V/150 mA). Za těchto podmínek nechat gel nahřát (asi 30 minut).
9. Těsně před nanesením vzorků připravených smísením 10 μ l PCR produktu a 5 μ l nanášecího pufru, vložit vzorky na 3 minuty do denaturujících podmínek zajištěných např. termocyklerem vytemperovaným na 96 °C. Po vytažení mikrozkuhavky ihned vložit do ledové tříště, aby se zabránilo opětovné renaturaci denaturovaných vláken DNA produktů.
10. Během denaturace DNA produktů vypnout zdroj stejnosměrného elektrického proudu, odpojit katodu a otevřít katodový prostor. Pomocí proudu 0,5x TBE pufru z injekční stříkačky opět důkladně vyčistit prostor pro hřebínek od zbytků polyakrylamidu a rozpuštěné močoviny. Do vyčištěného prostoru opatrně vsunout hřebínek tak, aby zoubky byly asi 1 mm hluboko v gelu.
11. Denaturované vzorky nanést po 1,5 μ l do jamek vzniklých mezi zoubky hřebínku. Po nanesení všech vzorků katodový prostor znovu uzavřít, připojit katodu a nastavit na zdroji stejnosměrného elektrického proudu hodnotu výkonu 70 W (hodnoty elektrického napětí i proudu jsou nastaveny na maximum: 3000 V/150 mA).
12. Čas separace se liší v závislosti na relativních molekulových hmotnostech jednotlivých separovaných PCR produktů, přičemž obvykle se jedná o 90–240 min. Pro orientační určení času separace slouží barviva obsažená v nanášecím pufru – bromfenolová a xylenová modř.

13. Zatímco probíhá elektroforetická separace vzorků připravit 800 ml fix/stop roztoku, 800 ml 1% roztoku HNO_3 , 800 ml vývojky a 800 ml 0,1% roztoku AgNO_3 . Vývojku umístit do chladničky a vychladit na teplotu nižší než 10 °C.
14. Po skončení elektroforetické separace PCR produktů vypnout zdroj stejnosměrného elektrického proudu, odpojit obě elektrody a šroubem na pravé straně elektroforetické komůrky uvolnit hadičku, která slouží jako kanálek pro odtok pufru z katodové části do sběrného prostoru. Poté povolit šrouby úchyťů skel, skla s gelem vyjmout, položit na vodorovnou podložku menším sklem vzhůru, vytáhnout spacers a pomocí čepele nože od sebe skla odpáčit.
15. Menší sklo s gelem vložit gelem nahoru do fotomisky, tu umístit na třepačku, zalít fix/stop roztokem a nechat působit přibližně 20 minut. Roztok slít do Erlenmeyerovy baňky a sklo s gelem 3x promýt asi 1 l deionizované vody. Dále nechat na třepačce asi 4 minuty promýt v 1% roztoku HNO_3 a po vylití roztoku sklo s gelem 4x promýt asi 1 l deionizované vody.
16. Sklo s gelem umístit na třepačku na 30 minut do 0,1% roztoku AgNO_3 , do kterého těsně před použitím přidat 1,2 ml formaldehydu. Před koncem této doby nachystat jednu fotomisku s asi 1 l deionizované vody a druhou na vyvolávání, do které poté nalít vychlazenou vývojku s 1,2 ml formaldehydu a 160 μl 1% roztoku $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$.
17. Fotomisku s gelem v roztoku AgNO_3 sejmout z třepačky, roztok slít do zásobní lahve, sklo s gelem vyjmout, ponořit na 5 vteřin do misky s deionizovanou vodou, umístit do přichystané fotomisky na třepačku a zalít připravenou vývojkou.
18. Sledovat vývoj stříbrem obarvených bandů PCR produktů, které mají hnědočernou barvu. Když jsou dostatečně zřetelné, zastavit vyvíjení zbarvení přilítím fix/stop roztoku a nechat působit dokud z roztoku uniká CO_2 v podobě bublinek.
19. Sklo s gelem poté asi na 2 minuty vložit do fotomisky s deionizovanou vodou a pak umístit na 0,5–1 hodinu do sušárny, kde se gel vysuší při teplotě 90 °C.
20. Vysušený gel je možné vyhodnotit na negatoskopu.
21. Po vyhodnocení gel nechat ze skla odlepit v roztoku NaOH (1 mol/l). Po důkladném umytí je možné sklo opět použít.

4.5 Statistické zpracování výsledků testování

Získané genotypy všech polymorfních mikrosatelitů byly zpracovány v programu MS Office Excel 2016 a následně převedeny z formátu .xls do formátu .csv a statisticky vyhodnoceny pomocí programu Cervus 3.0.6 (Kalinowski *et al.*, 2007), který stanovil hodnoty očekávané a pozorované heterozygotnosti, obsah polymorfní informace, odchylky od Hardy-Weinbergovy rovnováhy a odhadované frekvence výskytu nulových alel. Dále bylo pomocí webové verze programu Genepop 4.1 (Rousset, 2008) u polymorfních lokusů analyzováno, zda nejsou ve vazbě.

Sekvence mikrosatelitových lokusů, mezi nimiž byla zjištěna vazba jsem porovnála pomocí programu BLASTN 2.8.0 (Altschul *et al.*, 1997).

4.6 Použité chemikálie

- Akrylamid (Sigma)
- *aTaq* DNA polymeráza (5 U/μl), M1241 (Promega)
- Bromfenolová modř (Serva)
- dNTPs (100 mmol/l, 400 μl každého), U1240 (Promega)
- Deionizovaná voda
- Dusičnan stříbrný (Sigma)
- Ethanol 96% roztok (Lihovar Vrbátky)
- Ethylendiaminotetraoctan sodný – Na₂EDTA (Lachner)
- Formaldehyd (Lachema)
- Formamid (Lachema)
- Hydroxid sodný (Lachner)
- Chlorid sodný (Lachema)
- Kyselina boritá (Lachner)
- Kyselina dusičná 65% roztok (Lachner)
- Kyselina octová (Lachner)
- 3-methakryloxypropyltrimethoxysilan (Serva)
- Močovina (Lachner)
- N, N'-methylenbisakrylamid (Serva)
- N, N, N', N'-tetramethylethyldiamin – TEMED (Serva)
- Peroxodisíran amonný (Serva)
- Rain-off – tekuté stěrače (Sheran)

- Thiosíran sodný (Lachema)
- Trishydroxymethylaminomethan – Tris (AppliChem)
- Uhličitan sodný (Lachner)
- Xylenová modř – Xylencyanol FF (AppliChem)

4.7 Použité roztoky

Akrylamid, 6% zásobní roztok

- 150 ml 40% zásobního roztoku akrylamid : N, N' - methylenbisakrylamid 19:1
- 420 g močoviny
- 50 ml 10x TBE
- 484 ml deionizované vody
- po rozpuštění všech složek zfiltrovat a uložit v temné lahvi v chladničce

Dusičnan stříbrný, 0,1% roztok

- 0,8 g dusičnanu stříbrného
- 800 ml deionizované vody
- před použitím přidat 1,2 ml formaldehydu

Fix/stop roztok

- 800 ml deionizované vody
- 88 ml ledové kyseliny octové

Hydroxid sodný, 1 mol/l roztok

- 40 g hydroxidu sodného
- doplnit deionizovanou vodou na 1 l

Kyselina dusičná, 1% roztok

- 12 ml 65% kyseliny dusičné
- 800 ml deionizované vody

Molekulární lepidlo

- 1 ml 0,5% kyseliny octové v 96% ethanolu
- 3 µl 3-methakryloxypropyltrimethoxysilanu

Nanášecí pufovací roztok pro elektroforézu

- 0,125 g xylenové modře
- 0,125 g bromfenolové modře
- 100 ml formamidu
- 25 ml deionizované vody

Peroxodisíran amonný, 10% roztok

- 1 g peroxodisíranu amonného
- rozpustit v 10 ml deionizované vody
- připravený roztok uchovávat v chladničce

Polyakrylamidový gel, 6% roztok

- 60 ml 6% zásobního roztoku akrylamidu
- 400 µl 10% roztoku peroxodisíranu amonného
- 40 µl N, N, N', N'-tetramethylethyldiaminu

Reakční pufr pro *Taq* DNA polymerázu, 10x

- 80 ml deionizované vody
- 1,211 g trishydroxymethylaminomethanu (Tris)
- upravit pH pomocí kyseliny chlorovodíkové na hodnotu 9
- 3,73 g chloridu draselného
- 1 ml Tritonu X-100
- po rozpuštění doplnit deionizovanou vodou na 100 ml
- sterilizovat autoklávováním

TBE pufr, 10x zásobní roztok

- 55 g kyseliny trihydrogenborité
- 108 g trishydroxymethylaminomethanu (Tris)
- 40 ml roztoku Na₂EDTA 0,5 mol/l, pH 8,0
- doplnit deionizovanou vodou na 1 l

Vývojka

- 24 g uhličitanu sodného
- 800 ml deionizované vody
- vychladit na teplotu nižší než 10 °C
- před použitím přidat 1,2 ml formaldehydu a 160 µl 1% roztoku thiosíranu sodného

4.8 Použité laboratorní přístroje

- Elektroforetický zdroj EV232 (Consort)
- Hybridizační pec HB-2D (Techne)
- Chladnička kombinovaná (Whirlpool)
- Laboratorní váhy Mark S622 (BEL Engineering)
- Magnetická míchačka MR Hei-Combi (Heidolph)

- Mikropipety Finnpiquette 0,5–10 µl (osmikanálová) a 0,3 µl–1 ml (Thermo-Labsystems)
- Mikropipety Nichipet EX 0,5 µl–1 ml (Nichiryo)
- Minicentrifuga CLE CSQSP (Cleaver Scientific)
- Minicentrifuga Prism mini (Labnet International)
- Spektrofotometr NanoDrop ND-1000 (Thermo Scientific)
- Negatoskop NEGA1 (Maneko)
- Sekvenační elektroforetická komůrka S2 (Whatman Biometra)
- Sušárna CAT 8050 (Contherm)
- Termocykler GenePro (BIOER Technology)
- Termocykler PTC 100-96 VHB (MJ Research)
- Termocykler TC XP (BIOER Technology)
- Třepačka Orbit 1 900 (Labnet International)
- Vortex mixer (Labnet International)
- Vortex MS2 (Ika)
- Výrobník deionizované a ultračisté vody typ 02 (AquaOsmotic)
- Výrobník ledu Icematic F100 Compact (Castel Mac)

5 Výsledky

V této diplomové práci jsem se zabývala analýzou a charakteristikou 50 *cross-species* mikrosatelitů, které jsem ve své bakalářské práci (Strejčková, 2016) při testování pomocí *cross-species* PCR amplifikace na DNA 6 nepříbuzných jedinců plameňáka karibského označila jako polymorfní. Z celkového počtu 50 testovaných mikrosatelitů u 30 nepříbuzných jedinců plameňáka karibského bylo 49 původně odvozeno od zástupců z řádu trubkonosí, a to 9 od zástupců z čeledi albatrosovití, 27 od zástupců z čeledi buňňákovití a zbylých 13 od druhů z čeledi buňňáčkovití. U jednoho testovaného mikrosatelitu se jednalo o *cross-species* mikrosatelit polymorfní u buňňáka taiko, původně odvozený od racka novozélandského (*Laurus novaehollandiae scopulinus*) z řádu dlouhokřídlí (Charadriiformes).

Při *cross-species* PCR amplifikaci jsem jako výchozí teplotu *annealingu* (T_a) použila finální T_a uvedenou u jednotlivých mikrosatelitů v mé bakalářské práci (Strejčková, 2016). V několika případech bylo potřeba podmínky PCR reakce dále optimalizovat a finální T_a upravit podle potřeby tak, aby byla možná genotypizace PCR produktu po elektroforetické separaci v 6% polyakrylamidovém gelu. Nejnižší T_a činila 44 °C a nejvyšší pak 71 °C. Ve své bakalářské práci jsem navíc u dvou mikrosatelitů (Ole13 a Omn8) optimalizovala podmínky PCR reakce snížením koncentrace hořečnatých iontů v PCR reakční směsi (respektive $MgCl_2$) z 1,6 nmol/l na 1,2 nmol/l, což jsem v diplomové práci zachovala. Posledním krokem optimalizace umožňujícím zřetelné rozlišení jednotlivých alel separovaného PCR produktu bylo v případě nutnosti prodloužení doby elektroforetické separace, přičemž nejkratší elektroforetické dělení probíhalo 90 a nejdelší 300 minut.

Všech 50 testovaných mikrosatelitů poskytlo při *cross-species* PCR amplifikaci s DNA 30 nepříbuzných jedinců plameňáka karibského produkt, avšak pouze u 45 mikrosatelitových lokusů jsem získaný produkt označila za polymorfní. U těchto 45 mikrosatelitů, jejichž přehled uvádím v tabulce č. 5, jsem detekovala u 30 nepříbuzných jedinců od 2 do 11 alel. U 5 mikrosatelitů, které u 30 jedinců poskytly monomorfni produkt, jsem revidovala výsledky z mé bakalářské práce (Strejčková, 2016), kde byly tyto lokusy na 6 jedincích chybně označené za polymorfní, což mohlo být způsobeno například výskytem artefaktů po separaci a vizualizaci PCR produktů v gelech, které ztížily hodnocení.

Tabulka č. 5: Charakteristika 45 polymorfních mikrosatelitů testovaných na 30 nepříbuzných jedincích plameňáka karibského. Ve sloupcích tabulky je uveden název mikrosatelitního lokusu včetně kódu v databázi GenBank (Accession no. – Accession number), sekvence primerů ve směru 5'→3', jednotka repetice, zdrojový druh, teplota annealingu (T_a), čas elektroforetické separace (ELFO), počet alel, odhadovaný výskyt nulových alel a soulad s Hardy-Weinbergovou rovnováhou (HW) (NS – v souladu, ND – netestováno, ** – signifikantní odchylka na hladině 1 %, *** – signifikantní odchylka na hladině 0,1 %).

Název lokusu (GenBank Accession no.)	Sekvence primerů (5'→3')	Jednotka repetice	Zdrojový druh	T _a [°C]	ELFO [min]	Počet alel; HW	Nulové alely
De3 (AF096789)	F: CTGCCAAAAAGAATTCCTG R: CCAACAAGGACTAAGCCCAA	AC	albatros stěhovavý	65	130	4; NS	0,12
Dc5 (AF096790)	F: AGGAGGGAACTTCTCCAG R: AGCAGGGAGTGACTTGAGGAG	AC/CAC	albatros šedohlavý	66	90	2; NS	0,02
Dc22 (AF096803)	F: AGTGGGATGGGTGTATCAGG R: TGGACTAGAGGCCTTGTCTGA	CA		60	90	3; ND	–
Dc31 (AF096810)	F: CTGACTCTCTGGGATGAGCC R: GTACCCCTGGAAAGCCAGAC	CA/GC/AG		63	90	4; ***	0,44
BFAL4 (neuvedeno)	F: TGGGTCAGTTTACCTCTCAGC R: GTTTGCCATTTTAAACTGTCATTGGC	TC	albatros černonohý	64	150	2; NS	–
BFAL14 (neuvedeno)	F: CAAGAAGCTATTATTAAGCTATTTGTTCC R: GGGTGTGAAATCGTTTCTGC	ATTT		64	90	4; NS	–
LAAL7 (neuvedeno)	F: CAGCATGACCAAATCCATCC R: GTTTGGACACAAATGCCGTTCTTG	AGC	albatros laysanský	63	120	6; NS	–
LAAL19 (neuvedeno)	F: ATGACCAGTGCCATCAACAG R: TGGCCAGATGTGATTTGAAG	ATCC		62	90	6; NS	–
Parm01 (EU360817)	F: CTGGACTCAGTGCCCTCTTC R: CAGGGCAGAAGCTCGTCTAT	CA	buřňák trinidadský	68	180	7; NS	–
Ptero05 (HQ918222)	F: TGCTGTCTGGCTGGGTTAC R: CTGCCTGCCTTCCTGAAAC	AAG/AGG	buřňák havajský	68	90	2; NS	0,05

Tabulka č. 5: Pokračování 1.

Název lokusu (GenBank Accession no.)	Sekvence primerů (5' → 3')	Jednotka repetice	Zdrojový druh	T _a [°C]	ELFO [min]	Počet alel; HW	Nulové alely
Bb11 (HM171894)	F: CTGGCATCAGTCCCTTACCT R: GCTCTTACGAATCCGCTACC	GA	buňák Bulwerův	67	90	5; NS	0,16
Bb22 (HM171898)	F: TTCACAGCAGAATCACCTCAG R: GCTCAAAGGGTGGAATTGTT	TG		65	90	2; NS	–
Bb25 (HM171901)	F: GCATCCCTGGAACCTCTGATT R: GAATGAACCAGCCAGAAGGT	AC		60	90	3; NS	–
Paequ3 (AY371071)	F: TGTGGGTGCAGTAGAGCA R: CAATAAGAAGATCAGCAGAACAGAC	GA	buňák bělobradý	65	90	3; NS	–
Paequ7 (AY371073)	F: TGCAGACCTGACTTTCACAGCTC R: CCTCCAAACATCCAGCCATC	GT		68	240	3; NS	–
Paequ8 (AY371074)	F: TATTCTGAGACTTGCGTTATCC R: GTGATCCATTAGTTGATGTCTACTG	CA		62	180	3; ND	0,13
Cd5 (EU029087)	F: CTGCACAGACTGAGAGTATAAGATTC R: GGCTTAAAGGGTAAATACACATGG	GT/AT	buňák šedý	50	90	2; ND	–
Puff G2F (EU158899)	F: GCTCTCCCAGTTTGCACG R: TCCCATGCTTTAACCCTG	GT	buňák baleárský	58	180	3; NS	–
Pc A107 (JX435472)	F: AAAGCCAGTAGGTGTATTCAAC R: AAGTGGGAGGAAAGAGTG TAG	GT	buňák světlonohý	50	90	2; ND	–
Pc B109 (JX435475)	F: CTCAGAGCGATCACACTGTACT R: AAAGCATT CAGGATGTAGGTTC	CAA		65	180	4; NS	0,07
Pc D103 (JX435479)	F: GGAAAGATGTCATGCTGATGA R: GTGGGAGATTCATAGGCAAAG	GATA/ GATG		58	90	3; NS	0,01
Patbel1 (JF288775)	F: CCCTTGCTGCAGCTCATTAT R: GGAATGGCTGAAAGAGTGCT	CTAT/ CTAC	buňák útlozobý	49	90	4; NS	0,22
Patbel4 (JF288778)	F: TCGTCCATGTTAGAAGGCATC R: TGTGCCACGAGTTCTTTGTG	CTAT		50	90	2; NS	0,23

Tabulka č. 5: Pokračování 2.

Název lokusu (GenBank Accession no.)	Sekvence primerů (5' → 3')	Jednotka repetice	Zdrojový druh	T _a [°C]	ELFO [min]	Počet alel; HW	Nulové alely
Pacbel_00386 (neuvedeno)	F: GCATGTCTACAAACAAGCACG R: TCACTGGAAACCAGAGTAGGC	AC	buňák útlozobý	50	90	5; NS	–
Pacbel_03731 (neuvedeno)	F: TAGTGGACTGGTCACAGCAC R: TAGCAGCTGGAGAGCATCAG	AC		62	90	2; ***	0,85
Pacbel_07265 (neuvedeno)	F: CGTCACTTTAATAGCGCTGGC R: ACCCTGATTTTCCCAGTCCG	GT		62	120	3; ND	0,01
Pacbel_08509 (neuvedeno)	F: TCTGGTTTCACAAATACCTACTGC R: CCTAGTTTCGACACAAAGG	TG		60	90	2; ND	–
Pacbel_08988 (neuvedeno)	F: CTGATCGGTTGTGCTCTGTG R: GCGGAAAGATCCTAACAAG	CT		69	90	3; NS	–
Pacbel_09021 (neuvedeno)	F: ATCTGCGCATGCAGTGATAG R: CACAGCTAGCAGCATTGACC	GT		68	90	3; ND	0,13
Pacbel_09528 (neuvedeno)	F: AACTGTTTGCTCCACACCAC R: ATGGCTTGGAAGTCTCCCTG	AC		60	90	3; NS	0,13
Pacbel_10033 (neuvedeno)	F: CAACGCGCTTTTGGTTTTGC R: GGCCACTCACCACAATACAAG	TG		61	90	2; NS	–
Pacbel_17944* (neuvedeno)	F: TACAACCGTTCTCCCTGTGG R: GGAGAAGCAGGCAGCAATAC	TG		46	180	4; NS	0,08
Oc28B (FJ238097)	F: GCGTTGACCAGCAAATAGTC R: GGAAGGCTACCACAATTTCA	TG	buňáček madeirský	57	90	3; NS	–
Oc49 (FJ238098)	F: TGCTTCTGGATTTGTTTTGC R: CAAACCGTGTGACCCAGATA	CA		59	120	3; NS	–
Oc79 (FJ238102)	F: TATTCCTGGCCATGTTTTCC R: GCTTCCTTTGTTTCAGTTTAGA	AC		61	120	2; ND	0,16
Oc87B (FJ238104)	F: TTTAAGGAACGCAAGTCAGG R: GTGATTCTTGCAGTGGCTTT	GA		64	150	2; **	0,66

Tabulka č. 5: Pokračování 3.

Název lokusu (GenBank Accession no.)	Sekvence primerů (5'→3')	Jednotka repetice	Zdrojový druh	T _a [°C]	ELFO [min]	Počet alel; HW	Nulové alely
Omn1 (JQ303226)	F: TTTTGTGTTTGGATTCTCACATTCTT R: TGGGAGTGACCTGCTTACCT	AC/TG	buřňáček Monteirův	53	90	5; NS	0,02
Omn3 (JQ303228)	F: GCGCTTGAAAGGGTGAAGTA R: TCCCATCTGAGATTTAAGGAAGA	AC/GT		61	120	2; NS	0,27
Omn8* (JQ303232)	F: TGCAACCTTAGCATTACCTAGC R: GGGGCGAGCATTACATTAAG	AC		44	90	7; NS	0,08
Omn21 (JQ303238)	F: TTTTAGCTCTTTTAGCTAGCCTT R: TAACCCAGAAAAATGCAGCC	GTT		51	90	3; NS	–
Ol10-39 (FJ238106)	F: TTAAGAACAGAGCCTGACTTG R: ACAAATCTCATGTCCTTGG	GT	buřňáček dlouhokřídý	56	90	3; ND	0,28
Ole02 (FR696378)	F: GGGTTCCTGTTACCAAAGGGCAG R: CATAAGCACAAAGGTTCTAGCTCCCTC	GAAA		70	300	11; NS	–
Ole09 (FR696385)	F: GGCCTGGATTCTGCGTGTTGGG R: CAGCTACAGGCCACGGGTGC	CA		72	120	5; NS	–
Ole13* (FR696389)	F: GGGCCAGACATGTATTTACTGGAGGG R: GTGCATCCGAGAGCCGACGC	TG		51	220	5; NS	–
RBG29 (AY091853)	F: CCTAGCTTTTGGACTCAGT R: GTGGTGTGCAATAGGATTC	GT	racek novozélandský	62	150	7; NS	–

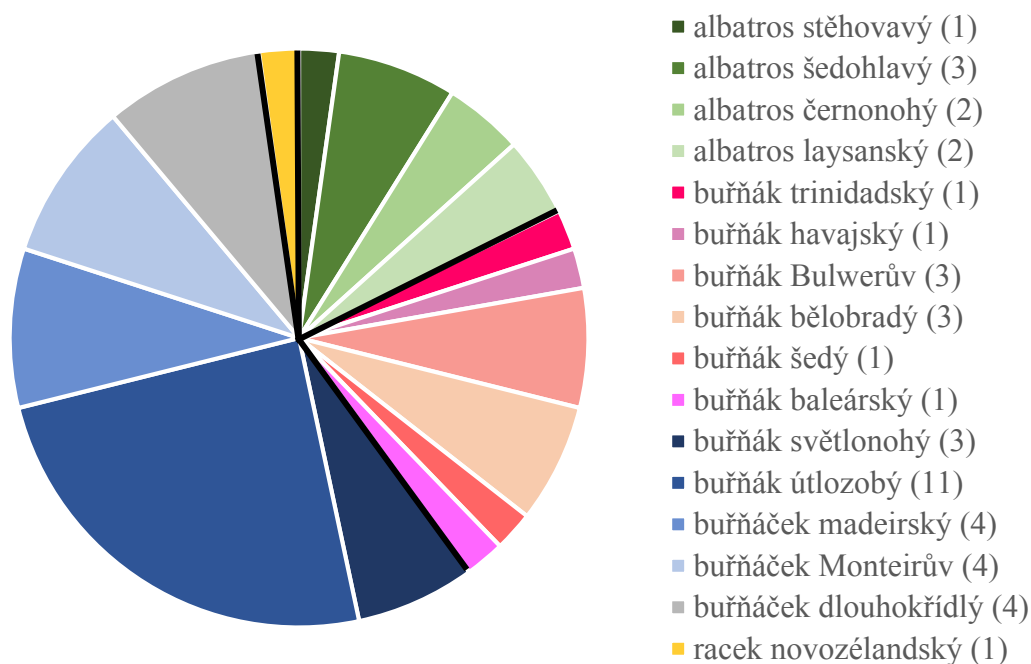
Legenda: * – tříčtvrteční koncentrace hořečnatých iontů, respektive MgCl₂, v PCR reakční směsi (1,2 nmol/l) oproti standardní koncentraci (1,6 nmol/l).

Mezi pět vyloučených testovaných mikrosatelitů patřil lokus STAL18, izolovaný od albatrosa bělohřbetého z čeledi albatrosovití (Hernandez *et al.*, 2014), dále Bb21 od buřňáka Bulwerova (Andris *et al.*, 2010), PcA105 a PcB115 od buřňáka světlonohého z čeledi buřňákovití (Hardesty *et al.*, 2013) a Oc63 od buřňáčka madeirského z čeledi buřňáčkovití (Sun *et al.*, 2009). U všech těchto mikrosatelitů, s výjimkou PcB115, jsem v rámci své bakalářské práce (Strejčková, 2016) detekovala dvě alely, u lokusu PcB115 pak tři. Po provedení *cross-species* PCR amplifikace těchto lokusů s DNA 30 nepříbuzných jedinců plameňáka karibského jsem však získala monomorfní produkty.

Z 207 párů primerů, které byly navrženy pro amplifikaci mikrosatelitových lokusů u zástupců z řádu trubkonosí, amplifikuje u plameňáka karibského 44 z nich polymorfní lokus. Celková úspěšnost *cross-species* PCR amplifikace lokusů izolovaných od druhů z řádu trubkonosí u plameňáka karibského z řádu plameňáci je 21,3 %. Co se týče úspěšnosti v rámci jednotlivých čeledí řádu trubkonosí, z čeledi albatrosovití, z níž bylo doposud otestováno 53 mikrosatelitů, bylo u plameňáka karibského úspěšně amplifikováno 8 polymorfních lokusů a úspěšnost činí 15,1 %. U mikrosatelitů původně izolovaných od zástupců z čeledi buřňákovití je úspěšnost *cross-species* PCR amplifikace rovna 24,0 %, přičemž ze 100 mikrosatelitů bylo u plameňáka karibského polymorfních 24 lokusů. U mikrosatelitových lokusů z čeledi buřňáčkovití činí úspěšnost *cross-species* PCR amplifikace 24,1 %, kdy z 54 lokusů bylo u plameňáka karibského 13 polymorfních. Nejvíce polymorfních *cross-species* mikrosatelitů pro plameňáka karibského jsem získala amplifikací lokusů od buřňáka útlozobého, a to celkem 11.

Dalším, čtyřicátým pátým nalezeným polymorfním lokusem pro plameňáka karibského byl lokus RBG29, který jako jediný z 50 testovaných nepocházel od zástupce z řádu trubkonosí, nýbrž se jednalo o *cross-species* mikrosatelit polymorfní u buřňáka taiko z řádu trubkonosí a čeledi buřňákovití, původně odvozený od racka novozélandského z řádu dlouhokřídlí. Rozdělení *cross-species* mikrosatelitů polymorfních u 30 nepříbuzných jedinců plameňáka karibského z hlediska řádů, čeledí a druhů, u kterých byly lokusy izolovány, je znázorněno v grafu č. 1.

Graf č. 1: Rozdělení 45 polymorfních mikrosatelitů u plameňáka karibského podle zdrojových druhů, čeledí a řádů, u kterých byly původně izolovány. V závorce je uveden počet lokusů odvozených od zástupců jednotlivých druhů z čeledi albatrosovití (zelená), buřňákovití (růžová) a buřňáčkovití (modrá) z řádu trubkonosí a od zástupce z čeledi rackovití (žlutá) z řádu dlouhokřídli, které byly polymorfní u 30 nepříbuzných jedinců plameňáka karibského. Jednotlivé čeledi jsou od sebe odděleny černými čarami.



Pomocí programu Genepop 4.1 (Rousset, 2008) bylo vyhodnoceno, zda některé mikrosatelity nejsou ve vazbě. Mezi lokusy Parm01 od buřňáčka trinidadského a RBG29 od racka novozélandského byla zjištěna 100% vazba. Programem BLASTN 2.8.0 (Altschul *et al.*, 1997) byly poté sekvence lokusů Parm01 (EU360817) (Brown *et al.*, 2009) a RBG29 (AY091853) (Given *et al.*, 2002) srovnány a bylo zjištěno, že se jedná o téměř totožné sekvence, které se liší pouze v několika inzercích, delecích a bodových mutacích (viz obrázek č.3). Sekvence Parm01 a RBG29 jsou v obrázku č. 3 srovnány po celé délce kratšího lokusu Parm01, který má 204 bazí. V rámci tohoto srovnání se vyskytuje celkem 17 bodových mutací. Celá sekvence Parm01 (204 bazí) odpovídá 213 bazím u RBG29, jelikož v jednom místě je v sekvenci RBG29 navíc 8 nukleotidová inserce a v jiném je pak navíc vložen jeden nukleotid. Primer Parm01F se v porovnání s odpovídající sekvencí RBG29 liší třemi bodovými mutacemi, primer Parm01R jednou

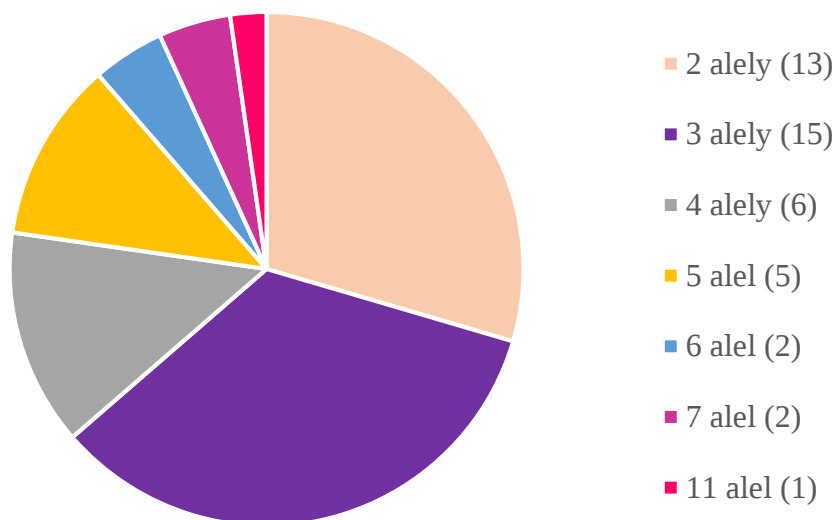
Parm01	1	*****CAGGGCAGAAGCTCGTCTATCTATTTTCTC	30
RBG29	331	CGTGACGTCATTGACATAAGGTCCTTCGAGTACACAGATAAAAGAG	282
Parm01	31	TAGATGTGAACTCTTCAACTACTAGGATGTGTACTTTGACTTTTTTATTGC	80
		●● ● ● ●	
RBG29	281	ATCTACACTTGGAAGTCGATGATCCTACACATAAACTGAAAAATAATG	232
Parm01	81	AATGTGGTGTGTGTAATAGGATTCCTCCTTCTCCAGGGAGGCTTTTATATA	130
		● ● ● ●	
RBG29	231	TTGCACCACAACGTTATCCTAAGAAGGAAGAGGTCCCTCCGAAATATGT	182
Parm01	131	TACGTATGTTTACACACACACACACACACACACACA*****ATGG	172
		● ●	
RBG29	181	ATGCATACGAATATGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTAATTTTACC	132
Parm01	173	TTTTGTTATGGG*GAAGAGGGCACTGAGTCCAG*****	204
		●●	
RBG29	131	AAAACGACACCCCTTCTCCCGTGAAGTCCGTTTTCGATCCAAAATATA	82
Parm01		*****	
RBG29	81	TAAAATAAGTATTTTGTCTAAACGTTGTTAAATAATTTTGGACTAGAGT	32
Parm01		*****	
RBG29	31	ACGTCATATTC CAATATGTTCTTTAACGATC	1

Legenda: | – shoda, * – mezera, ● – bodová mutace, ● – bodová mutace v sekvenci primeru

Přesto, že 45 lokusů amplifikovalo u plameňáka karibského polymorfní produkt, získala jsem ve skutečnosti pouze 44 nezávislých markerů. Jelikož lokus Parm01 byl na rozdíl od lokusu RBG29, který má odlišně navržené primery, špatně hodnotitelný, byl z dalších statistických analýz vyloučen a ponechán byl pouze lokus RBG29 od racka novozélandského.

U 44 polymorfních vzájemně nezávislých lokusů jsem na souboru 30 nepříbuzných jedinců detekovala od 2 do 11 alel, přičemž 2 alely se vyskytovaly u 13 lokusů a 11 alel jsem detekovala pouze u lokusu Ole02. Nejčastěji jsem u polymorfních lokusů detekovala 3 alely, a to v 15 případech. Dále jsem našla 4 alely u 6 lokusů, 5 alel u 5 lokusů, 6 alel u 2 lokusů a 7 alel taktéž u 2 lokusů. Rozdělení 44 vzájemně nezávislých polymorfních lokusů podle počtu alel u 30 nepříbuzných jedinců plameňáka karibského je znázorněno v grafu č. 2.

Graf č. 2: Rozdělení 44 polymorfních vzájemně nezávislých mikrosatelitů odvozených od zástupců z řádu trubkonosí a dlouhokřídli podle počtu alel, které pro jednotlivé lokusy byly detekovány u 30 nepříbuzných jedinců plameňáka karibského. Počet mikrosatelitů s příslušným počtem alel je uveden v závorce.



Pomocí programu Cervus 3.0.6 (Kalinowski *et al.*, 2007) jsem provedla statistickou analýzu všech 44 vzájemně nezávislých polymorfních *cross-species* lokusů, které jsem až na jediný případ (Bb11, 29 jedinců) vygenotypovala na souboru 30 nepříbuzných jedinců plameňáka karibského. Statistická charakteristika jednotlivých mikrosatelitových

lokusů je uvedena v příloze č. 1. Průměrný počet alel na lokus se rovnal 3,568 a očekávaná heterozygotnost lokusů činila 0,4795. Pravděpodobnost chybného provedení paternitní studie s těmito 44 získanými *cross-species* mikrosatelity v případě, že je přiřazováno mládě, u něhož není známý ani jeden z rodičů je $7,6458 \cdot 10^{-4}$, v případě, že je známý pouze jeden rodič je pravděpodobnost chybného přiřazení druhého rodiče $5,4000 \cdot 10^{-7}$ a pravděpodobnost chybného přiřazení celého rodičovského páru k mláděti je $2,0890 \cdot 10^{-11}$. Pravděpodobnost, že by dva jedinci nesli pro všech 44 lokusů stejnou alelovou sestavu je $2,4600 \cdot 10^{-23}$ a pravděpodobnost, že by se našla dvě mláďata, která by byla identická pro všech 44 mikrosatelitových lokusů je $7,9400 \cdot 10^{-11}$.

Jak už jsem zmínila výše, lokus Bb11 s 5 detekovanými alelami, původně izolovaný u buňáka Bulwerova, bylo možné vygenotypovat pouze u 29 jedinců z 30. U jednoho jedince se i po několikanásobných pokusech o optimalizaci PCR podmínek a opakování PCR reakce s primery amplifikujícími tento lokus, nepodařilo po elektroforetické separaci detekovat alely. Možné vysvětlení je, že tento jedinec je pro lokus Bb11 homozygot pro nulovou alelu. Podle statistických dat získaných programem Cervus 3.0.6 pro tento lokus sice nebyla pozorována žádná signifikantní odchylka od Hardy-Weinbergovy rovnováhy, ale pravděpodobnost výskytu nulové alely je 0,1596.

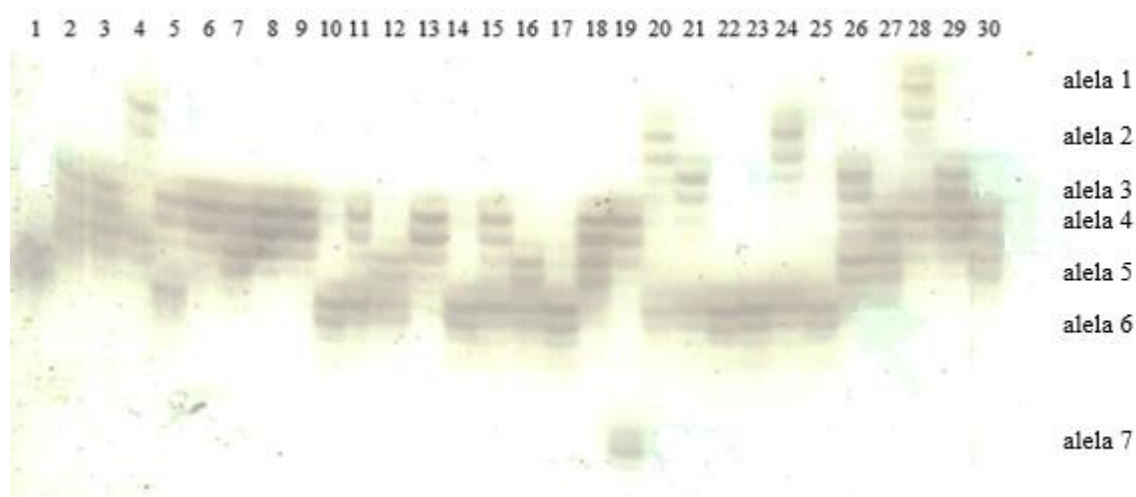
U tří lokusů byly zjištěné výrazné odchylky od Hardy-Weinbergovy rovnováhy a vysoká pravděpodobnost výskytu nulových alel. U lokusu Dc31 odvozeného od albatrosa šedohlavého, u kterého jsem u 30 nepříbuzných jedinců detekovala 4 alely, je pravděpodobnost výskytu nulové alely 44,34 %. U lokusu Oc87B původně izolovaného u buňáčka Madeirského 65,87 % a u lokusu Pacbel_03731 od buňáka útlozobého dokonce 84,69 % (viz tabulka č. 5), přičemž pro oba lokusy jsem u 30 nepříbuzných jedinců plameňáka karibského detekovala pouze 2 alely.

Velmi nízká či žádná pravděpodobnost výskytu nulových alel byla stanovena u 26 testovaných lokusů, přičemž 21 z nich bylo zároveň v souladu s Hardy-Weinbergovou rovnováhou a u 5 zbývajících lokusů nebylo výpočet odchylky od Hardy-Weinbergovy rovnováhy možno provést.

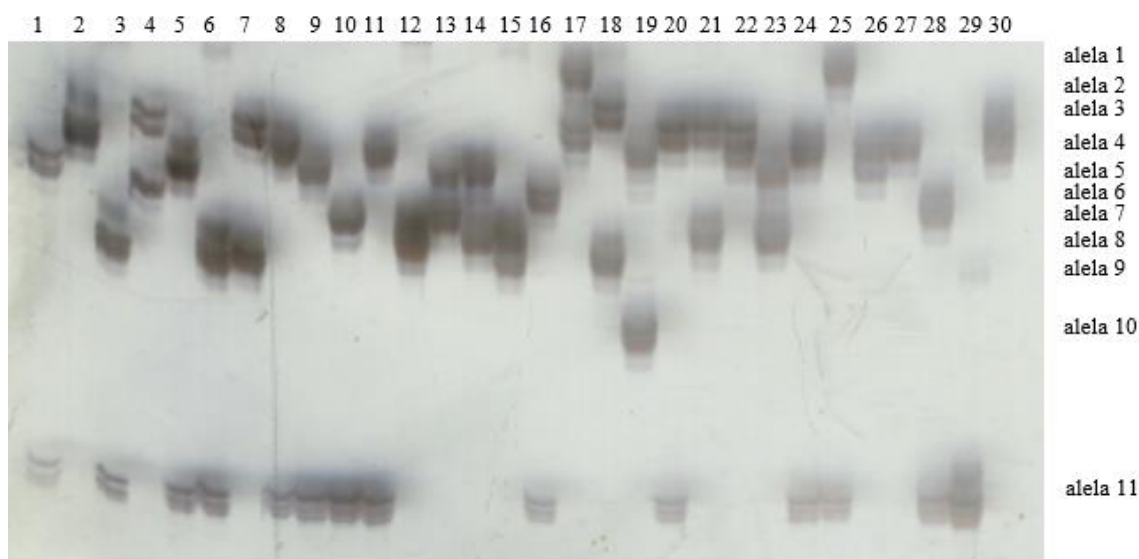
U všech 44 polymorfních vzájemně nezávislých mikrosatelitů jsem se také zaměřila na to, zda nejsou vázané na pohlaví, a to konkrétně na chromozom Z. U ptáků nesou samci dvě kopie chromozomu Z (ZZ) a samice pak dva různé chromozomy – Z a W. Z tohoto důvodu samice u mikrosatelitů vázaných na chromozom Z nikdy nevykazují heterozygotní konstituci. Testovaná DNA pocházela od 13 samic a 17 samců plameňáka karibského. Prvním ze dvou lokusů, které by mohly být potenciálně vázané na

chromozom Z, je lokus Oc87B izolovaný od buňňáčka madeirského, který byl u všech 13 samic vyhodnocený jako homozygotní. Tento lokus, u kterého jsem detekovala pouze dvě alely, vykazoval nízkou heterozygotnost (0,100) a signifikantní odchylku od Hardy-Weinbergovy rovnováhy na hladině 1 %. Také u něj byla zjištěna vysoká pravděpodobnost výskytu nulové alely, a to 65,87 %. Druhým mikrosatelitem potencionálně vázaným na chromozom Z je Pacbel_03731 odvozený od buňňáka útlozobého, u kterého jsem detekovala taktéž pouze dvě alely a všech 13 samic pro něj vykazovalo homozygotní konstituci. Programem Cervus 3.0.6 (Kalinowski *et al.*, 2007) byla pro tento lokus zjištěna velmi nízká heterozygotnost (0,033), signifikantní odchylka od Hardy-Weinbergovy rovnováhy na hladině 0,1 % a vysoká frekvence výskytu nulových alel (84,69 %).

Praktické využití mikrosatelitů ovlivňují nejen jejich statistické charakteristiky, ale i to, jak dobře jsou separované lokusy hodnotitelné. Na následujících obrázcích lze vidět elektroforetogramy dvou vybraných dobře hodnotitelných polymorfních mikrosatelitových lokusů. Jedná se o lokus Omn8 (obrázek č. 4) původně izolovaný u buňňáčka Monteirova, u kterého jsem po *cross-species* PCR amplifikaci u 30 nepříbuzných jedinců detekovala 7 alel a lokus Ole02 (obrázek č. 5) odvozený od buňňáčka dlouhokřídleho, který byl u 30 nepříbuzných jedinců plameňáka karibského polymorfní s 11 alelami.



Obrázek č. 4: Elektroforetogram mikrosatelitového lokusu Omn8 izolovaného u buňňáčka Monteirova amplifikovaného při T_a 44 °C u 30 nepříbuzných jedinců plameňáka karibského, u kterého bylo detekováno 7 alel. Čas elektrofretické separace byl 90 min. Dráhy 1–30 představují jednotlivé jedince.



Obrázek č. 5: Elektroforetogram mikrosatelitového lokusu Ole02 izolovaného u buňáčka dlouhokřídlého amplifikovaného při T_a 70 °C u 30 nepříbuzných jedinců plameňáka karibského, u kterého bylo detekováno 11 alel. Čas elektroforetické separace byl 300 min. Dráhy 1–30 představují jednotlivé jedince.

Některé mikrosatelity s větším počtem alel (např. Ole13 od buňáčka dlouhokřídlého s 5 alelami a Parm01 od buňáka trinidadského se 7 alelami) byly velice problematicky hodnotitelné i po několika pokusech o optimalizaci PCR podmínek, a proto bych je nedoporučovala například pro studium paternity, kde by mohly poskytnout zavádějící výsledky.

6 Diskuze

V této práci jsem u 30 nepříbuzných jedinců plameňáka karibského pomocí *cross-species* PCR amplifikace analyzovala 50 mikrosatelitových lokusů, které jsem v rámci své bakalářské práce (Strejčková, 2016) označila za polymorfní u 6 nepříbuzných jedinců plameňáka karibského. Ke *cross-species* PCR amplifikaci jsem využila primery, které amplifikují převážně polymorfní produkty u zástupců z řádu trubkonosí, z nichž u 49 se jedná o *de novo* izolované mikrosatelity od zástupců z řádu trubkonosí a u jednoho o *cross-species* mikrosatelit polymorfní u buňáka taiko z řádu trubkonosí, jenž byl původně izolován u racka novozélandského z řádu dlouhokřídlí. Po genotypizaci těchto lokusů na vyšším počtu jedinců než v bakalářské práci (Strejčková, 2016), jsem polymorfismus potvrdila u 45 mikrosatelitových lokusů, z toho 44 bylo odvozených od zástupců z řádu trubkonosí a 1 mikrosatelit pocházel od racka novozélandského z řádu dlouhokřídlí. Pomocí programu Genepop 4.1 (Rousset, 2008) jsem zjistila 100% vazbu mezi lokusy Parm01 od buňáka trinidadského a RBG29 od racka novozélandského a porovnáním jejich sekvencí jsem potvrdila, že se jedná o tentýž lokus lišící se 17 bodovými mutacemi a dále dvěma inzercemi o celkové délce 9 nt v sekvenci RBG29 (viz obrázek č. 3). Lokus Parm01 jsem pro jeho špatnou hodnotitelnost vyloučila a pro další analýzy ponechala pouze lokus RBG29. Celkem jsem tedy pro plameňáka karibského získala 44 vzájemně nezávislých *cross-species* mikrosatelitů.

Pro zástupce z čeledi albatrosovití bylo doposud otestováno 53 mikrosatelitů. Z nich bylo u plameňáka karibského 8 polymorfních. Jednalo se o jeden lokus (De3) izolovaný od albatrosa stěhovavého (*Diomedea exulans*), tři lokusy (Dc5, Dc22 a Dc31) od albatrosa šedohlavého (*D. chrysostoma*), a po dvou lokusech od albatrosa černonohého (*Phoebastria nigripes*) (BFAL4 a BFAL14) a laysanského (*P. immutabilis*) (LAA17 a LAAL19).

Burg (1999) izolovala celkem 26 mikrosatelitů, včetně lokusů De3, Dc5, Dc22 a Dc31, od albatrosa stěhovavého a šedohlavého. Při PCR, kterou použila k analýze získaných mikrosatelitů, byly použity dvě různé teploty *annealingu*. První, T_{a1} , pro prvních 7 cyklů a druhá, T_{a2} , pro zbylých 25 cyklů PCR. Analýzu získaných mikrosatelitů provedla na DNA izolované od 90 jedinců albatrosa stěhovavého a 50 jedinců albatrosa šedohlavého. Srovnání použitých T_a a počtů detekovaných alel, které zjistila Burg (1999) s mými výsledky uvádím v tabulce č. 6.

Tabulka č. 6: Porovnání mikrosatelitů polymorfních zároven u 30 nepříbuzných jedinců plameňáka karibského (tato práce) a u 90 jedinců albatrosa stěhovavého a 50 jedinců albatrosa šedohlavého (Burg, 1999) vzhledem k teplotám *annealingu* při PCR amplifikaci lokusů a počtu detekovaných alel.

Lokus	plameňák karibský (30)		albatros stěhovavý (90)		albatros šedohlavý (50)	
	T _a [°C]	počet alel	T _{a1} , T _{a2} [°C]	počet alel	T _{a1} , T _{a2} [°C]	počet alel
De3	65	4	50, 54	3	netestováno	
Dc5	66	2	netestováno		46, 48	4
Dc22	60	3	netestováno		48, 52	2
Dc31	63	4	netestováno		48, 52	M

Legenda: M – monomorfní

Hernandez *et al.* (2014) izolovali od albatrosa černonohého, laysanského a bělohřbetého celkem 15 mikrosatelitových lokusů, z nichž čtyři byly u plameňáka karibského polymorfní. Jednalo se o lokusy BFAL4, BFAL14, LAAL7 a LAAL19. Detekované počty alel a použité T_a v této práci a u Hernandez *et al.* (2014) porovnávám v tabulce č. 7.

Tabulka č. 7: Porovnání mikrosatelitů polymorfních zároven u 30 nepříbuzných jedinců plameňáka karibského (tato práce) a u 36 jedinců albatrosa černonohého a 12 jedinců albatrosa laysanského (Hernandez *et al.*, 2014) vzhledem k teplotám *annealingu* při PCR amplifikaci lokusů a počtu detekovaných alel.

Lokus	plameňák karibský (30)		albatros černonohý (36)		albatros laysanský (12)	
	T _a [°C]	počet alel	T _a [°C]	počet alel	T _a [°C]	počet alel
BFAL4	64	2	60	8	netestováno	
BFAL14	64	4	60	4	netestováno	
LAAL7	63	6	netestováno		60	4
LAAL19	62	6	netestováno		60	6

Z celkového počtu 100 párů primerů, které byly navrženy pro mikrosatelity zástupců z čeledi buňňákovití, 24 amplifikovalo u plameňáka karibského polymorfní produkt. Jako polymorfní *cross-species* mikrosatelity jsem označila Parm01 od buňňáka trinidadského (*Pterodroma arminjoniana*), Ptero05 od buňňáka havajského (*P. sandwichensis*), Cd5 od buňňáka šedého (*Calonectris diomedea*), Puff G2F od buňňáka baleárského (*Puffinus*

mauretanicus), Paequ3, Paequ7 a Paequ8 od buňáka bělobradého (*Procellaria aequinoctialis*), Bb11, Bb22 a Bb25 od buňáka Bulwerova (*Bulweria bulwerii*), Pc A107, Pc B109 a Pc D103 od buňáka světlonohého (*Puffinus carneipes*), Patbel1, Patbel4 a 9 lokusů Pacbel (viz tabulka č. 8) od buňáka útlozobého (*Pachyptila belcheri*).

Brown *et al.* (2009) našli u buňáka trinidadského 6 mikrosatelitových lokusů, z nichž pouze Parm01 při *cross-species* PCR amplifikaci u plameňáka karibského vykazoval polymorfismus. Autoři publikace u 320 jedinců buňáka trinidadského detekovali u tohoto lokusu 10 alel při T_a 55 °C, já u 30 jedinců plameňáka karibského při T_a 68 °C 7 alel. Mezi lokusy Parm01 a RBG29 od racka novozélandského jsem zjistila 100% vazbu a poté vzájemným porovnáním jejich sekvencí programem BLASTN 2.8.0 (Altschul *et al.*, 1997) potvrdila, že se jedná o totožné lokusy (viz obrázek č. 3). Lokus Parm01 byl také využit ke *cross-species* PCR amplifikaci u 10 jedinců buňáka hnědohlavého (*Pterodroma solandri*) z řádu trubkonosí, kde bylo detekováno 6 alel (Lombal *et al.*, 2015). Welch *et al.* (2011) modifikovali primery amplifikující lokus Parm01 tak, aby jej mohli použít ke studiu buňáka havajského. Lokus získaný PCR amplifikací s modifikovanými primery, který nazvali Parm01M, vykazuje podle programu BLASTN 2.8.0 (Altschul *et al.*, 1997) 91 % shodu se sekvencí mikrosatelitu RBG29.

Z 10 polymorfních mikrosatelitů, které Welch *et al.* (2011) popsali u buňáka havajského, vykazoval u plameňáka karibského polymorfismus pouze Ptero05, se dvěma alelami při teplotě *annealingu* 68 °C. Autoři lokus amplifikovali na DNA izolované od 40 jedinců buňáka havajského při T_a 53 °C a detekovali 3 alely.

Bried *et al.* (2008) izolovali u buňáka šedého 11 polymorfních mikrosatelitů, z nichž byl u plameňáka karibského při T_a 50 °C polymorfní lokus Cd5 se dvěma alelami. U 43 jedinců buňáka šedého detekovali autoři pro tento lokus při T_a 58 °C 6 alel.

Gonzales *et al.* (2009) popsali 10 polymorfních lokusů u buňáka baleárského, které genotypovali u 55 jedinců. U lokusu Puff G2F, který byl u plameňáka karibského polymorfní při T_a 58 °C se 3 alelami, detekovali při T_a 60 °C 2 alely.

Pro buňáka bělobradého popsali Techow *et al.* (2004) 6 nových polymorfních lokusů, z nichž Paequ3, Paequ7 a Paequ 8 vykazovaly polymorfismus také u plameňáka karibského. U všech tří lokusů jsem detekovala 3 alely, a to při T_a 65 °C, 68 °C a 62 °C. Autoři lokus Paequ3 genotypovali u 93 jedinců, kdy při T_a 55 °C zjistili 9 alel, lokus Paequ7 s 5 alelami u 94 jedinců při T_a 64 °C a lokus Paequ8 u 77 jedinců, kdy při T_a 58 °C detekovali 3 alely.

Andris *et al.* (2010) izolovali u buřňáka Bulwerova 11 mikrosatelitů a pro jejich PCR amplifikaci u 91 jedinců použili T_a 58 °C. U lokusu Bb11, který vykazoval vazbu na chromozom W, detekovali 3 alely, já jsem zaznamenala při T_a 67 °C u plameňáka karibského, u kterého je tento mikrosatelit lokalizován autozomálně, 5 alel. Pro lokus Bb22 jsem při T_a 65 °C stejně jako autoři našla 2 alely a pro Bb25 při T_a 60 °C 3 alely, přičemž autoři uvádějí 6 alel.

Hardesty *et al.* (2013) popsali u buřňáka světlonohého 11 polymorfních mikrosatelitů, jejichž variabilitu otestovali na souboru 84 jedinců. U plameňáka karibského amplifikovaly polymorfní lokus primery navržené pro mikrosatelity Pc A107 (T_a 50 °C, 2 alely), Pc B109 (T_a 65 °C, 4 alely) a Pc D103 (T_a 58 °C, 3 alely). Autoři detekovali u Pc A107 při T_a 55 °C 5 alel, u Pc B109 při T_a 57 °C 5 alel a u Pc D103 při T_a 59 °C 6 alel.

Moodley *et al.* (2015) izolovali u buřňáka útlozobého dalších 25 mikrosatelitů, které charakterizovali na souboru 77 jedinců. Devět z těchto lokusů bylo při *cross-species* PCR amplifikaci polymorfních také u plameňáka karibského. Použité teploty *annealingu* a detekované počty alel u těchto 9 polymorfních lokusů jsou pro oba druhy uvedené v tabulce č. 8.

Tabulka č. 8: Porovnání mikrosatelitů polymorfních zároveň u 30 nepříbuzných jedinců plameňáka karibského (tato práce) a u 77 jedinců buřňáka útlozobého (Moodley *et al.*, 2015) vzhledem k teplotám *annealingu* při PCR amplifikaci lokusů a počtu detekovaných alel.

Lokus	plameňák karibský (30)		buřňák útlozobý (77)
	T_a [°C]	počet alel	počet alel při T_a 56 °C
Pacbel_00386	50	5	11
Pacbel_03731	62	2	48
Pacbel_07265	62	3	15
Pacbel_08509	60	2	9
Pacbel_08988	69	3	10
Pacbel_09021	68	3	17
Pacbel_09528	60	3	9
Pacbel_10033	61	2	9
Pacbel_17944	46	4	12

Quillfeldt *et al.* (2012) u buřňáka útlozobého našli a charakterizovali 7 polymorfních mikrosatelitů u 68 jedinců. U lokusu Patbel1 detekovali 7 alel a u Patbel4 9 alel, přičemž teploty *annealingu* neuvádějí. Já u 30 nepříbuzných jedinců plameňáka karibského detekovala při T_a 49 °C 4 alely pro lokus Patbel1 a při T_a 50 °C 2 alely pro lokus Patbel4.

Z 54 známých mikrosatelitových lokusů pro čeleď buřňákovití bylo po provedení *cross-species* PCR amplifikace u plameňáka karibského 12 polymorfních. Jednalo se o 4 lokusy izolované u buřňáka madeirského (*Oceanodroma castro*) (Oc28B, Oc49, Oc79 a Oc87B), 4 od buřňáka Monteirova (*O. monteiroi*) (Omn1, Omn3, Omn8 a Omn21) a 4 od buřňáka dlouhokřídleho (*O. leucorhoa*) (Ol10-39, Ole02, Ole09 a Ole13).

Sun *et al.* (2009) našli 9 mikrosatelitových lokusů pro buřňáka madeirského a 1 pro dlouhokřídleho (Ol10-39). Všechny 10 lokusů otestovali na variabilitu u 27 jedinců buřňáka madeirského, 22 jedinců buřňáka Monteirova a 24 jedinců buřňáka dlouhokřídleho. U plameňáka karibského bylo při *cross-species* PCR amplifikaci polymorfních pět lokusů, z čehož byly čtyři původně izolované od buřňáka madeirského a jeden od dlouhokřídleho (viz tabulka č. 9).

Tabulka č. 9: Porovnání mikrosatelitů polymorfních zároveň u 30 nepříbuzných jedinců plameňáka karibského (tato práce) a u 27 jedinců buřňáka madeirského, 22 jedinců buřňáka Monteirova a 24 jedinců buřňáka dlouhokřídleho (Sun *et al.*, 2009) vzhledem k teplotám *annealingu* při PCR amplifikaci lokusů a počtu detekovaných alel.

Lokus	plameňák karibský (30)		buřňáček madeirský (27)	buřňáček dlouhokřídleý (24)	buřňáček Monteirův (22)
	T_a [°C]	počet alel	počet alel při T_a 50 °C	počet alel při T_a 50 °C	počet alel při T_a 50 °C
Oc28B	57	3	3	M	3
Oc49	59	3	M	3	3
Oc79	61	2	2	M	2
Oc87B	64	2	3	9	6
Ol10-39	56	3	8	3	8

Legenda: M – monomorfni

Bried *et al.* (2012) izolovali u buřňáka Monteirova 18 polymorfních mikrosatelitů, které charakterizovali na souboru 125 dospělých jedinců. Detekované počty alel a použité teploty *annealingu* při *cross-species* PCR amplifikaci čtyř polymorfních mikrosatelitů

u plameňáka karibského srovnávám s T_a a počty alel uvedených v publikaci v tabulce č. 10. U lokusu *Omn8* jsem při optimalizaci podmínek PCR kromě snížení T_a upravila také koncentraci hořečnatých iontů (respektive $MgCl_2$) v PCR reakční směsi, kterou jsem snížila z původní koncentrace (1,6 nmol/l) na třičtvrtěční hodnotu (1,2 nmol/l).

Tabulka č. 10: Porovnání mikrosatelitů polymorfních zároveň u 30 nepříbuzných jedinců plameňáka karibského (tato práce) a u 125 jedinců buňáčka Monteirova (Bried *et al.*, 2012) vzhledem k teplotám *annealingu* při PCR amplifikaci lokusů a počtu detekovaných alel.

Lokus	plameňák karibský (30)		buňáček Monteiřův (125)
	T_a [°C]	počet alel	počet alel při T_a 58 °C
Omn1	53	5	8
Omn3	61	2	6
Omn8	44	7	10
Omn21	51	3	6

Bicknell *et al.* (2011) izolovali 26 nových mikrosatelitů u buňáčka dlouhokřídleho a jejich variabilitu otestovali na souboru 24 jedinců. Pro lokus *Ole02*, u kterého jsem detekovala při teplotě *annealingu* 70 °C 11 alel, našli autoři při T_a 60 °C o jednu alelu méně. U lokusu *Ole09* jsem při T_a 72 °C detekovala 5 alel, autoři při T_a 60 °C pouze 2. pro lokus *Ole13* jsem optimalizovala podmínky PCR reakce snížením T_a na 51 °C a dále změnou koncentrace hořečnatých iontů (respektive $MgCl_2$) v PCR reakční směsi na třičtvrtěční (1,2 nmol/l). Při takto upravených podmínkách jsem detekovala 3 alely, v čemž se shodují s autory, kteří však pro PCR amplifikaci použili T_a 60 °C.

Jediný testovaný lokus z řádu dlouhokřídli (RBG29) izolovaný od racka novozélandského (*Larus novaehollandiae scopulinus*) (Given *et al.*, 2002) vykazoval u 30 nepříbuzných jedinců plameňáka karibského polymorfismus. Při T_a 62 °C jsem našla 6 alel. Given *et al.* (2002) detekovali u 260 jedinců racka novozélandského při teplotě *annealingu* 50 °C 5 alel, stejně jako Lawrence (2008) při *cross-species* PCR amplifikaci u 143 jedinců buňáka taiko z řádu trubkonosí při T_a 55 °C. Welch *et al.* (2011) při *cross-species* PCR amplifikaci mikrosatelitu RBG29 u 40 jedinců buňáka havajského z řádu trubkonosí zaznamenali 14 alel a Lombal *et al.* (2015) našli pro tento lokus u 10 jedinců buňáka hnědohlavého 5 alel. Given *et al.* (2002) dále RBG29 použili pro *cross-species* PCR amplifikaci u tří poddruhů racka novozélandského, šesti dalších

druhů z čeledi rackovití (Laridae) a u tenkozobce hnědohlavého (*Recurvirostra novaehollandia*) z čeledi tenkozobcovití (Recurvirostridae) taktéž z řádu dlouhokřídlí. Ve všech případech, až na *cross-species* PCR amplifikaci u tenkozobce hnědohlavého, získali polymorfní produkt se 4–7 alelami u 8–83 jedinců.

Jak již bylo zmíněno výše, mezi lokusem RBG29 a Parm01, které měly oba 7 alel a podobné genotypy, jsem zjistila za pomoci programu Genepop 4.1 (Rousset, 2008) 100% vazbu a následně jsem totožnost lokusů potvrdila srovnáním jejich sekvencí programem BLASTN 2.8.0 (Altschul *et al.*, 1997). Pro další analýzy u plameňáka karibského jsem vybrala lokus RBG29, který byl lépe hodnotitelný. Lombal *et al.* (2015), kteří oba mikrosatelity hodnotili u 10 jedinců buřňáka hnědohlavého a našli pro Parm01 6 alel a pro RBG29 5 alel, vazbu mezi lokusy však nezjišťovali.

Obručová (2009) ve své bakalářské práci při *cross-species* PCR amplifikaci mikrosatelitů u čápa bílého (*Ciconia ciconia*) dokonce našla hned dva takové případy, kdy na základě podobnosti výsledného profilu elektroforetické separace dvou publikovaných lokusů a následného porovnání jejich sekvencí stanovila, že se jedná o identické lokusy. Prvním případem byly mikrosatelity Eru07 a Eru09 odvozené od ibise rudého (*Eudocimus ruber*) (Santos *et al.*, 2006) a druhým lokusy WSμ 17 a WSμ 18 izolované u nesyta lesního (*Mycteria americana*) (Tomasulo-Seccomandi *et al.*, 2003). Totožnost dvou různých publikovaných mikrosatelitů Sh2Ca22 a Sh2Ca55 izolovaných od tučňáka Humboldtova (*Spheniscus humboldti*) (Schlosser *et al.*, 2003, 2009) zjistila stejným způsobem také Pechová (2014) ve své bakalářské práci při *cross-species* PCR amplifikaci mikrosatelitů u nesyta indomalajského (*Mycteria leucocephala*). Drobek (2010) ve své diplomové práci zase zjistil, že lokusy Pruμ7–Pruμ12 *de novo* nalezené pro plameňáka karibského (Preston, 2005) jsou ve skutečnosti jeden a ten samý lokus pouze s odlišně navrženými primery. U lokusů Pruμ7–Pruμ9 při PCR amplifikaci u 30 nepříbuzných jedinců plameňáka karibského zjistil téměř stejnou alelickou sestavu a následně pomocí programu Genepop 4.0 (Rousset, 2008) potvrdil jejich totožnost. Jejich identitu s dalšími třemi lokusy Pruμ10–Pruμ12 prokázal pomocí bioinformatické analýzy.

Primery navržené pro amplifikaci mikrosatelitových lokusů izolovaných od zástupců z řádů trubkonosí, dlouhokřídlí a pěvci použila také Janušová (2015), a to ke *cross-species* PCR amplifikaci mikrosatelitů s DNA 6 nepříbuzných jedinců potápky roháče (*Podiceps cristatus*) z řádu potápky. Z 213 testovaných mikrosatelitů označila 20

za polymorfní se 2 až 8 alelami. V rámci diplomové práce (Janušová, 2017) provedla genotypizaci těchto lokusů na 13 nepříbuzných jedincích potápky roháče, na základě čehož tři lokusy z 20 testovaných vyloučila, jelikož nevykazovaly polymorfismus. U 17 polymorfních lokusů detekovala na 13 nepříbuzných jedincích 2 až 12 alel. Všechny 7 mikrosatelitových lokusů, které byly polymorfní zároveň u plameňáka karibského i potápky roháče uvádím v tabulce č. 11.

Dále těchto 213 mikrosatelitů od druhů z řádů trubkonosí, dlouhokřídli a pěvci testovala na polymorfismus pomocí *cross-species* PCR amplifikace Nedvědová (2015) u 6 nepříbuzných jedinců nesýta indomalajského (*Mycteria leucocephala*) z řádu brodiví. Podařilo se jí nalézt celkem 46 polymorfních lokusů, u kterých detekovala 2 až 5 alel. Celkem 17 mikrosatelitů, které vykazují polymorfismus zároveň u plameňáka karibského a nesýta indomalajského uvádím v tabulce č. 11.

Kůrová (2017) testovala polymorfismus 213 mikrosatelitů izolovaných od zástupců z řádů trubkonosí, dlouhokřídli a pěvci u 6 nepříbuzných jedinců plameňáka růžového (*Phoenicopterus roseus*) z řádu plameňáci. Čtyřicet osm z 213 lokusů označila jako polymorfní se dvěma až pěti alelami. Jelikož plameňák karibský a růžový jsou blízce fylogeneticky příbuzné druhy, byl zde počet společných polymorfních mikrosatelitových lokusů vyšší než u potápky roháče či nesýta indomalajského, a to 28 (viz tabulka č. 11).

Pouze dva mikrosatelity z celkového počtu 213 lokusů testovaných na *cross-species* PCR amplifikaci u plameňáka karibského a růžového z řádu plameňáci, potápky roháče z řádu potápky a nesýta indomalajského z řádu brodiví, vykazovaly polymorfismus u všech čtyř druhů. Jednalo se o lokus Pc D103 izolovaný od buňáka světlonohého (Hardesty *et al.*, 2013) a Omn8 od buňáčka Monteirova (Bried *et al.*, 2012). U lokusu Omn8 byl ve všech případech detekován větší počet alel (viz tabulka č. 11). Mimo zdrojový druh a čtyři výše zmíněné otestované druhy, vykazuje mikrosatelit PcD103 polymorfismus také u buňáka Huttonova (*Puffinus huttoni*) z čeledi buňákovití (Hale *et al.*, 2015) a lokus Omn8 byl polymorfní při *cross-species* PCR amplifikaci u buňáčka madeirského z čeledi buňákovití (Bried *et al.*, 2012). Lokus Omn8 byl dále na *cross-species* PCR amplifikaci testován u dalších dvou druhů z čeledi buňákovití, a to u buňáka modravého (*Halobaena caerulea*) a buňáka Bulwerova, avšak ani u jednoho druhu nebyl získán PCR produkt (Bried *et al.*, 2012).

Třináct z 213 otestovaných mikrosatelitů vykazovalo polymorfismus zároveň u plameňáka karibského a dalších dvou druhů (viz tabulka č. 11).

Tabulka č. 11: Mikrosatelity izolované u zástupců řádu trubkonosí, které vykazovaly polymorfismus zároveň u 30 nepříbuzných jedinců plameňáka karibského (PhRu) (tato práce) i 6 nepříbuzných jedinců plameňáka růžového (PhRo) z řádu plameňáci (Kůrová, 2017), 13 nepříbuzných jedinců potápky roháče (PR) z řádu potápky (Janušová, 2017) nebo 6 nepříbuzných jedinců nesyta indomalajského (NI) z řádu brodiví (Nedvědová, 2015) a počty zjištěných alel (A) pro jednotlivé druhy.

Mikrosatelit	Zdrojový druh	PhRu (30; A)	PhRo (6; A)	PR (13; A)	NI (6; A)
De3	albatros stěhovavý	4	-	-	4
Dc5	albatros šedohlavý	2	3	4	-
Dc22		3	-	-	2
Dc31		4	2	-	-
BFAL4	albatros černonohý	2	-	-	2
LAAL7	albatros laysanský	6	3	-	-
LAAL19		6	4	-	-
Paequ3	buřňák bělobradý	3	4	-	2
Paequ7		3	-	-	2
Paequ8		3	-	-	4
Cd5	buřňák šedý	2	2	-	-
Parm01	buřňák trinidadský	7	4	-	3
Ptero05	buřňák havajský	2	2	-	-
PuffG2F	buřňák baleárský	3	2	-	2
Pc B109	buřňák světlonohý	4	2	12	-
Pc D103		3	2	2	2
Bb11	buřňák Bulwerův	5	-	3	-
Bb22		2	2	-	2
Pacbel_00386	buřňák útlozobý	5	3	-	-
Pacbel_03731		2	-	-	2
Pacbel_07265		3	2	-	2
Pacbel_08988		3	3	-	-
Pacbel_09021		3	4	-	2
Pacbel_09528		3	5	-	-
Pacbel_10033		2	2	-	-
Pacbel_17944		4	3	-	-
Oc28B	buřňáček madeirský	3	3	-	-
Oc49		3	5	2	-
Ol10-39	buřňáček dlouhokřídlý	3	3	8	-
Ole02		11	5	-	-
Ole09		5	5	-	3
Omn1	buřňáček Monteirův	5	3	-	-
Omn8		7	5	9	4
Omn21		3	2	-	2
RBG29	racek novozélandský	6	5	-	4

Lokusy RBG29 a Parm01, které jsem označila jako identické, byly také zároveň polymorfní u 6 jedinců nesyta indomalajského se čtyřmi alelami pro RBG29 a třemi alelami pro Parm01 (Nedvědová, 2015) a u 6 jedinců plameňáka růžového, kde bylo u lokusu RBG29 detekováno 5 alel a pro lokus Parm01 4 alely (Kůrová, 2017) (viz tabulka č. 11). Janušová (2017) oba mikrosatelity u potápky roháče označila za monomorfní. Mikrosatelit RBG29 má velký potenciál jako téměř univerzální genetický marker pro velké vodní ptáky, jelikož byl již u 16 zástupců z kladu Aequorlitorornithes označen jako polymorfní (uvedeno výše).

Celkem je nyní pro plameňáka karibského nalezeno 150 polymorfních mikrosatelitů (různě značené, ale přesto totožné lokusy nejsou započteny); 8 *de novo* a 142 *cross-species*. Z celkového počtu 150 polymorfních lokusů je již 127 (8 *de novo* a 119 *cross-species*) (Drobek, 2010, Buržáková, 2013, tato práce), statisticky charakterizováno na souboru 30 nepříbuzných jedinců a je ověřena jejich vzájemná nezávislost.

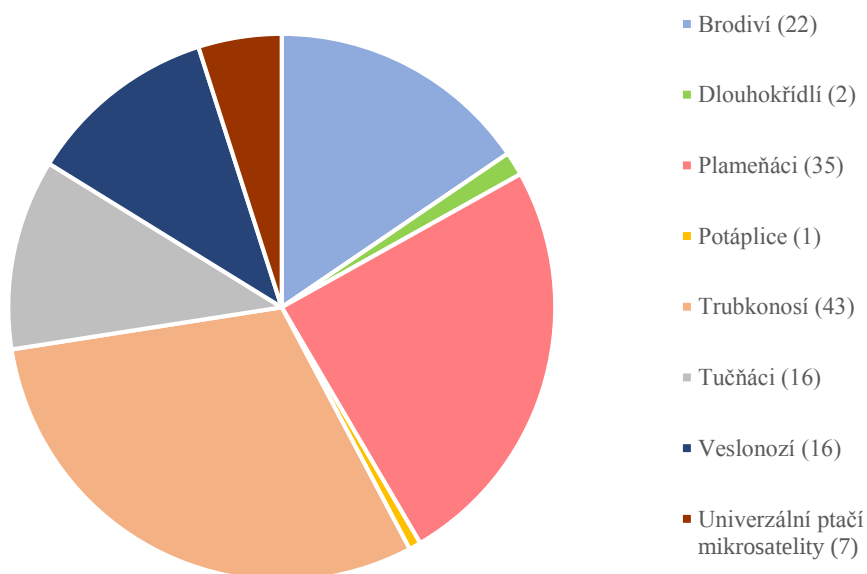
Pomocí programu Cervus 3.0.6 (Kalinowski *et al.*, 2007) jsem provedla souhrnnou statistickou analýzu pro všech těchto 127 lokusů. Průměrný počet alel na lokus je roven 4,685 a očekávaná heterozygotnost činí 0,5303. Pravděpodobnost chybného provedení paternitní studie s těmito 127 mikrosatelity v případě, že je přiřazováno mládě, u něhož není známý ani jeden z rodičů je $1,605 \cdot 10^{-14}$, v případě že je známý pouze jeden rodič je pravděpodobnost chybného přiřazení druhého rodiče $1,252 \cdot 10^{-25}$ a pravděpodobnost chybného přiřazení celého rodičovského páru k mláděti je $4,162 \cdot 10^{-43}$. Pravděpodobnost, že by dva jedinci nesli pro všech 127 lokusů stejnou alelovou sestavu je $1,332 \cdot 10^{-81}$ a pravděpodobnost, že by se našla dvě mláďata, která by byla alelově identická pro všech 127 mikrosatelitových lokusů je $4,464 \cdot 10^{-34}$. Co se týče souladu s Hardy-Weinbergovou rovnováhou, 96 lokusů je v souladu, u 6 lokusů byly zjištěné odchylky (u 2 lokusů byla stanovena signifikantní odchylka na hladině 5 %, u 2 lokusů na hladině 1 % a u 2 lokusů na hladině 0,1 %) a u 25 lokusů nebyl výpočet odchylky od Hardy-Weinbergovy rovnováhy proveden. U 66 lokusů je předpokládán výskyt nulových alel, z toho u 21 mikrosatelitů je odhadovaná frekvence výskytu nulových alel vyšší než 20 %, u 17 lokusů vyšší než 10 % a u 15 lokusů je pravděpodobnost výskytu nulových alel vyšší než 5 %.

Co se týče *de novo* mikrosatelitů nalezených pro plameňáka karibského, Kapil (2005) a Preston (2005) pro něj ve svých disertačních pracích popsali celkem 13 *de novo* mikrosatelitů; Pruμ1–Pruμ13. Drobek (2010) ve své diplomové práci podrobil tyto

lokusy bioinformatickému studiu, na základě čehož zjistil, že v šesti případech (Pru μ 7–Pru μ 12) se jedná o totožné lokusy, pouze s odlišně navrženými primery. Z toho vyplývá, že pro plameňáka karibského zatím bylo popsáno pouze 8 unikátních *de novo* mikrosatelitových lokusů. Kapil *et al.* (2010) do své připravované publikace nakonec zahrnuli pouze 9 lokusů (Pru μ 1–Pru μ 9), avšak článek nebyl zveřejněn a údaje byly publikovány jen v elektronické databázi časopisu Molecular Ecology Resources společně s výsledky dalších autorů (Molecular Ecology Resources Primer Development Consortium *et al.*, 2010).

Ze 142 *cross-species* mikrosatelitů je 135 odvozených od zástupců z kladu Aequirornithes, který zahrnuje všechny vodní ptáky s výjimkou vrubozobých a u 7 se jedná o univerzální ptačí mikrosatelity. Ze všech 142 polymorfních *cross-species* mikrosatelitů je 119 vzájemně nezávislých lokusů statisticky charakterizováno pomocí programů Cervus 3.0.6 (Kalinowski *et al.*, 2007) a Genepop 4.1 (Rousset, 2008). U dalších 23 mikrosatelitů, které zahrnují 16 polymorfních lokusů odvozených od zástupců z řádu tučňáci a 7 polymorfních mikrosatelitů získaných testováním univerzálních ptačích mikrosatelitů, zbývá provést otestování polymorfismu na 30 jedincích a provedení statistické analýzy. Rozdělení všech 142 doposud získaných polymorfních *cross-species* mikrosatelitů podle řádů (tradiční pojetí systému ptáků), od jejichž zástupců byly odvozeny, je znázorněno v grafu č. 3.

Graf č. 3: Rozdělení 142 polymorfních mikrosatelitů nalezených pro plameňáka karibského za pomoci *cross-species* PCR amplifikace mikrosatelitových lokusů odvozených od fylogeneticky blízce příbuzných druhů z kladu Aequorlitorornithes a univerzálních ptačích mikrosatelitů. Rozdělení mikrosatelitů dle zdrojových řádů odpovídá tradičnímu pojetí systému ptáků. Počet polymorfních lokusů odvozených od zástupců jednotlivých řádů je uvedený v závorce.



Z celkového počtu 127 vzájemně nezávislých polymorfních mikrosatelitů pro plameňáka karibského, které byly statisticky charakterizovány na souboru 30 nepříbuzných jedinců, jsem vybrala 5 lokusů vhodných pro paternitní studie; Ole02 od buřňáčka dlouhokřídleho (tato práce), PrB3, PrB102, a PrB110 od plameňáka růžového (Buržáková, 2013 podle Geraci *et al.*, 2010) a Fmin17 od fregatky obecné (*Fregata minor*) (Drobek, 2010 podle Dearbon *et al.*, 2008). Všechny lokusy jsou v souladu s Hardy-Weinbergovou rovnováhou, mají nulovou či velmi nízkou (max. do 10 %) frekvenci výskytu nulových alel a jsou dobře hodnotitelné. Vybrané lokusy a jejich charakteristiky uvádím v tabulce č. 12.

Tabulka č. 12: Pět vybraných *cross-species* mikrosatelitů vhodných pro paternitní studie u plameňáka karibského. Ve sloupcích je uveden název mikrosatelitu (MS), počet alel u 30 nepříbuzných jedinců (A), frekvence výskytu nulových alel (FNull), soulad s Hardy-Weinbergovou rovnováhou (HW) (NS – v souladu, ND – nelze hodnotit), pozorovaná heterozygotnost (HObs), pravděpodobnost chybného provedení paternitní studie v případě, že není známý ani jeden z rodičů (NE-1P), že je známý pouze jeden rodič (NE-2P), že je přiřazován celý rodičovský pár (NE-PP), pravděpodobnost, že by se našli dva jedinci identičtí pro příslušný lokus (NE-I) a pravděpodobnost, že by dvě mláďata byla identická pro příslušný lokus (NE-SI).

MS	A	Fnull	HW	Hobs	NE-1P	NE-2P	NE-PP	NE-I	NE-SI
Ole02	11	–	NS	0,867	0,437	0,277	0,113	0,034	0,329
PrB3	11	–	NS	0,867	0,528	0,355	0,172	0,057	0,357
PrB102	16	0,0098	ND	0,900	0,283	0,165	0,045	0,012	0,294
PrB110	25	0,0586	ND	0,833	0,226	0,128	0,027	0,007	0,284
Fmin17	20	0,0271	ND	0,867	0,280	0,163	0,043	0,012	0,294

Pomocí programu Cervus 3.0.6 (Kalinowski *et al.*, 2007) jsem pro těchto pět lokusů vhodných pro paternitní studie provedla také souhrnnou analýzu. Průměrný počet alel na lokus je roven 16,6 a očekávaná heterozygotnost činí 0,9047. Pravděpodobnost chybného provedení paternitní studie s těmito 5 lokusy v případě, že je přiřazováno mládě, u něhož není známý ani jeden z rodičů je $4,132 \cdot 10^{-3}$, v případě že je známý pouze jeden rodič je pravděpodobnost chybného přiřazení druhého rodiče $3,380 \cdot 10^{-4}$ a pravděpodobnost chybného přiřazení celého rodičovského páru k mláděti je $1,020 \cdot 10^{-6}$. Pravděpodobnost, že by dva jedinci nesli pro všech 5 lokusů stejnou alelovou sestavu je $2,167 \cdot 10^{-9}$ a pravděpodobnost, že by se našla dvě mláďata, která by byla identická pro všech 5 mikrosatelitových lokusů je $2,870 \cdot 10^{-3}$.

Pro plameňáka karibského je v současné době nalezeno celkem 150 polymorfních *de novo* a *cross-species* mikrosatelitů, ne každý nalezený mikrosatelit je ale vhodný pro všechny typy genetických analýz. Některé mají vysoké procento výskytu nulových alel, významně se odchyľují od Hardy-Weinbergovy rovnováhy, případně jsou problematicky hodnotitelné. Proto není od věci snažit se získat další vhodné mikrosatelity, které by mohly být nalezeny:

1. Otestováním dalších mikrosatelitů polymorfních u ptáků z řádu trubkonosí.
2. Otestováním lokusů ze skupin Aequorlornithes, které již byly na *cross-species* PCR amplifikaci u plameňáka karibského testované a v rámci nichž byly publikované další mikrosatelity.
3. Otestováním mikrosatelitů od dalších skupin Aequorlornithes, které doposud ještě nebyly testovány.

Z řádu trubkonosí zbývá ještě otestovat celkem 34 známých mikrosatelitů. Osm nových mikrosatelitů, které našli Booth Jones *et al.* (2017) pro buňáka trinidadského, 15 mikrosatelitů izolovaných od buňáka réunionského (*Pterodroma baraui*) (Danckwerts *et al.*, 2016), 4 netestované mikrosatelity nalezené u buňáka trinidadského (Brown *et al.*, 2009) a dále 7 dosud netestovaných mikrosatelitů odvozených od albatrosa šelfového (*Thalassarche cauta*) (Abbott *et al.*, 2003).

Pro zástupce z řádů patřících do kladu Aequorlornithes, jejichž mikrosatelity již byly na *cross-species* PCR amplifikaci u plameňáka karibského otestovány, bylo nalezeno dalších 83 nových mikrosatelitů; 34 mikrosatelitů odvozených od tučňáka kroužkového (*Pygoscelis adeliae*), tučňáka oslího (*P. papua*) a tučňáka uzdičkového (*P. antarcticus*) (Vianna *et al.*, 2017), 11 mikrosatelitů izolovaných u kormorána subtropického (*Phalacrocorax brasilianus*) (Rodrigues *et al.*, 2017), 11 mikrosatelitových lokusů pro čápa bílého (*Ciconia ciconia*) (Turjeman *et al.*, 2016), 15 polymorfních mikrosatelitů pro ibise skalního (*Geronticus eremita*) (Wirtz *et al.*, 2016) a 2 mikrosatelity izolované u tereje červenonohého (*Sula sula*) (Morris-Pocock *et al.*, 2010).

Nové polymorfní lokusy pro plameňáka karibského by mohlo také přinést testování mikrosatelitů z řádů dlouhokřídlí a slunatci, náležících taktéž do kladu Aequorlornithes. Pro řád slunatci bylo nalezeno 12 polymorfních lokusů, a to konkrétně od druhu kagu chocholatý (*Rhynchetos jubatus*) (Stoeckle *et al.*, 2012). Z řádu dlouhokřídlí bylo zatím na *cross-species* PCR amplifikaci otestováno 7 mikrosatelitů, z čehož 2 byly polymorfní; Apy06 (Drobek, 2010) a RBG 29 (tato práce). Vezmeme-li v úvahu, že na *cross-species* PCR amplifikaci u plameňáka karibského bylo otestováno 709 mikrosatelitů odvozených od zástupců z kladu Aequorlornithes, z čehož 142 bylo označených jako polymorfní, úspěšnost *cross-species* PCR amplifikace mikrosatelitových lokusů izolovaných od druhů z kladu Aequorlornithes u plameňáka karibského je rovna přibližně 19 %. Otestování dalších asi 500 známých mikrosatelitů pro zástupce z řádu dlouhokřídlí by

mohlo pro plameňáka karibského při podobné úspěšnosti poskytnout okolo 90 nových *cross-species* mikrosatelitů.

7 Závěr

V této diplomové práci jsem analyzovala a statisticky charakterizovala 50 mikrosatelitových lokusů odvozených od zástupců z řádu trubkonosí (Procellariiformes) a dlouhokřídlí (Charadriiformes) u 30 nepříbuzných jedinců plameňáka karibského (*Phoenicopus ruber*) z řádu plameňáci (Phoenicopteriformes), které jsem ve své bakalářské práci označila jako polymorfní při *cross-species* PCR amplifikaci u 6 nepříbuzných jedinců plameňáka karibského. Jednalo se o 49 mikrosatelitů odvozených od zástupců z čeledí albatrosovití (Diomedidae), buňňákovití (Procellariidae) a buňňáčkovití (Hydrobatidae) náležících do řádu trubkonosí a o jeden mikrosatelit izolovaný u racka novozélandského (*Larus novaehollandiae scopulinus*) z čeledi rackovití (Laridae) a řádu dlouhokřídlí.

Z 50 párů primerů použitých ke *cross-species* PCR amplifikaci u 30 nepříbuzných jedinců plameňáka karibského, 45 amplifikovalo polymorfní lokus. Programem Genepop 4.1 byla zjištěna 100% vazba mezi dvěma lokusy (RBG29 od racka novozélandského a Parm01 od buňňáka trinidadského), u nichž jsem porovnáním jejich sekvencí pomocí programu BLASTN 2.8.0 potvrdila totožnost. Lokus Parm01 jsem kvůli horší hodnotitelnosti vyloučila z dalších statistických analýz, které byly u všech 44 nezávislých mikrosatelitů provedené pomocí programu Cervus 3.0.6. U 44 nezávislých mikrosatelitových lokusů jsem detekovala od dvou do jedenácti alel. Dva ze 44 nezávislých mikrosatelitů (Oc87B a Pacbel_03731) jsou potencionálně vázané na pohlaví, a to konkrétně na chromozom Z.

Celkem jsem tedy pro plameňáka karibského statisticky charakterizovala 44 nezávislých polymorfních *cross-species* mikrosatelitů, z čehož 43 pocházelo od zástupců z řádu trubkonosí a jeden od racka novozélandského z řádu dlouhokřídlí. V současné době je pro plameňáka karibského nalezeno celkem 150 polymorfních mikrosatelitů (142 *cross-species* a 8 *de novo*), z toho je 127 nezávislých lokusů statisticky charakterizováno na 30 nepříbuzných jedincích.

Další polymorfní *cross-species* mikrosatelity pro plameňáka karibského by mohlo přinést testování mikrosatelitových lokusů od dosud netestovaných skupin ptáků, patřících taktéž do kladu Aequorlitorinithes, jimiž jsou slunatci (Eurypigidae) a dlouhokřídlí (Charadriiformes), ale také testování nových mikrosatelitů od již testovaných skupin ptáků.

8 Použitá literatura

- Abbott, C. L., Double, M. C. (2003): Genetic structure, conservation genetics and evidence of speciation by range expansion in shy and white-capped albatrosses. *Molecular Ecology*, 12, 2953–2962.
- Abdelkrim, J., Robertson, B. C., Stanton, J.-A. L., Gemmell, N. J. (2009): Fast, cost-effective development of species-specific microsatellite markers by genome sequencing. *BioTechniques*, 46, 185–192.
- Acrot, S. S., Wang, Z., Weber, J. L., Deininger, P. L., Batzer, M. A. (1995): Alu repeats: A source for the genesis of primate microsatellites. *Genomics*, 29, 136–144.
- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schäffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D. J. (1997): Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acid Research*, 25, 3389–3402.
- Andris, M., Dubois, M.-P., Jarne, P., Bonadonna, F., Bried, J. (2010): Eleven polymorphic microsatellite markers in Bulwer's petrel, *Bulweria bulwerii*, and cross-species amplification in three other Procellariiformes. *Molecular Ecology Resources*. Manuskript, publikováno online na: <http://biomath.trinity.edu/manuscripts/10-6/mer-10-0209.pdf>, navštíveno dne 2. 3. 2016.
- Beckmann, J. S., Weber, J. L. (1992): Survey of human and rat microsatellites. *Genomics*, 12, 627–631.
- Bicknell, A. W. J., Dawson, D. A., Horsburgh, G. J., Knight, M. E., Bilton, D. T., Votier, S. C. (2011): Characterisation and predicted genome locations of Leach's storm-petrel (*Oceanodroma leucorhoa*) microsatellite loci (Procellariidae, Aves). *Conservation Genetics Resources*, 3, 711–716.
- Booth Jones, K. A., Nicoll, M. A. C., Raisin, C., Dawson, D. A., Hipperson, H., Horsburgh, G. J., Groombridge, J. J., Ismar, S. M. H., Sweet, P., Jones, C. G., Tatayah, V., Ruhomaun, K., Norris, K. (2017): Widespread gene flow between oceans in a pelagic seabirds species complex. *Molecular Ecology*, 26, 5716–5728.
- Braun, E. L., Kimball, R. T., Han, K. L., Iuhasz-Velez, N. R., Bonilla, A. J., Chojnowski, J. L., Smith, J. V., Bowie, R. C. K., Braun, M. J., Hackett, S. J., Harshman, J., Huddleston, C. J., Marks, B. D., Miglia, K. J., Moore, W. S., Reddy, S., Sheldon, F. H., Witt, C. C., Yuri, T. (2011): Homoplastic microinversions and the avian tree of life. *BMC Evolutionary Biology*, 11, 141.
- Bried, J., Andris, M., Dubois, M.-P., Jarne, P. (2012): Eighteen polymorphic microsatellite markers in Monteiro's storm-petrel, *Oceanodroma monteiroi*, and cross-species amplification in three other Procellariiformes. *Molecular Ecology Resources*, 9, 913–915.

- Bried, J., Dubois, M.-P., Jouventin, P., Santos, R. S. (2008): Eleven polymorphic microsatellite markers in Cory's shearwater, *Calonectris diomedea*, and cross-species amplification on threatened Procellariiformes. *Molecular Ecology Resources*, 8, 602–604.
- Brook, J. D., McCurrach, M. E., Harley, H. G., Buckler, A. J., Church, D., Aburatani, H., Hunter, K., Stanton, V. P., Thirion, J. P., Hudson, T., Sohn, R., Zemelman, B., SNell, R. G., Rundle, S. A., Crow, S., Davies, J., Shelbourne, P., Buxton, J., Jones, C., Juvonen, V., Johnson, K., Harper, P. S., Shaw, D. J., Housman, D. E. (1992): Molecular basis of myotonic dystrophy: expansion of a trinucleotide (CTG) repeat at the 3' end of a transkript encoding a protein kinase family member. *Cell*, 68, 799–808.
- Brown, R. M., Jordan, W. C. (2009): Characterization of polymorphic microsatellite loci from Round Island Petrels (*Pterodroma arminjoniana*) and their utility in other seabird species. *Journal of Ornithology*, 150, 925–929.
- Burg, T. M. (1999): Isolation and characterization of microsatellites in albatrosses. *Molecular Ecology*, 8, 338–341.
- Buržáková, K. (2013): Analýza a charakteristika polymorfních *cross-species* mikrosatelitů u plameňáka karibského (*Phoenicopiterus ruber*). Diplomová práce. Depon in: Knihovna biologických oborů PřF UPOL Olomouc.
- Coulibaly, I., Gharbi, K., Danzmann, R. G., Yao, J., Rexroad III, C. E. (2005): Characterization and comparison of microsatellites derived from repeat-enriched libraries and expressed sequence tags. *Animal Genetics*, 36, 309–315.
- Cracraft, J. (1981): Toward a phylogenetic classification of the recent birds of the world (Class Aves). *The Auk*, 98, 681–714.
- Dakin, E. E., Avise, J. C. (2004): Microsatellite null alleles in parentage analysis. *Heredity*, 93, 504–509.
- Danckwerts, D. K., Corré, S., Pinet, P., Le Corre, M., Humeau, L. (2016): Isolation and characterization of 15 polymorphic microsatellite loci for the Barau's petrel (*Pterodroma baraui*) an endangered endemic of Réunion Island (Indian Ocean). *Waterbirds*, 39, 413–416.
- Dawson, R. J. G., Gibbs, H. L., Hobson, K. A., Yezerinac, S. M. (1997): Isolation of microsatellite DNA markers from a passerine bird, *Dendroica patechia* (the yellow warbler), and their use in population studies. *Heredity*, 79, 506–514.
- Dawson, D. A., Horsburgh, G. J., Küpper, C., Stewart, I. R. K., Ball, A. D., Durrant, K. L., Hansson, B., Bacon, I., Bird, S., Klein, Á., Krupa, A. P., Lee, J.-W., Martín-Gálvez, D., Simeoni, M., Smith, G., Spurgin, L. G., Burke, T. (2010): New methods to identify conserved microsatellite loci and develop primer sets of high cross-species utility – as demonstrated for birds. *Molecular Ecology Resources*, 10, 475–494.

Dearborn, D.C., Hailer, F., Fleischer, R.C. (2008): Microsatellite primers for relatedness and population structure in great frigatebirds (Pelecaniformes: Fregatidae). *Molecular Ecology Resources*, 8, 1399-1401.

del Hoyo, J., Elliott, A., Sargatal, J., Imboden, C. (1992): Handbook of the birds of the world. Volume 1. Ostrich to ducks. Lynx Editions, Barcelona.

Delsuc, F., Brinkmann, H., Philippe, H. (2005): Phylogenomics and the reconstruction of the tree of life. *Nature Reviews Genetics*, 6, 361–375.

Drobek, A. (2008): Studium paternity u plameňáků (*Phoenicopterus* sp.) pomocí analýzy mikrosatelitové DNA. Bakalářská práce. Depon in: Knihovna biologických oborů PřF UPOL Olomouc.

Drobek, A. (2010): Analýza mikrosatelitových lokusů pro determinaci paternity u plameňáka karibského (*Phoenicopterus ruber*) a plameňáka růžového (*P. roseus*). Diplomová práce. Depon in: Knihovna biologických oborů PřF UPOL Olomouc.

Feldman Turjeman, S., Centeno-Cuadros, A., Nathan, R. (2016): Isolation and characterization of novel polymorphic microsatellite markers for the white stork, *Ciconia ciconia*: applications in individual-based and population genetics. *Animal Biodiversity and Conservation*, 11, 39.1, 11–16.

Fu, Y.-H., Kuhl, D. P. A., Pizzuti, A., Pieretti, M., Sutcliffe, J. S., Richards, S., Verkert, A. J. M. H., Holden, J. J. A., Fenwick Jr., R. G., Warren, S. T., Oostra, B. A., Nelson, D. L., Caskey, C. T. (1991): Variation of the CGG repeat at the fragile X site results in genetic instability: Resolution of the Sherman paradox. *Cell*, 67, 1047–1058.

Geraci, J., Gaillard, M., Bechet, A., Cezilly, F., Wattier, R. A. (2010): Isolation and characterization of 37 microsatellite loci from the Greater flamingo (*Phoenicopterus roseus*). *Molecular Ecology Resources*. Manuskript, publikováno online na: <http://tomato.bio.trinity.edu/manuscripts/10-2/mer-09-0396.pdf>, navštíveno dne 25. 3. 2018.

Given, A. D., Mills, J. A., Baker, A. J. (2002): Isolation of polymorphic microsatellite loci from the red-billed gull (*Larus novaehollandiae scopulinus*) and amplification in related species. *Molecular Ecology Notes*, 2, 416–418.

Goldstein, D. B., Schlötterer, C. (1999): Microsatellites: Evolution and applications. Oxford University Press, Oxford.

Gonzalez, E. G., Genovart, M., Oro, D., Zardoya, R., Juste, J. (2009): Polymorphic microsatellite markers for the critically endangered Balearic shearwater, *Puffinus mauretanicus*. *Molecular Ecology Resources*, 9, 1044–1046.

Hackett, S. J., Kimball, R. T., Reddy, S., Bowie, R. C. K., Braun, E. L., Braun, M. J., Chojnowski, J. L., Cox, W. A., Han, K.-L., Harshman, J., Huddleston, C. J., Marks, B. D., Miglia, K. J., Moore, W. S., Sheldon, F. H., Steadman, D. W., Witt, C. C., Yuri, T

(2008): A phylogenomic study of birds reveals their evolutionary history. *Science*, 320, 1763–1768.

Hale, M., Harrow, G., Bradfield, P., Cubrinovska, I., Holdaway, R. N. (2015): Genetic similarity of Hutton's shearwaters (*Puffinus huttoni*) in two relict breeding populations. *Notornis*, 62, 130–134.

Hardesty, B. D., Metcalfe, S. S., Wilcox, C. (2013): Genetic variability and population diversity as revealed by microsatellites for flesh-footed shearwaters (*Puffinus carneipes*) in the southern hemisphere. *Conservation Genetics Resources*, 5, 27–29.

Harding, R. M., Boyce, A. J., Clegg, J. B. (1992): The evolution of tandemly repetitive DNA: recombination rules. *Genetics*, 132, 847–859.

Hernandez, L. D., Lounsberry, Z. T., Collins, P. W., Henry, R. W., Newsome, S. D., Sacks, B. N. (2014): Development and characterization of 15 polymorphic microsatellite markers for North Pacific albatrosses using paired-end Illumina shotgun sequencing. *Conservation Genetics Resources*, 6, 491–493.

Hillis, D. M., Pollock, D. D., McGuire, J. A., Zwickl, D. J. (2003): Is sparse taxon sampling a problem for phylogenetic inference? *Systematic Biology*, 52, 124–126.

Chapuis, M.-P., Estoup, A. (2007): Microsatellite null alleles and estimation of population differentiation. *Molecular Biology and Evolution*, 24, 621–631.

Chojnowski, J. L., Kimball, R. T., Braun, E. L. (2008): Introns outperform exons in analyses of basal avian phylogeny using clathrin heavy chain genes. *Gene*, 410, 89–96.

Janušová, D. (2015): *Cross-species amplifikace mikrosatelitů z řádu trubkonosí u potápky roháče (Podiceps cristatus)*. Bakalářská práce. Depon in: Knihovna biologických oborů PřF UPOL Olomouc.

Janušová, D. (2017): *Charakteristika vybraných polymorfních cross-species mikrosatelitů z kladu Aequorlitorhithes u potápky roháče (Podiceps cristatus)*. Diplomová práce. Depon in: Knihovna biologických oborů PřF UPOL Olomouc.

Jarvis, E. D., Mirarab, S., Aberer, A. J., Li, B., Houde, P., Li, C., Ho, S. Y. W., Faircloth, B. C., Nabholz, B., Howard, J. T., Suh, A., Weber, C. C., da Fonseca, R. R., Li, J., Zhang, F., Li, H., Zhou, L., Narula, N., Liu, L., Ganapathy, G., Boussau, B., Bayzid, S., Zavidovych, V., Subramanian, S., Gabaldón, T., Capella-Gutiérrez, S., Huerta-Cepas, J., Rekepalli, B., Munch, K., Schierup, M., Lindow, B., Warren, W. C., Ray, D., Green, R. E., Bruford, M. W., Zhan, X., Dixon, A., Li, S., Li, N., Huang, Y., Derryberry, E. P., Bertelsen, M. F., Sheldon, F. H., Brumfield, R. T., Mello, C. V., Lovell, P. V., Wirthlin, M., Schneider, M. P. C., Prosdocimi, F., Samaniego, J. A., Velazquez, A. M. V., Alfaro-Núñez, A., Campos, P. F., Petersen, B., Sicheritz-Ponten, T., Pas, A., Bailey, T., Scofield, P., Bunce, M., Lambert, D. M., Zhou, Q., Perelman, P., Driskell, A. C., Shapiro, B., Xiong, Z., Zeng, Y., Liu, S., Li, Z., Liu, B., Wu, K., Xiao, J., Yinqi, X., Zheng, Q., Zhang, Y., Yang, H., Wang, J., Smeds, L., Rheindt, F. E., Braun, M., Fjeldsa, J., Orlando, L., Barker, F. K., Jönsson, K. A., Johnson, W., Koepfli, K. P., O'Brien, S., Haussler, D.,

- Ryder, O. A., Rahbek, C., Willerslev, E., Graves, G. R., Glenn, T. C., McCormack, J., Burt, D., Ellegren, H., Alström, P., Edwards, S. V., Stamatakis, A., Mindell, D. P., Cracraft, J., Braun, E. L., Warnow, T., Jun, W., Gilbert, M. T. P., Zhang, G. (2014): Whole-genome analyses resolve early branches in the tree of life of modern birds. *Science*, 346, 1320–1331.
- Kalinowski, S. T., Taper, M. L., Marshall, T. C. (2007): Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. *Molecular Ecology*, 16, 1099–1106.
- Kapil, R. (2005): Microsatellite-based genetic profiling for the management of wild and captive flamingo populations: Dissertation. Denton, University of North Texas, publikováno online na: <http://digital.library.unt.edu/ark:/67531/metadc4957/>, navštíveno dne 12. 4. 2018.
- Kapil, R., Sawyer, G. M., Preston, L., Benjamin, R. C. (2010): Isolation and characterization of polymorphic microsatellite loci from the Caribbean flamingo (*Phoenicopterus ruber ruber*). *Molecular Ecology Resources*. Manuskript, publikováno online na: <http://tomato.biol.trinity.edu/manuscripts/10-1/mer-09-0285.pdf>, navštíveno dne 22. 4. 2018.
- Kimball, R. T., Wang, N., Heimer-McGinn, V., Ferguson, C., Braun, E. L. (2013): Identifying localized biases in large datasets: a case study using the avian tree of life. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 69, 1021–1032.
- Kruglyak, S., Durrett, R. T., Malcolm, D. S., Aquadro, C. F. (1998): Equilibrium distributions of microsatellite repeat length resulting from a balance between slippage events and point mutations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95, 10774–10778.
- Kůrová, V. (2017): *Cross-species amplifikace mikrosatelitů z řádu trubkonosí u plameňáka růžového (Phoenicopterus roseus)*. Bakalářská práce. Depon in: Knihovna biologických oborů PřF UPOL Olomouc.
- Lawrence, H. A. (2008): Conservation Genetics of the World's most endangered seabird, the Chatham Island Tāiko. Dissertation. Auckland University, Nový Zéland, publikováno online na: <http://mro.massey.ac.nz/handle/10179/657>, navštíveno dne 23. 10. 2017.
- Levinson, G., Gutman, G. A. (1987): Slipped-strand mispairing: a major mechanism for DNA sequence evolution. *Molecular Biology and Evolution*, 4, 203–221.
- Li, Y. C., Korol, A. B., Fahima, T., Nevo, E. (2004): Microsatellites within genes: structure, function, and evolution. *Molecular Biology and Evolution*, 21, 991–1007.
- Lin, X., Kaul, S., Rounsley, S., Shea, T. P., Benito, M. I., Town, C. D., Fujii, C. Y., Mason, T., Bowman, C. L., Barnstead, M., Feldblyum, T. V., Buell, C. R., Ketchum, K. A., Lee, J., Ronning, C. M., Koo, H. L., Moffat, K. S., Cronin, L. A., Shen, M., Pai, G., Van Aken, S., Umayam, L., Tallon, L. J., Gill, J. E., Venter, J. C., *et al.* (1999): Sequence and analysis of chromosome 2 of the plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature*, 402, 761–768.

- Lombal, J. A., Wenner, T. J., Burridge, Ch. P. (2015): Assessment of high-resolution melting (HRM) profiles as predictors of microsatellite variation: an example in Providence Petrel (*Pterodroma solandri*). *Genes & Genomics*, 37, 977–983.
- Mangiarini, L., Sathasivam, K., Seller, M., Cozens, B., Harper, A., Hetherington, C., Lawton, M., Trottier, Y., Lehrach, H., Davies, S. W., Bates, G. P. (1996): Exon 1 of the HD gene with an expanded CAG repeat is sufficient to cause a progressive neurological phenotype in transgenic mice. *Cell*, 87, 493–506.
- Manišová, B. (2011): Analýza vybraných polymorfních *cross-species* mikrosatelitů pro determinaci paternity u plameňáka růžového (*Phoenicopus roseus*). Bakalářská práce. Depon in: Knihovna biologických oborů PřF UPOL Olomouc.
- Matošková, T. (2011): Analýza vybraných polymorfních *cross-species* mikrosatelitů pro determinaci paternity u plameňáka karibského (*Phoenicopus ruber*). Bakalářská práce. Depon in: Knihovna biologických oborů PřF UPOL Olomouc.
- Mayr, G. (2004): Morphological evidence for sister group relationship between flamingos (Aves: Phoenicopteridae) and grebes (Podicipedidae). *Zoological Journal of the Linnean Society*, 140, 157–169.
- Messier, W., Li, S. H., Stewart, C. B. (1996): The birth of microsatellites. *Nature*, 381, 483.
- Molecular Ecology Resources Primer Development Consortium *et al.* (2010): Permanent Genetic Resources Database 1 August 2009–30 September 2009. *Molecular Ecology Resources*, 10, 232–236.
- Moodley, Y., Masello, J. F., Cole, T. L., Calderon, L., Munimanda, G. K., Thali, M. R., Alderman, R., Cuthbert, R. J., Marin, M., Massaro, M., Navarro, J., Phillips, R. A., Ryan, P. G., Suazo, C. G., Cherel, Y., Weimerskirch, H., Quillfeldt, P. (2015): Evolutionary factors affecting the cross-species utility of newly developed microsatellite markers in seabirds. *Molecular Ecology Resources*, 15, 1046–1058.
- Morris-Pocock, J. A., Taylor, S. A., Sun, Z., Friesen, V. L. (2010): Isolation and characterization of fifteen polymorphic microsatellite loci for red-footed boobies (*Sula sula*). *Molecular Ecology Resources*, 10, 404–408.
- Neff, B. D., Gross, M. R. (2001): Microsatellite evolution in vertebrates: Inference from AC dinucleotide repeats. *Evolution*, 55, 1717–1733.
- Nedvědová, M. (2015): *Cross-species* amplifikace mikrosatelitů z řádu trubkonosí u nesyta indomalajského (*Mycteria leucocephala*). Diplomová práce. Depon in: Knihovna biologických oborů PřF UPOL Olomouc.
- Obručová, E. (2009): Polymorfní DNA mikrosatelity u čápa bílého (*Ciconia ciconia*). Bakalářská práce. Depon in: Knihovna biologických oborů PřF UPOL Olomouc.

- Oliveira, E. J., Pádua, J. G., Zucchi, M. I., Vencovsky, R., Vieira, L. C. (2006): Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. *Genetics and Molecular Biology*, 29, 294–307.
- Pardue, M. L., Lowenhaupt, K., Rich, A., Nordheim, A. (1987): (dC-dA)_n (dG-dT)_n sequences have evolutionarily conserved chromosomal locations in *Drosophila* with implications for roles in chromosome structure and function. *The EMBO Journal*, 6, 1781–1789.
- Pechová, A. (2014): *Cross-species amplifikace mikrosatelitů z řádu tučňáci a konzervovaných ptačích mikrosatelitů u nesyta indomalajského (Mycteria leucocephala)*. Bakalářská práce. Depon in: Knihovna biologických oborů PřF UPOL Olomouc.
- Poe, S., Chubb, A. L. (2004): Birds in a bush: Five genes indicate explosive evolution of avian orders. *Evolution*, 58, 404–415.
- Preston, E. L. (2005): Isolation and Characterization of Polymorphic Loci from the Caribbean Flamingo (*Phoenicopterus ruber ruber*): New Tools for Wildlife Management: Dissertation. Denton, University of North Texas, publikováno online na: <http://digital.library.unt.edu/ark:/67531/metadc4908/>, navštíveno dne 12. 4. 2018.
- Primmer, C. R., Møller, A. P., Ellegren, H. (1996): A wide-range survey of cross-species microsatellite amplification in birds. *Molecular Ecology*, 5, 365–378.
- Primmer, C. R., Raudsepp, T., Chowdhary, B. P., Møller, A. P., Ellegren, H. (1997): Low frequency of microsatellites in the avian genome. *Genome Research*, 7, 471–482.
- Prum, R. O., Berv, J. S., Dornburg, A., Field, D. J., Townsend, J. P., Lemmon, E. M., Lemmon, A. R. (2015): A comprehensive phylogeny of birds (Aves) using targeted next-generation DNA sequencing. *Nature*, 526, 569–573.
- Quillfeldt, P., Masello, J. F., Segelbacher, G. (2012): Extra-pair paternity in seabirds: a review and case study of thin-billed prions *Pachyptila belcheri*. *Journal of Ornithology*, 153, 367–373.
- Reddy, S., Kimball, R. T., Pandey, A., Hosner, P., Braun, M. J., Hackett, S. J., Han, K.-L., Harshman, J., Huddleston, C., Kingston, S., Marks, B. D., Miglia, K. J., Moore, W. S., Sheldon, F. H., Witt, C. C., Yuri, T., Braun, E. L. (2017): Why do phylogenomic data sets yield conflicting trees? Data type influences the avian tree of life more than taxon sampling. *Systematic Biology*, 66, 857–879.
- Rodrigues, P., Micael, J., Hernandez, C., Verdugo, C. (2017): Characterisation of 11 microsatellite DNA markers from the Neotropic Cormorant (*Phalacrocorax brasilianus*). *Avian Biology Research*, 10, 45–48.
- Rose, O., Falush, D. (1998): A threshold size for microsatellite expansion. *Molecular Biology and Evolution*, 15, 613–615.

- Rousset, F. (2008): Genepop'007: a complete re-implementation of the genepop software for Windows and Linux. *Molecular Ecology Resources*, 8, 103–106.
- Santos, M. S., Gonçalves, E. C., Barbosa, M. S. R., Silva, A., Schneider, M. P. C. (2006): Isolation and characterization of polymorphic microsatellite loci in the scarlet ibis (*Eudocimus ruber* - Threskiornithidae - Aves). *Molecular Ecology Notes* (6), 307–309.
- Sharma, P. C., Grover, A., Kahl, G. (2007): Mining microsatellites in eukaryotic genomes. *Trends in Biotechnology*, 25, 490–498.
- Schlötterer, C. (2000): Evolutionary dynamics of microsatellite DNA. *Chromosoma*, 109, 365–371.
- Schlosser, J. A., Dubach, J. M., Garner, T. W. J., Araya, B., Bernal, M., Simeone, A., Smith, K. A., Wallace, R. S. (2009): Evidence for gene flow differs from observed dispersal patterns in the Humboldt penguin. *Spheniscus humboldti*. *Conservation Genetics*, 10, 839–849.
- Schlosser, J. A., Garner, T. W. J., Dubach, J. M., McElligott, A. G. (2003): Characterization of microsatellite loci in Humboldt penguin (*Spheniscus humboldti*) and cross-amplification in other penguin species. *Molecular Ecology Notes*, 3, 62–64.
- Schlötterer, C., Amos, W., Tautz, D. (1991): Conservation of polymorphic simple sequence loci in cetacean species. *Nature*, 354, 63–65.
- Schlötterer, C., Tautz, D. (1992): Slippage synthesis of simple sequence DNA. *Nucleic Acids Research*, 20, 211–215.
- Smith, J. V., Braun, E. L., Kimball, R. T. (2013): Ratite nonmonophyly: independent evidence from 40 novel loci. *Systematic Biology*, 62, 35–49.
- Stephan, W., Cho, S. (1994): Possible role of natural selection in the formation of tandem-repetitive noncoding DNA. *Genetics*, 136, 333–341.
- Stoeckle, B. C., Theuerkauf, J., Rouys, S., Gula, R., Lorenzo, A., Lambert, C., Kaeser, T., Kuehn, R. (2012): Identification of polymorphic microsatellite loci for the endangered Kage (*Rhynochetos jubatus*) by high-throughput sequencing. *Journal of Ornithology*, 153, 249–253.
- Strassmann, J. E., Barefield, K., Solís, C. R., Hughes, C. R., Queller, D. C. (1997): Trinucleotide microsatellite loci for a social wasp, *Polistes*. *Molecular Ecology*, 6, 97–100.
- Strejčková, B. (2016): *Cross-species amplifikace mikrosatelitů z řádu trubkonosí u plameňáka karibského (Phoenicopterus ruber)*. Bakalářská práce. Depon in: Knihovna biologických oborů PřF UPOL Olomouc.
- Sun, Z., Gómez-Díaz, E., Bailie, A., Friesen, V. (2009): Isolation and characterization of microsatellite loci for storm-petrels. *Molecular Ecology Resources*, 9, 913–915.

- Tautz, D. (1989): Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucleic Acids Research*, 17, 6463–6471.
- Techow, N. M. S. M., O’Ryan, C. (2004): Characterization of microsatellite loci in white-chinned petrel (*Procellaria aequinoctialis*) and cross-amplification in six other procellariiform species. *Molecular Ecology Notes*, 4, 33–35.
- Tomasulo-Seccomandi, A. M., Schable, N. A., Bryan, A. L. Jr., Brisbin, I. L. Jr., Del Lama, S. N., Glenn, T. C. (2003): Development of microsatellite DNA loci from the wood stork (Aves, Ciconiidae, *Mycteria americana*). *Molecular Ecology Notes* (3), 563–566.
- Tóth, G., Gáspári, Z., Jurka, J. (2000): Microsatellites in different eukaryotic genomes: survey and analysis. *Genome Research*, 10, 967–981.
- Van Tuinen, M., Butvill, D. B., Kirsch, J. A. W., Hedges, S. B. (2001): Convergence and divergence in the evolution of aquatic birds. *Proceedings of the Royal Society London B, Biological Sciences*, 268, 1345–1350.
- Varshney, R. K., Thiel, T., Stein, N., Langridge, P., Graner, A. (2002): *In silico* analysis on frequency and distribution of microsatellites in ESTs of some cereal species. *Cellular & Molecular Biology Letters*, 7, 537–546.
- Vianna, J. A., Noll, D., Mura-Jornet, I., Valenzuela-Guerra, P., Gonzáles-Acuña, D., Navarro, C., Loyola, D. E., Dantas, G. P. M. (2017): Comparative genome-wide polymorphic microsatellite markers in Antarctic penguins through next generation sequencing. *Genetics and Molecular Biology*, 40, 676–687.
- Wang, N., Braun, E. L., Kimball, R. T. (2012): Testing hypotheses about the sister group of the passeriformes using an independent 30-locus data set. *Molecular Biology and Evolution*, 29, 737–750.
- Weber, J. L. (1990). Informativeness of human (dC-dA)_n .(dG-dT)_n polymorphisms. *Genomics* 7, 524–530.
- Welch, A. J., Fleischer, R. C. (2011): Polymorphic microsatellite markers for the endangered Hawaiian petrel (*Pterodroma sandwichensis*). *Conservation Genetics Resources*, 3, 581–584.
- Wirtz, S., Böhm, C., Fritz, J., Hankeln, T., Hochkirch, A. (2016): Isolation of microsatellite loci by next-generation sequencing of the critically endangered Northern Bald Ibis, *Geronticus eremita*. *Journal of Heredity*, 2016, 363–366.
- Zane, L., Bargelloni, L., Patarnello, T. (2002): Strategies for microsatellite isolation: a review. *Molecular Ecology*, 11, 1–16.
- Zhu, Y., Strassmann, J. E., Queller, D. C. (2000): Insertions, substitutions, and the origin of microsatellites. *Genetic Research*, 76, 227–236.

Zlochová, A. (2017): Cross-species amplifikace mikrosatelitů z řádu tučňáci a konzervovaných ptačích mikrosatelitů u plameňáka karibského (*Phoenicopiterus ruber*). Bakalářská práce. Depon in: Knihovna biologických oborů PřF UPOL Olomouc.

9 Přílohy

Příloha č. 1: Výstup analýzy 45 polymorfních *cross-species* mikrosatelitů u 30 nepříbuzných jedinců plameňáka karibského v programu Cervus 3.0.6. Ve sloupcích je uveden název mikrosatelitu, počet alel (k), počet genotypovaných jedinců (N), pozorovaná heterozygotnost (HObs), očekávaná heterozygotnost (HExp), obsah polymorfní informace (PIC), pravděpodobnost chybného provedení paternitní studie v případě, že není známý ani jeden z rodičů (NE-1P), že je známý pouze jeden rodič (NE-2P), že je přiřazován celý rodičovský pár (NE-PP), pravděpodobnost, že by se našli dva jedinci identičtí pro příslušný lokus (NE-I) a pravděpodobnost, že by dvě mláďata byla identická pro příslušný lokus (NE-SI), soulad s Hardy-Weinbergovou rovnováhou (HW) (NS – v souladu, ND – nelze hodnotit, ** – signifikantní odchylka na hladině 1 %, *** –signifikantní odchylka na hladině 0,1%) a odhadovaná frekvence nulových alel ((F(Null))).

Mikrosatelit	k	N	HObs	HExp	PIC	NE-1P	NE-2P	NE-PP	NE-I	NE-SI	HW	F (Null)
De3	4	30	0.367	0.476	0.427	0.886	0.743	0.590	0.324	0.597	NS	0.1195
Dc5	2	30	0.433	0.463	0.351	0.896	0.824	0.733	0.401	0.623	NS	0.0244
Dc22	3	30	0.267	0.239	0.214	0.972	0.888	0.806	0.606	0.784	ND	-0.0659
Dc31	4	30	0.233	0.598	0.527	0.822	0.673	0.515	0.231	0.514	***	0.4434
BFAL4	2	30	0.400	0.364	0.294	0.936	0.853	0.768	0.476	0.690	NS	-0.0557
BFAL14	4	30	0.533	0.541	0.492	0.849	0.689	0.516	0.259	0.549	NS	-0.0210
LAAL7	6	30	0.733	0.738	0.689	0.673	0.492	0.300	0.112	0.415	NS	-0.0008
LAAL19	6	30	0.767	0.749	0.700	0.663	0.483	0.292	0.106	0.408	NS	-0.0196
Ptero05	2	30	0.400	0.452	0.346	0.901	0.827	0.737	0.407	0.630	NS	0.0526
Bb11	5	29	0.483	0.628	0.628	0.738	0.563	0.374	0.152	0.453	NS	0.1596
Bb22	2	30	0.433	0.440	0.339	0.906	0.830	0.741	0.415	0.637	NS	-0.0006
Bb25	3	30	0.533	0.540	0.475	0.859	0.716	0.567	0.276	0.554	NS	-0.0019
Paequ3	3	30	0.400	0.392	0.353	0.926	0.798	0.667	0.411	0.660	NS	-0.0423
Paequ7	3	30	0.400	0.386	0.342	0.928	0.808	0.685	0.423	0.666	NS	-0.0461
Paequ8	3	30	0.233	0.292	0.260	0.959	0.860	0.761	0.535	0.740	ND	0.1331

Příloha č. 1: Pokračování.

Mikrosatelit	k	N	HObs	HExp	PIC	NE-1P	NE-2P	NE-PP	NE-I	NE-SI	HW	F (Null)
Cd5	2	30	0.133	0.127	0.117	0.992	0.942	0.893	0.774	0.881	ND	-0.0258
Puff G2F	3	30	0.633	0.649	0.562	0.797	0.654	0.506	0.207	0.483	NS	-0.0033
Pc A107	2	30	0.333	0.282	0.239	0.961	0.880	0.803	0.560	0.751	ND	-0.0884
Pc B109	4	30	0.600	0.693	0.628	0.741	0.573	0.398	0.155	0.448	NS	0.0688
Pc D103	3	30	0.300	0.321	0.293	0.950	0.836	0.720	0.490	0.715	NS	0.0081
Patbel1	4	30	0.267	0.424	0.393	0.908	0.761	0.603	0.364	0.633	NS	0.2235
Patbel4	2	30	0.200	0.325	0.269	0.949	0.866	0.783	0.514	0.718	NS	0.2308
Pacbel_00386	5	30	0.867	0.689	0.616	0.751	0.591	0.424	0.165	0.452	NS	-0.1224
Pacbel_03731	2	30	0.033	0.413	0.324	0.918	0.838	0.750	0.435	0.656	***	0.8469
Pacbel_07265	3	30	0.300	0.294	0.267	0.958	0.854	0.749	0.527	0.737	ND	0.0070
Pacbel_08509	2	30	0.167	0.155	0.141	0.988	0.929	0.874	0.729	0.856	ND	-0.0358
Pacbel_08988	3	30	0.533	0.450	0.397	0.902	0.771	0.633	0.356	0.618	NS	-0.0993
Pacbel_09021	3	30	0.233	0.292	0.260	0.959	0.860	0.761	0.535	0.740	ND	0.1331
Pacbel_09528	3	30	0.400	0.513	0.428	0.873	0.758	0.628	0.322	0.578	NS	0.1299
Pacbel_10033	2	30	0.433	0.413	0.324	0.918	0.838	0.750	0.435	0.656	NS	-0.0324
Pacbel_17944	4	30	0.500	0.595	0.521	0.824	0.678	0.521	0.236	0.516	NS	0.0842
Oc28B	3	30	0.433	0.368	0.331	0.935	0.813	0.688	0.438	0.679	NS	-0.1125
Oc49	3	30	0.700	0.493	0.406	0.882	0.775	0.652	0.344	0.593	NS	-0.1990
Oc79	2	30	0.200	0.282	0.239	0.961	0.880	0.803	0.560	0.751	ND	0.1628
Oc87B	2	30	0.100	0.494	0.368	0.882	0.816	0.723	0.382	0.603	**	0.6587
Omn1	5	30	0.667	0.690	0.626	0.735	0.568	0.386	0.156	0.450	NS	0.0172
Omn3	2	30	0.267	0.472	0.357	0.892	0.822	0.730	0.395	0.616	NS	0.2705
Omn8	7	30	0.633	0.733	0.675	0.689	0.516	0.332	0.124	0.421	NS	0.0769
Omn21	3	30	0.667	0.524	0.434	0.867	0.754	0.624	0.316	0.571	NS	-0.1193
Ol10-39	3	30	0.133	0.244	0.225	0.971	0.878	0.783	0.593	0.778	ND	0.2766
Ole02	11	30	0.867	0.875	0.845	0.437	0.277	0.113	0.034	0.329	NS	-0.0065
Ole09	5	30	0.433	0.460	0.418	0.892	0.746	0.589	0.334	0.607	NS	-0.0071
Ole13	5	30	0.867	0.789	0.740	0.620	0.440	0.259	0.086	0.384	NS	-0.0579
RBG29	7	30	0.767	0.686	0.642	0.721	0.538	0.337	0.139	0.477	NS	-0.0798

Number of individuals:	30
Number of loci:	44
Mean number of alleles per locus:	3.568
Mean proportion of loci typed:	0.9992
Mean expected heterozygosity:	0.4795
Mean polymorphic information content (PIC):	0.4209
Combined non-exclusion probability (first parent):	0.00076458
Combined non-exclusion probability (second parent):	0.00000054
Combined non-exclusion probability (parent pair):	2.089E-0011
Combined non-exclusion probability (identity):	2.460E-0023
Combined non-exclusion probability (sib identity):	7.940E-0011