

**Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra ekologie a životního prostředí**



**Analýza a charakteristika vybraných polymorfních
cross-species mikrosatelitů z řádu tučňáci
a konzervovaných ptačích mikrosatelitů
u plameňáka karibského (*Phoenicopterus ruber*)**

Bc. Monika Šuláková

**Diplomová práce
předložená
na Katedře ekologie a životního prostředí
Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého v Olomouci**

**jako součást požadavků
na získání titulu Mgr. v oboru
Ekologie a ochrana životního prostředí**

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

Olomouc 2019

Šuláková, M. (2019): Analýza a charakteristika vybraných polymorfních *cross-species* mikrosatelitů z řádu tučňáci a konzervovaných ptačích mikrosatelitů u plameňáka karibského (*Phoenicopterus ruber*) (diplomová práce). Olomouc: Katedra ekologie a životního prostředí PřF UP v Olomouci.

Abstrakt

V této diplomové práci jsem analyzovala a charakterizovala vybrané mikrosatelity u plameňáka karibského (*Phoenicopterus ruber*).

V teoretické části jsem se zabývala systémem ptáků především na základě molekulárních metod s důrazem na řád plameňáci (Phoenicopteriformes) a taxonomii plameňáka karibského, jeho biologii a ekologii. Následně jsem se věnovala molekulárně genetickým charakteristikám populací s důrazem na mikrosatelity. Také jsem popsala veškeré dosud charakterizované polymorfní mikrosatelity pro plameňáka karibského.

V praktické části jsem pomocí *cross-species* PCR amplifikace analyzovala 22 polymorfních mikrosatelitů na DNA 30 nepříbuzných jedinců plameňáka karibského, které jsem následně charakterizovala v programu Cervus 3.0.6 a testovala pomocí programu Genepop 4.2.

Klíčová slova: plameňák karibský, *Phoenicopterus ruber*, mikrosatelit, *cross-species* PCR amplifikace, tučňák

Šuláková, M. (2019): The analysis and characterization of selected polymorphic cross-species microsatellites from Sphenisciformes and conserved avian microsatellites in Caribbean Flamingo (*Phoenicopterus ruber*) (master's thesis). Olomouc: Department of Ecology and Environmental Sciences, Faculty of Science, Palacký University Olomouc.

Abstract

In this master's thesis I analyzed and characterized selected microsatellites in American flamingo (*Phoenicopterus ruber*).

In the theoretical part I dealt with the system of birds mainly on the basis of molecular methods with emphasis on the Phoenicopteriformes and taxonomy of the American flamingo, its biology and ecology. Subsequently I focused on molecular genetic characteristics of populations with emphasis on microsatellites. I have also described all the previously characterized polymorphic microsatellites for the American flamingo.

In the practical part I analyzed 22 polymorphic microsatellites by cross-species PCR amplification of DNA of 30 unrelated individuals of the American flamingo, which I subsequently described in Cervus 3.0.6 and tested using Genepop 4.2.

Key words: American flamingo, *Phoenicopterus ruber*, microsatellite, cross-species PCR amplification, penguin

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně pod vedením RNDr. Petra Nádvorníka, Ph.D. s použitím citovaných literárních zdrojů.

V Olomouci 10. května 2019

.....

podpis

Obsah

Seznam tabulek	vii
Seznam obrázků	viii
Poděkování	ix
1 Úvod	1
1.1 Taxonomie plameňáka karibského	1
1.1.1 Řád plameňáci	5
1.1.2 Plameňák karibský	7
1.2 Molekulárně genetické charakteristiky populací	8
1.3 Repetitivní DNA	9
1.3.1 Rozptýlená repetitivní DNA	9
1.3.2 Tandemová repetitivní DNA	9
1.4 Mikrosatelity u plameňáka karibského	11
2 Cíle práce	15
3 Materiál a metody	16
3.1 Biologický materiál	16
3.2 Testované primery	16
3.3 PCR amplifikace mikrosatelitů	18
3.4 Zpracování PCR produktů pomocí elektroforetické separace	19
3.5 Statistické zpracování výsledků testování	22
3.6 Použité chemikálie	23
3.7 Použité roztoky	24
3.8 Použité laboratorní přístroje	26
4 Výsledky	27
5 Diskuse	35
6 Závěr	46
7 Seznam použitých zkratk	47
8 Literatura	48
9 Přílohy	56

Seznam tabulek

Tabulka č. 1: Seznam mikrosatelitů testovaných na plameňákovi karibském pocházejících od druhů řádu tučňáci.....	17
Tabulka č. 2: Seznam EST ptačích mikrosatelitů a konzervovaných ptačích mikrosatelitů testovaných na plameňákovi karibském.....	17
Tabulka č. 3: Složení reakčního PCR mixu pro amplifikaci šesti, respektive třiceti vzorků DNA.....	18
Tabulka č. 4: Charakteristika 15 polymorfních mikrosatelitů z řádu tučňáci amplifikovaných u 30 nepříbuzných jedinců plameňáka karibského.....	29
Tabulka č. 5: Charakteristika 7 polymorfních univerzálních ptačích mikrosatelitů amplifikovaných u 30 nepříbuzných jedinců plameňáka karibského.....	31
Tabulka č. 6: Počty alel vybraných mikrosatelitů u jednotlivých analyzovaných druhů ptáků.....	39
Tabulka č. 7: Počty alel vybraných polymorfních mikrosatelitů u jednotlivých analyzovaných, respektive testovaných druhů ptáků v rámci Laboratoře populační genetiky Katedry buněčné biologie a genetiky PřF UPOL.....	41

Seznam obrázků

Obrázek č. 1: Výřez kladu zahrnujícího plameňáky ze systému sestaveného Hackett <i>et al.</i> , (2008).....	2
Obrázek č. 2: Srovnání taxonomické klasifikace ptáků podle Prum <i>et al.</i> (2015) a Jarvis <i>et al.</i> (2014) (Thomas, 2015).....	3
Obrázek č. 3: Klad Aequorlitorornithes (Prum <i>et al.</i> , 2015).	4
Obrázek č. 4: Taxonomická skupina zahrnující plameňáky a potápky a k nim sesterský klad ptáků (Reddy <i>et al.</i> , 2017).....	5
Obrázek č. 5: Dva jedinci plameňáka karibského v Zoologické zahradě Liberec (foto: Milan Šulák).....	7
Obrázek č. 6: Elektroforetogram produktů amplifikace mikrosatelitu PNN08 od tučňáka brýlového. Na DNA 30 nepříbuzných jedinců plameňáka karibského bylo nalezeno 5 alel při teplotě <i>annealingu</i> 59 °C a délce elektroforetické separace 90 minut.	33

Poděkování

Velmi bych chtěla poděkovat vedoucímu práce RNDr. Petru Nádvorníkovi, Ph.D. za vysvětlení problematiky, poskytnutí materiálů, ale také za ochotu, trpělivost a čas, který mi věnoval jak při práci v laboratoři, tak i při konzultacích k obsahu této diplomové práce. Zároveň bych ráda poděkovala kolektivu Laboratoře populační genetiky na Katedře buněčné biologie a genetiky PřF UPOL za kolegiální a vytvoření příjemného pracovního prostředí. A v neposlední řadě děkuji zaměstnancům Zoologické zahrady Dvůr Králové a Zoologické zahrady Liberec za poskytnutí biologického materiálu od jedinců plameňáka karibského.

V Olomouci 10. května 2019

1 Úvod

1.1 Taxonomie plameňáka karibského

Řád plameňáci (Phoenicopteriformes) je tvořen jednou z evolučně nejstarších skupin ptáků. Byly objeveny 30 milionů let staré fosílie současných plameňáků z doby oligocénu. Primitivnější formy plameňáků byly nalezeny z doby středního eocénu, tedy asi 50 milionů let staré. Některé fosilní záznamy jsou známy z oblastí Evropy, Severní Ameriky a Austrálie, kde se nyní plameňáci nevyskytují, což značí jejich větší areál rozšíření oproti současnosti (del Hoyo *et al.*, 1992).

Taxonomické zařazení plameňáků je problematické a během posledních desetiletí docházelo k různým změnám v systému ptáků. Jednou z variant zařazení podle morfologie a anatomie je klasifikace do řádu řádu brodiví (Ciconiiformes) (Howard *et Moore*, 1991). Dle del Hoyo (1992) jsou plameňáci zařazení do samostatného řádu Phoenicopteriformes, jak je vidět na zařazení plameňáka karibského do systému:

Říše:	živočichové (Animalia)
Kmen:	strunatci (Chordata)
Podkmen:	obratlovci (Vertebrata)
Třída:	ptáci (Aves)
Řád:	plameňáci (Phoenicopteriformes)
Čeleď:	plameňákovití (Phoenicopteridae)
Rod:	plameňák (<i>Phoenicopterus</i>)
Druh:	plameňák karibský (<i>Phoenicopterus ruber</i>)

Už jen z pohledu anatomické stavby těla a ekologie je zařazení plameňáků problematické. Plameňáci a čápi mají podobný tvar pánve a žeber, zatímco s volavkami mají plameňáci podobné proteiny obsažené ve vaječném bílku. Na druhou stranu ovšem lze nalézt další aspekty zahrnující chování, zejména chování mláďat, hlasové projevy a ektoparazity, které plameňáky spojují spíše s vrubozobými (Anseriformes), zvláště s husami (del Hoyo *et al.*, 1992).

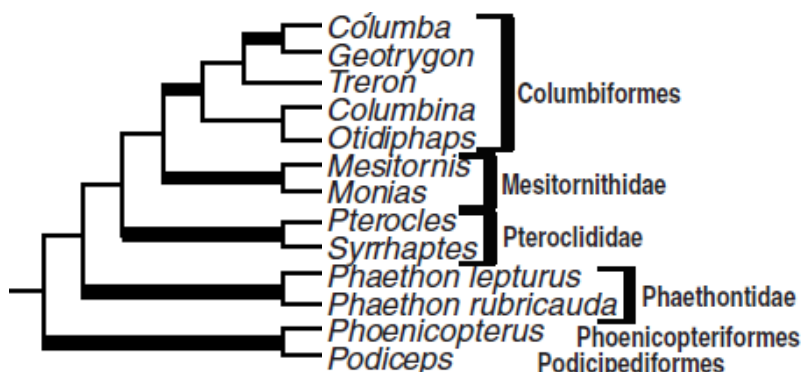
Kromě posuzování morfologie byla do hodnocení příbuznosti různých čeledí zařazena v osmdesátých letech i molekulární data. K významné změně uspořádání systému ptáků došlo na základě DNA-DNA hybridizace (Sibley *et al.*, 1988). Třída ptáci (Aves) zde byla rozdělena na dvě infratřídy, Eoaves a Neoaves a systematické zařazení čeledě plameňákovití bylo následující:

Třída:	ptáci (Aves)
Infratřída:	Neoaves
Parvtřída:	Passerae
Nadřád:	Passerimorphae
Řád:	brodiví (Ciconiiformes)
Podřád:	Ciconii
Infrařád:	Ciconiides
Parvřád:	Ciconiida
Nadčeleď:	Phoenicopteroida
Čeleď:	Phoenicopteridae

Do parvřádu Ciconiida byly zařazeny nadčeledi zahrnující skupiny ptáků tradičně řazené do řádů brodiví, plameňáci, potáplice, trubkonosí, tučňáci a veslonozí. Jednalo se například o kladivouše afrického (*Scopus umbretta*) a zástupce čeledi volavkovití (Ardeidae), plameňákovití (Phoenicopteridae), ibisovití (Threskiornithidae), čápoovití (Ciconiidae), pelikánovití (Pelecanidae), fregatkovití (Fregatidae), tučňákovití (Spheniscidae), potáplicovití (Gaviidae) a buňňákovití (Procellariidae) (Sibley *et al.*, 1988).

V rámci jiné studie Hackett *et al.* (2008) porovnávali asi 32 kilobází sekvencí jaderné DNA v 19 nezávislých lokusech 169 druhů ptáků, kde byly zařazeny všechny hlavní klady pěvců a téměř všechny čeledi ostatních ptačích řádů. Na základě této studie byli plameňáci (Phoenicopteriformes) zařazeni jako sesterská skupina potápek (Podicipediformes). Dalšími skupinami kladu zahrnujícího potápky a plameňáky byli faetonovití (Phaethontidae), stepokurovití (Pteroclididae), mesitovití (Mesitornithidae) a měkkozobí (Columbiformes) jak je znázorněno na obrázku č. 1.

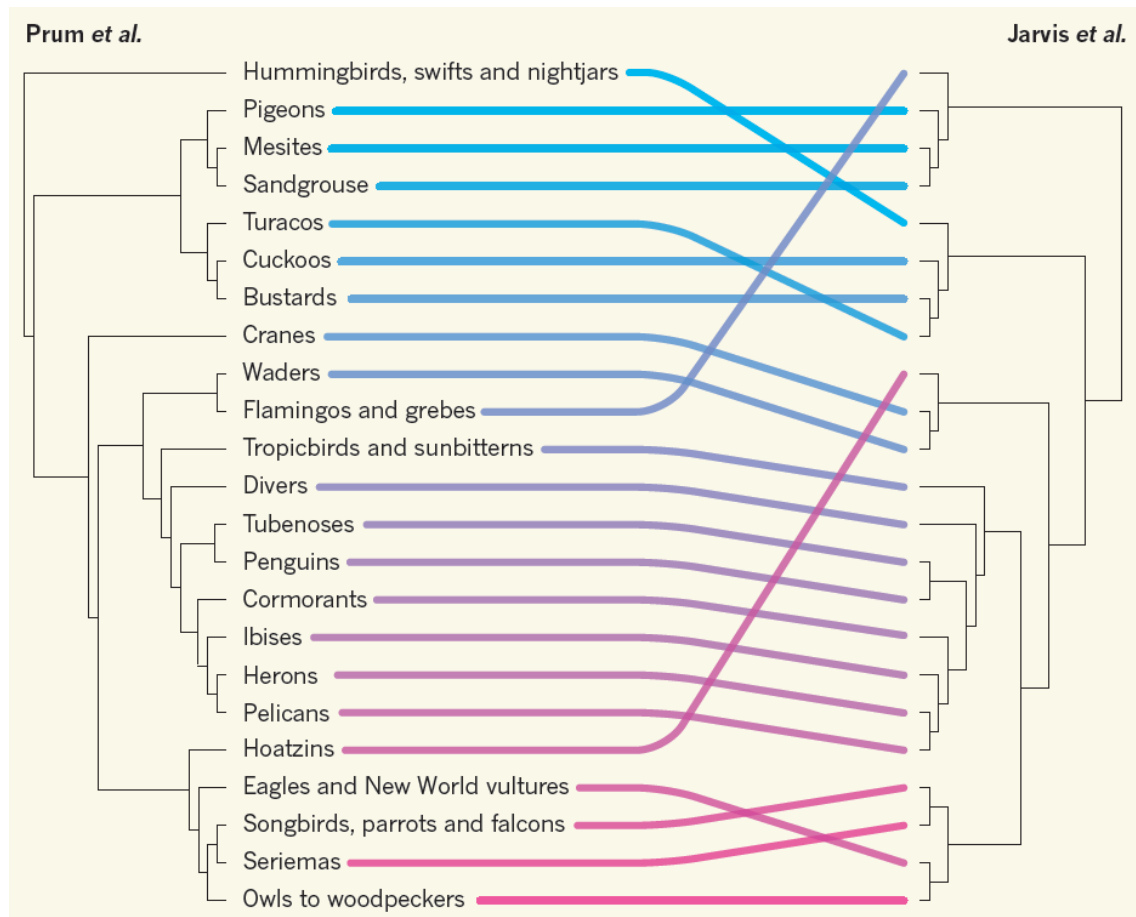
Obrázek č. 1: Výřez kladu zahrnujícího plameňáky ze systému sestaveného Hackett *et al.* (2008).



Yuri *et al.* (2013) použili pro analýzu vzájemné porovnání více než 12 tisíc mezer a jim odpovídajících bazí v porovnávaných sekvencích napříč druhy a jejich výsledky potvrdily stejné vztahy mezi plameňáky a ostatními skupinami znázorněnými v obrázku č. 1 jako předchozí studie.

Jarvis *et al.* (2014) provedli celogenomovou fylogenetickou analýzu 48 druhů ptáků představujících všechny řády kladu Neoaves. V rámci této studie zůstali plameňáci sesterskou skupinou potápek, ale ze společného kladu zahrnujícího i měkkozobé byli oproti předchozí studii vyřazeni faetoni (Phaethontiformes), kteří byli zařazeni k ostatním vodním ptákům jako sesterská skupina ke slunatcům (Eurypygiiformes).

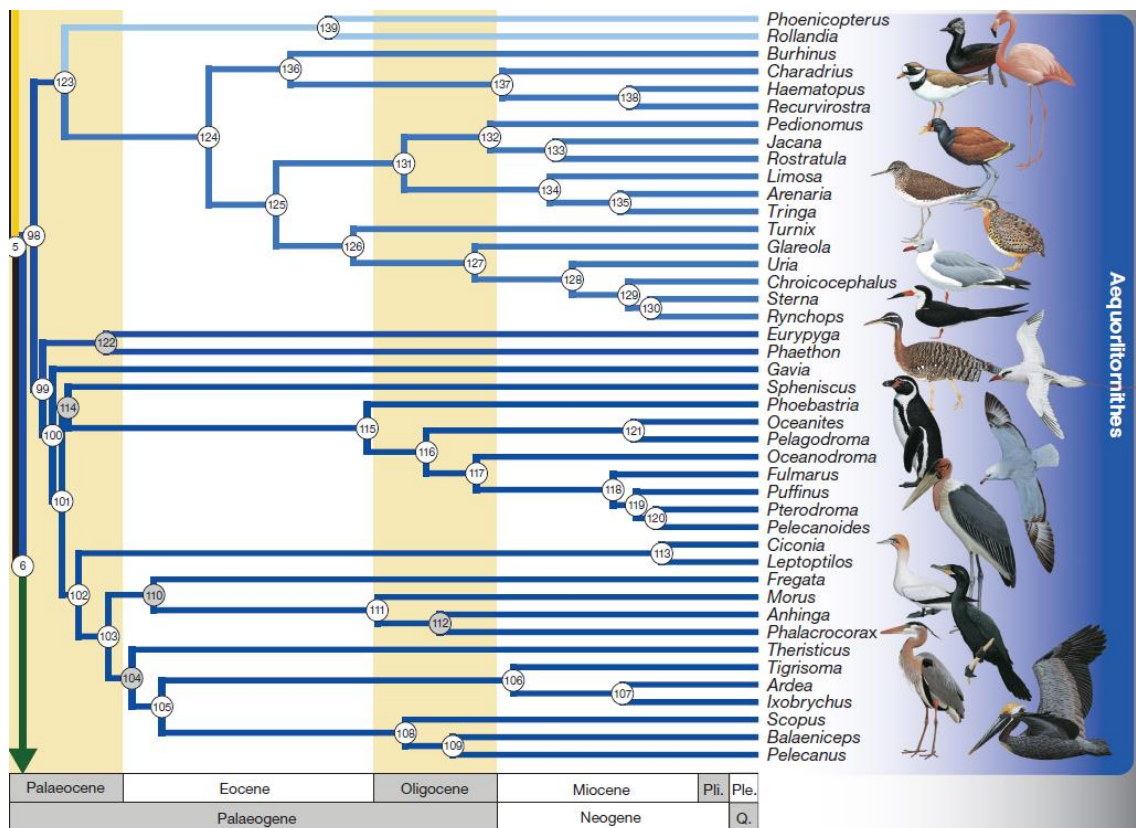
Obrázek č. 2: Srovnání taxonomické klasifikace ptáků podle Prum *et al.* (2015) a Jarvis *et al.* (2014) (Thomas, 2015).



Jak je patrné z obrázku č. 2, Prum *et al.* (2015) významně změnili zařazení plameňáků a potápek oproti předchozím studiím (Hackett *et al.*, 2008; Yuri *et al.*, 2013; Jarvis *et al.*, 2014). V této studii Prum *et al.* (2015) využili 390 kilobází genomických sekvenčních dat od 198 druhů ptáků reprezentujících 122 čeledí ze všech 40 ptačích řádů. V rámci tohoto pojetí systému ptáků se objevuje nový klad Aequirornithes, který

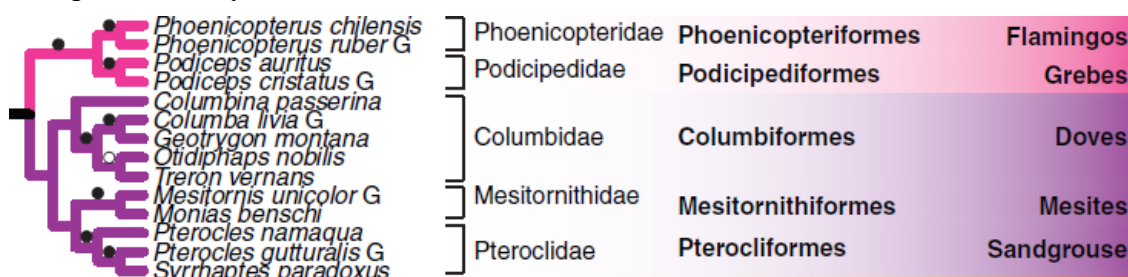
zahrnuje všechny vodní ptáky kromě vrubozobých (Anseriformes). Klad Aequorlornithes je tvořen dvěma sesterskými skupinami. V první skupině jsou zahrnutí plameňáci (Phoenicopteriformes), potápky (Podicipediformes) a dlouhokřídli (Charadriiformes). Druhá skupina zahrnuje slunatce (*Eurypyga helias*), kagu chocholatého (*Rhynochetos jubatus*) a faetony (Phaethontiformes), kteří byli dříve řazeni do společného kladu s plameňáky (Hackett *et al.*, 2008), dále potáplíce (Gaviiformes), tučňáky (Sphenisciformes), trubkonosé (Procelariiformes), brodivé (Ciconiiformes) a veslonohé (Pelecaniformes).

Obrázek č. 3: Klad Aequorlornithes (Prum *et al.*, 2015).



Reddy *et al.* (2017) použili pro svou studii 54 lokusů nekódujících sekvencí DNA 235 druhů ptáků. Výsledky tohoto výzkumu opět potvrdily zařazení plameňáků a potápek jako společnou sesterskou skupinu ke kladu měkkozobých, mesitů a stepokurů, kam je řadili i Hackett *et al.* (2008), Yuri *et al.* (2013) a Jarvis *et al.* (2014). Rozdílem oproti zmíněným předchozím studiím ovšem je, že faetony Reddy *et al.* (2017) ponechali jako sesterskou skupinu ke slunatcům a kagu ve společné samostatné větvi, ale odděleně od plameňáků. Skupinu vodních ptáků zde tvoří potáplíce, tučňáci, trubkonosí a veslonozí, mezi něž jsou zde zařazeny i čeledi tradičních brodivých. Dlouhokřídli jsou v tomto pojetí systému od komplexu výše jmenovaných skupin odděleni jako samostatná větev.

Obrázek č. 4: Taxonomická skupina zahrnující plameňáky a potápky a k nim sesterský klad ptáků (Reddy *et al.*, 2017).



1.1.1 Řád plameňáci

Řád plameňáci (Phoenicopteriformes) obsahuje pouze čeleď plameňákovití (Phoenicopteridae), do které je řazeno 6 druhů ve třech rodech (Winkler *et al.*, 2015). Plameňáci jsou díky svým pozoruhodně dlouhým nohám a krku, výraznému růžovému opeření a specifickému dolů zahnutému zobáku adaptovanému pro filtrování potravy zcela nezaměnitelní. Jsou to velcí vodní ptáci vysocí 80–145 cm, přičemž samci jsou stejně velcí nebo i větší než samice (del Hoyo *et al.*, 1992). Peří mají zbarvené v kombinaci růžové, karmínové a bílé barvy, letky mají černé. Křídla jsou krátká, úzká a špičatá, ocas je krátký. Tělo je oválné a hlava poměrně malá ve srovnání s dlouhým krkem (del Hoyo *et al.*, 1992). Zobák mají silný, ostře zahnutý dolů s černou špičkou, uvnitř je široký pás lamel a silný jazyk, který přes lamely protlačuje vodu (Winkler *et al.*, 2015). Nohy mají chůdovité, štíhlá chodidla, zadní prst je redukován a přední prsty srostlé plovací blánou. Jsou rychlí letci, při letu mají krk natažen a nohy táhnou za tělem. V případě potřeby jsou to velmi dobří plavci (Gosler, 1994).

Plameňáci osídlují velká mělká jezírka a laguny od pobřeží až k vysokohorským údolím. Vody, které plameňáci obývají, jsou často až extrémně slané. Tyto drsné osmotické podmínky umožňují plameňákům prosperovat v hojném počtu, protože se v těchto lokalitách často vůbec nevyskytují predátoři (Winkler *et al.*, 2015). Plameňáci jsou částečně tažní (Gosler, 1994).

Potravu plameňáků tvoří řada malých vodních bezobratlých - drobní korýši, měkkýši, hmyz a planktonní organismy (Winkler *et al.*, 2015), ale i rostlinný materiál - řasy a rozsivky (del Hoyo *et al.*, 1992). Potravu získávají filtrací z vody tak, že sehnou hlavu, aby zobák směřoval horizontálně dozadu. čerpají vodu a bahno opakovaně dovnitř a ven 5–6x za sekundu (del Hoyo *et al.*, 1992). S použitím velkého masitého jazyku tlačí vodu a bláto přes hřebenovité lamely zobáku (Gosler, 1994; Winkler *et al.*, 2015). Občas se živí větší kořistí tak, že ji uchopí zobákem a hodí si ji dovnitř (Winkler *et al.*, 2015).

Plameňáci jsou monogamní a žijí v obrovských koloniích (del Hoyo *et al.*, 1992; Gosler, 1994; Winkler *et al.*, 2015). Hnízdo staví na bahnitě lokalitě nebo v solných pánvích z hlíny tak, že vytvoří úzký kužel bahna s mělkou prohlubeninou nahoře. V obzvláště velkých koloniích může být až pět hnízd na metr čtvereční (Winkler *et al.*, 2015). Plameňáci hnízdí jednou ročně. Samice klade 1–2 bílá vejce, na kterých sedí oba partneři asi 28 dní (Gosler, 1994). Ve věku od 5 do 12 dnů mláďata opouštějí hnízda, po čtyřech až šesti týdnech mohou samostatně přijímat potravu, ale jsou dokrmována až do věku 10–12 týdnů (Winkler *et al.*, 2015).

Rod *Phoenicopterus* zahrnuje tři druhy. Plameňák karibský (*P. ruber*) a plameňák růžový (*P. roseus*) byli dříve považováni za dva poddruhy druhu *P. ruber* (del Hoyo *et al.*, 1992). Plameňák růžový žije v oblasti od jižního Španělska, jižní Francie až do Kazachstánu a na jihu od západní Afriky přes severní a východní Afriku podél pobřeží až k jihu Afriky a přes střední východ do Indie a na Srí Lanku zatímco plameňák karibský žije v Karibiku a na Galapágách. Třetím druhem rodu *Phoenicopterus* je plameňák chilský (*P. chilensis*), který žije od Peru na jih přes Andy až do Ohňové země a východně do jižní Brazílie a Uruguaye (del Hoyo *et al.*, 1992).

Rod *Phoeniconaias* zahrnuje pouze jeden druh. Plameňák malý (*P. minor*) žije v oblasti Velké příkopové propadliny na východě Afriky a další tři méně početné populace žijí v oblasti Namibie a Botswany, Mauritanie a Senegalu a severozápadní Indie a Pákistánu (del Hoyo *et al.*, 1992).

Rod *Phoenicoparrus* zahrnuje dva druhy a to plameňáka andského (*P. andinus*) a plameňáka Jamesova (*P. jamesi*). Oba druhy se vyskytují omezeně ve vysokých Andách, od jižního Peru přes západní Bolívii po severní Chile a severozápadní Argentinu. Plameňák Jamesův má nejlokálněji omezené rozšíření, vyskytuje se pouze v oblasti 15–26° j. š. (del Hoyo *et al.*, 1992).

Ačkoliv všechny druhy plameňáků žijí ve velkých populacích, některé druhy (4 ze 6 druhů) mají klesající početnost. Plameňák andský (*Phoenicoparrus andinus*) je považován za zranitelný (vulnerable) z důvodu tlaků způsobených degradací stanovišť důlní činností a erozí, disturbancí ze strany lidí a nadměrným lovem. Plameňák chilský (*Phoenicopterus chilensis*), plameňák (*Phoeniconaias minor*) a plameňák (*Phoenicoparrus jamesi*) také trpí degradací stanovišť a jsou považováni za téměř ohrožené (near threatened) (Winkler *et al.*, 2015).

1.1.2 Plameňák karibský

Plameňák karibský (*Phoenicopterus ruber*) je s výškou 120–145 cm, hmotností 2,1–4,1 kg a rozpětím křídel 140–165 cm jedním z největších plameňáků. Samice je až o 20 % menší a má kratší nohy. Peří je oproti ostatním plameňákům tmavší, karmínové, juvenilní jedinci mají peří šedé. Zobák je karmínový, od poloviny přechází v černou špičku a na bázi je světlý, což je zřetelné i z obrázku č. 5 (del Hoyo *et al.*, 1992).

Obrázek č. 5: Dva jedinci plameňáka karibského v Zoologické zahradě Liberec (foto: Milan Šulák).



V oblasti Mexika hnízdí v květnu, na Bahamách hnízdí od března do června. Na Galapágách tvoří malé kolonie čítající pouze 3–50 párů. Hnízdo tvoří obvyklý kužel bahna s mělkou miskou na vrcholu, ale na skalnatých ostrovech tvoří hnízdo i jen hromádka kamenů a suti. Mláďata se líhnou po 27–31 dnech podobně jako u jiných druhů plameňáků. Jedinci jsou pohlavně dospělí obvykle v 5–6 letech, někdy i dříve. Nejstarší a stále hnízdící kroužkovaný jedinec byl starý 33 let a nejstarší chovaný jedinec byl starý 44 let (del Hoyo *et al.*, 1992).

Z pohledu ochrany druhů má plameňák karibský dle IUCN statut málo dotčený (least concern), jeho populace čítá 260–330 tisíc dospělých jedinců a populační trend je rostoucí (Anonymous, 2018).

1.2 Molekulárně genetické charakteristiky populací

Molekulární markery jsou cenným nástrojem pro charakterizaci a hodnocení genetické rozmanitosti uvnitř druhů, mezi populacemi i mezi druhy. Existují dvě měřítka kvality nebo informativnosti polymorfismu genetického markeru: heterozygotnost (H) a polymorfní informační obsah (PIC) (Nagy *et al.*, 2012).

Heterozygotnost (H) je podíl heterozygotních jedinců v populaci. Používá se jako měřítko genetické variability (Snustad *et Simmons*, 2017).

Polymorfní informační obsah (PIC) označuje hodnotu markeru pro detekci polymorfismu v populaci v závislosti na počtu detekovatelných alel a distribuci jejich frekvencí; tak poskytuje odhad diskriminační síly markeru (Nagy *et al.*, 2012).

Hardy-Weinbergův zákon je matematický vztah, který umožňuje předpovědět genotypové četnosti v populaci z příslušných alelových četností (Snustad *et Simmons*, 2017). Předpokládá nejjednodušší model populace, ve které dochází k náhodnému oplození (panmiktická populace) a nejsou zde přítomny žádné faktory, které by způsobily genetickou změnu z generace na generaci. Tento model je založen na Mendelově segregaci pro diploidní organismy, které se rozmnožují pohlavně se základními principy pravděpodobnosti. Tyto principy platí stejně prakticky pro všechny druhy živočichů i rostlin, které splňují zmíněné podmínky. Mezi konkrétní předpoklady pro platnost Hardy-Weinbergova zákona v populaci patří náhodné oplození, velmi velká (ideálně nekonečně velká) velikost populace, neexistence mutací, přírodní selekce a migrace (Allendorf *et al.*, 2012).

Jestliže mají alely A a a četnosti p , respektive q , pak ve velké populaci s náhodným oplozením a bez selekce jsou četností tří možných genotypů p^2 (AA), $2pq$ (Aa) a q^2 (aa) (Snustad *et Simmons*, 2017). Rovnice Hardy-Weinbergova principu tedy vypadají následovně:

$$p + q = 1 \quad \text{a} \quad p^2 + 2pq + q^2 = 1,$$
$$\text{respektive} \quad (p + q)^2 = p^2 + 2pq + q^2.$$

Nulová alela je neamplifikující se varianta mikrosatelitu, která díky mutaci není komplementární obvykle s jedním z primerů pro svou amplifikaci, takže se během PCR

neamplifikuje. V případě diploidních organismů heterozygotní konstituce jsou tyto nesprávně hodnoceny jako homozygoti (Dakin *et* Avise, 2004).

1.3 Repetitivní DNA

Genom každého organismu tvoří kódující a nekódující DNA. Na rozdíl od DNA prokaryotických organismů, molekuly DNA eukaryot obsahují nekódující DNA, tedy DNA, která nekóduje informaci pro syntézu bílkovin nebo specifických RNA (Snustad *et* Simmons, 2017). Tvoří hlavní podíl veškeré jaderné DNA ve většině eukaryotních genomů (Mehrotra *et* Goyal, 2014; Biscotti *et al.*, 2015). Tato nekódující DNA je tvořena uvnitř genů lokalizovanými introny a mimo geny velkým množstvím repetitivní DNA (Campbell *et* Reece, 2006). Repetitivní DNA jsou sekvence, které se v genomu vyskytují ve více kopiích - někdy milionkrát i vícekrát (Snustad *et* Simmons, 2017). Repetitivní sekvence mohou být specifické pro určitý druh nebo i rod (Mehrotra *et* Goyal, 2014). Vysoce repetitivní sekvence DNA jsou umístěny hlavně v oblastech centromer eukaryotických chromozomů, další se nacházejí na chromozomových ramenech (Snustad *et* Simmons, 2017). Mezi dva typy repetitivní DNA patří rozptýlená DNA a tandemová repetitivní DNA (Bennett, 2000).

1.3.1 Rozptýlená repetitivní DNA

Rozptýlená repetitivní DNA je lokalizována roztroušeně v celém genomu a jeden takový úsek rozptýlené repetitivní DNA je dlouhý asi 100–1000 párů bází (Campbell *et* Reece, 2006). Mnoho rozptýlených repetitivních sekvencí DNA má schopnost měnit svou polohu v genomu a tyto transponovatelné genetické elementy (transpozony) převažují v mnoha eukaryotických genomech (Snustad *et* Simmons, 2017). Mezi rozptýlenou repetitivní DNA patří dlouhé LINEs (dlouhé rozptýlené jaderné repetice) a krátké SINEs (krátké rozptýlené jaderné repetice) rozptýlené jaderné elementy (Bennett, 2000).

1.3.2 Tandemová repetitivní DNA

Oproti rozptýlené repetitivní DNA v případě tandemové repetitivní DNA jsou jednotky repetice umístěny bezprostředně za sebou (Campbell *et* Reece, 2006). Tandemové repetice často tvoří jedinečné struktury v oblasti telomer eukaryotických chromozomů (Snustad *et* Simmons, 2017). Rozdělení tandemových repetitivních DNA není jednotné a u různých autorů se liší (Bennett, 2000; Tóth *et al.*, 2000; Weising *et al.*, 2005), ale obecně se objevuje rozdělení na satelity, minisatelity a mikrosatelity podle délky jednotky opakování (Bennett, 2000; Mehrotra *et* Goyal, 2014).

Satelity

Tandemové repetice s nejdelší jednotkou opakování jsou satelity, které mají délku monomerní jednotky v řádu stovek párů bází (bp). Sekvence satelitní DNA jsou považovány za rychle se vyvíjející složku eukaryotických genomů, zahrnující tandemově uspořádané, vysoce repetitivní a vysoce konzervované monomerní sekvence (Mehrotra *et Goyal*, 2014) a celková délka satelitu může být v rozmezí od 100 kbp do několika Mbp (Bennett, 2000). V lidské DNA jsou satelity lokalizovány v heterochromatinu, hlavně v centromerách a nejsou transkribovány (Bennett, 2000).

Minisatelity

Jednotka repetice minisatelitové DNA je dlouhá v řádu desítek bp a celková délka minisatelitu je v rozmezí 100 bp až 20 kbp. Minisatelity se rozlišují na telomerické a hypervariabilní. Telomerické minisatelity jsou dlouhé 10–15 kbp a skládají se z hexanukleotidů (v lidském genomu hlavně TTAGGG). Tyto hexanukleotidové repetice bývají přidány na telomerách všech chromozomů pomocí enzymu telomerázy a hrají roli při párování a orientaci chromozomů během buněčného dělení.

Druhým typem minisatelitových sekvencí je hypervariabilní minisatelitová DNA s jednotkou repetice dlouhou od 6 do více než 50 párů bází obvykle s vysokým polymorfismem mezi jedinci. Tento typ repetitivní DNA je také známý jako VNTRs (variabilní počet tandemových opakování) (ačkoliv podle jiné definice patří mezi VNTRs i satelity a mikrosatelity) (Bennett, 2000). Z důvodu vysokého polymorfismu jsou minisatelity používány pro DNA profilování a DNA fingerprinting (Jeffreys *et al.*, 1985; Bennett, 2000).

Mikrosatelity

Třetím typem s nejkratší jednotkou repetice jsou mikrosatelity, které mají jednotku opakování dlouhou do deseti párů bází, někdo uvádí délku 1–6 bp (Tóth *et al.*, 2000; Zane *et al.*, 2002; Oliveira *et al.*, 2006), podle jiných zdrojů je to 1–5 bp (Bennett, 2000; Snustad *et Simmons*, 2017). Celková délka repetice je u tohoto typu tandemové repetitivní DNA desítky až stovky bp (Bennett, 2000). Mikrosatelity jsou známé také pod zkratkou SSRs (opakování jednoduchých sekvencí / jednoduché opakující se sekvence) nebo STRs (krátká tandemová opakování) a vyskytují se v prokaryotických i eukaryotických genomech (Tóth *et al.*, 2000; Zane *et al.*, 2002). Mikrosatelity jsou

charakteristické tím, že podléhají mutacím častěji než jiné oblasti genomu, a proto bývají používány jako molekulární markery (Oliveira *et al.*, 2006).

Podle délky jednotky repetice se mikrosatelity rozlišují na mono-, di-, tri-, tetra-, penta- a hexanukleotidové, přičemž nejčastěji se vyskytují mononukleotidové a dinukleotidové mikrosatelity. Z mononukleotidových repetic jsou častější poly(A)/poly(T) než poly(C)/poly(G), nejčastějším dinukleotidovou jednotkou u živočichů je AC/TG a u rostlin a hub je to AT/TA. V rámci exonů jsou nejčastější trinukleotidové mikrosatelity AAT/TTA. Z hlediska tetranukleotidů jsou nejčastějšími jednotkami opakování AAAT/TTTA, AAAC/TTTG a AAAG/TTTC a podobně i nejčastějším pentanukleotidovým motivem je AAAAN/TTTTN (kde N znamená libovolnou bázi). Hexanukleotidové mikrosatelity jsou variabilnější a častěji se v nich vyskytují nukleotidy C a G (Tóth *et al.*, 2000).

Podle typu opakované sekvence se mikrosatelity rozlišují na dokonalé, nedokonalé, přerušené a složené. U dokonalých mikrosatelitů není opakující se sekvence přerušena jinou sekvencí (např. TATATATATATATATA), zatímco u nedokonalých mikrosatelitů je opakující se sekvence přerušena párem bází (např. TATATATACTATATA). V případě přerušených mikrosatelitů je opakující sekvence přerušena jinou krátkou sekvencí (např. TATATACCGTGTTATATATATA). Složený mikrosatelit je tvořen sousedními na sebe navazujícími opakujícími se sekvencemi (např. TATATATATAGTGTGTGTGTGT) (Oliveira *et al.*, 2006).

1.4 Mikrosatelity u plameňáka karibského

Hledání mikrosatelitů *de novo* u plameňáka karibského se věnovaly dvě dizertační práce (Kapil, 2005; Preston, 2005). Kapil (2005) našel v rámci své dizertační práce 6 mikrosatelitů (Pru μ 1–Pru μ 6). Další 7 mikrosatelitů (Pru μ 7–Pru μ 13) našla Preston (2005), ale z těchto jsou pouze 2 lokusy unikátní, protože dvojice primerů Pru μ 7–Pru μ 12 amplifikují totožný mikrosatelit (Drobek, 2010).

V Laboratoři populační genetiky Katedry buněčné biologie a genetiky PřF UPOL bylo dosud testování a/nebo charakteristice mikrosatelitů pro plameňáka karibského věnováno několik bakalářských a diplomových prací (Drobek, 2008; Drobek, 2010; Matošková, 2011; Buržáková, 2013; Strejčková, 2016; Zlochová, 2017; Strejčková, 2018). Ne všechny práce se věnovaly testování i charakteristice mikrosatelitů, ale některé diplomové práce navazovaly na předchozí bakalářské práce v rámci Laboratoře populační

genetiky. Celkem bylo nalezeno 152, po korekci 149 nezávislých polymorfních mikrosatelitů. Drobek (2010) zjistil, že mikrosatelity publikované v práci Preston (2005), Prum7, Prum8 a Prum9, jsou jedním lokusem, pro který Preston (2005) navrhla tři páry primerů. Na základě testování Drobek (2010) vybral ze zmíněných tří lokusů pro další analýzy Prum8, protože byl nejlépe hodnotitelný a vykazoval nejnižší pravděpodobnost výskytu nulové alely. Strejčková (2018) zjistila na základě analýz programy Cervus 3.0.6 (Kalinowski *et al.*, 2007) a Genepop 4.1 (Rousset, 2008), že jsou lokusy RBG29 od racka novozélandského (Given *et al.*, 2002) a Parm01 od buňáčka trinidadského (Brown *et al.*, 2009) ve vazbě. Dále sekvence těchto mikrosatelitů porovnála programem BLASTN 2.8.0 (Altschul *et al.*, 1997) a došla k závěru, že se jedná o tentýž mikrosatelitový lokus, který byl u dvou různých druhů nezávisle popsán pod různými názvy. Vzhledem k podmínkám PCR amplifikace a elektroforetické separace PCR produktů a charakteru elektroforetogramů těchto dvou mikrosatelitů Strejčková (2018) vybrala jako vhodný pro další genetické analýzy u plameňáka karibského z této dvojice lokus RBG29.

Ze 149 nezávislých polymorfních mikrosatelitů bylo v Laboratoři populační genetiky charakterizováno a analyzováno celkem 126 nezávislých unikátních mikrosatelitů. Drobek (2010) charakterizoval ve své diplomové práci celkem 41 nezávislých polymorfních mikrosatelitů pro plameňáka karibského. Buržáková (2013) v rámci své diplomové práce pro plameňáka karibského charakterizovala celkem 42 polymorfních *cross-species* mikrosatelitů. Strejčková (2018) ve své diplomové práci charakterizovala na DNA 30 nepříbuzných jedinců plameňáka karibského celkem 44 polymorfních *cross-species* mikrosatelitů. Tyto diplomové práce obvykle navazovaly na předchozí bakalářské práce, jak je podrobněji zmíněno dále v textu.

V rámci své bakalářské práce Drobek (2008) testoval 70 lokusů od druhů z řádů brodiví (Ciconiiformes - v tradičním pojetí), veslonozí (Pelecaniformes - v tradičním pojetí) a potápky na DNA 6 nepříbuzných jedinců plameňáka karibského a našel celkem 10 polymorfních mikrosatelitů. V diplomové práci se Drobek (2010) kromě nalezených 10 polymorfních mikrosatelitů zaměřil i na testování dalších 224 lokusů od druhů z řádů brodiví (v tradičním pojetí), veslonozí (v tradičním pojetí), vrubozobí, potáplice, dlouhokřídlí, plameňáci a tučňáci, ze kterých vybral a charakterizoval 31 nezávislých polymorfních lokusů. Úspěšnost amplifikace nezávislého polymorfního lokusu ze všech 294 testovaných mikrosatelitů byla asi 13,9 %.

Matošková (2011) ve své bakalářské práci testovala celkem 78 lokusů od druhů z řádu plameňáci, veslonozí a brodiví na DNA 6 nepříbuzných jedinců plameňáka karibského. Jako polymorfni označila celkem 35 mikrosatelitů a úspěšnost amplifikace polymorfního mikrosatelitu zde tedy byla asi 44,9 %. Takto vysoká pravděpodobnost amplifikace polymorfního lokusu je způsobená skutečností, že se z části jednalo o mikrosatelity odvozené od sesterského druhu, plameňáka růžového (*Phoenicopterus roseus*).

Buržáková (2013) se věnovala analýze a charakteristice mikrosatelitů, které Matošková (2011) označila za polymorfni, na DNA 30 nepříbuzných jedinců. Z původních 35 lokusů charakterizovala celkem 33 polymorfni mikrosatelitů, protože jeden označila za monomorfni a jeden jako nehodnotitelný. Dále Buržáková (2013) testovala 11 lokusů od volavky rusohlavé a 8 mikrosatelitů od čápa východního, které do té doby nebyly na DNA plameňáka karibského testovány. Z těchto 19 nových lokusů charakterizovala na DNA 30 nepříbuzných jedinců plameňáka karibského 5 polymorfni mikrosatelitů. Buržáková (2013) také testovala na DNA 5 nepříbuzných jedinců plameňáka karibského lokusy, které byly označeny za polymorfni u plameňáka růžového (Drobek, 2010; Manišová, 2011), ale u plameňáka karibského byly označeny za monomorfni (Drobek, 2010; Matošková, 2011). Celkem se jednalo o 16 testovaných mikrosatelitů, ze kterých 4 lokusy Buržáková (2013) označila za polymorfni a charakterizovala je na DNA 30 nepříbuzných jedinců plameňáka karibského.

Ve své bakalářské práci se Strejčková (2016) věnovala testování 213 lokusů na DNA 6 nepříbuzných jedinců plameňáka karibského. Jednalo se o 207 mikrosatelitů objevených *de novo* od jedinců z řádu trubkonosí a o 6 *cross-species* mikrosatelitů, které byly polymorfni u jedinců z řádu trubkonosí, ale původně byly objeveny u zástupců řádu dlouhokřídlí a pěvci. Z 213 testovaných lokusů Strejčková (2016) našla 50 polymorfni *cross-species* mikrosatelitů. Z těchto 50 mikrosatelitů v rámci své diplomové práce Strejčková (2018) označila 5 lokusů za monomorfni a jeden (Parm01) vyřadila z důvodu vazby s jiným lokusem (RBG29). Úspěšnost amplifikace nezávislého polymorfni lokusu tedy byla asi 20,7 %.

Zlochová (2017) ve své bakalářské práci našla celkem 23 *cross-species* polymorfni mikrosatelitů. Celkem testovala pomocí *cross-species* PCR amplifikace 171 párů primerů, z nichž 113 lokusů bylo odvozeno od 9 druhů z řádu tučňáci, 58 párů primerů

bylo určeno pro amplifikaci 33 EST ptačích mikrosatelitů a 24 konzervovaných ptačích mikrosatelitů. Z nalezených 23 polymorfních lokusů bylo 16 z řádu tučňáci, 3 EST ptačí mikrosatelity a 4 konzervované ptačí mikrosatelity. Úspěšnost amplifikace polymorfního lokusu tedy byla 14,2 % pro mikrosatelity z řádu tučňáci, 8,8 % pro EST ptačí mikrosatelity a 16,7 % pro konzervované ptačí mikrosatelity. Těchto 23 nalezených mikrosatelitů bude analyzováno a charakterizováno v rámci mé diplomové práce.

2 Cíle práce

1. Vypracování rešerše na téma diplomové práce.
2. Shromáždění dostupných literárních zdrojů.
3. PCR amplifikace DNA plameňáka karibského s využitím *cross-species* primerů pro vybrané polymorfní mikrosatelity, které jsou známé u ptáků z řádu tučňáci a konzervované ptačí mikrosatelity a byly popsány v bakalářské práci Zlochová, A. (2017): *Cross-species* amplifikace mikrosatelitů z řádu tučňáci a konzervovaných ptačích mikrosatelitů u plameňáka karibského (*Phoenicopterus ruber*). Bakalářská práce (Dep. in: Knihovna Biologických oborů PřF UP v Olomouci).

3 Materiál a metody

3.1 Biologický materiál

Biologický materiál pro praktickou část této diplomové práce byl získán ze Zoologické zahrady Dvůr Králové a Zoologické zahrady Liberec. Krev pro izolaci DNA byla odebrána třiceti nepříbuzným jedincům plameňáka karibského (*Phoenicopterus ruber*) pracovníky ZOO. Fenol-chloroformovou metodou byla školitelem izolována DNA a následně byly vzorky naředěny TE pufrům tak, aby výsledné koncentrace genomické DNA byly v rozmezí 10–50 µg/ml.

3.2 Testované primery

Celkem bylo pro *cross-species* PCR amplifikaci na DNA třiceti respektive šesti nepříbuzných jedinců plameňáka karibského (*Phoenicopterus ruber*) použito 37 párů primerů pro amplifikaci mikrosatelitů od druhů z řádu tučňáci a konzervovaných ptačích mikrosatelitů. Z těchto bylo použito 23 párů primerů, které amplifikovaly polymorfni produkt u šesti nepříbuzných jedinců v rámci bakalářské práce Zlochové (2017). Dva další univerzální ptačí mikrosatelity, které Zlochová (2017) netestovala (TG01-086 a TG09-014), byly testovány PCR amplifikací na DNA 6 nepříbuzných jedinců.

Dále byly testovány u šesti nepříbuzných jedinců plameňáka karibského 4 lokusy z řádu tučňáci a 8 univerzálních ptačích mikrosatelitů. Tyto lokusy vykazovaly polymorfismus na DNA 6 nepříbuzných jedinců plameňáka růžového (*Phoenicopterus roseus*) v rámci bakalářské práce Klaclové (2018). Polymorfismus u šesti jedinců plameňáka karibského vykazovaly 2 lokusy a ty byly dále testovány na DNA 30 nepříbuzných jedinců plameňáka karibského.

Dvacet z celkových 37 párů primerů použitých pro PCR amplifikaci pocházelo od 7 druhů z řádu tučňáci a jejich podrobný seznam je uveden v tabulce č. 1. Deset párů primerů použitých pro amplifikaci EST mikrosatelitů a 7 párů primerů amplifikujících konzervované ptačí mikrosatelity je uvedeno v tabulce č. 2.

Tabulka č. 1: Seznam mikrosatelitů testovaných na plameňákovi karibském pocházejících od druhů řádu tučňáci.

Zdrojový druh	Název lokusu	Literární zdroj
tučňák žltorohý (<i>Eudyptes chrysolophus</i>)	Ech005, Ech009, Ech011, Ech024, Ech030, Ech039	Ahmed <i>et al.</i> , 2009
tučňák nejmenší (<i>Eudyptula minor</i>)	Emm5 Em2, Em8, Em9, Em23	Billing <i>et al.</i> , 2007 Grosser <i>et Waters</i> , 2015
tučňák žlutooký (<i>Megadyptes antipodes</i>)	Man27, Man47, Man55	Boessenkool <i>et al.</i> , 2008
tučňák kroužkový (<i>Pygoscelis adeliae</i>)	RM6	Roeder <i>et al.</i> , 2001
tučňák uzdičkový (<i>P. antarctica</i>)	Pygantarc07	Kang <i>et al.</i> , 2015
tučňák brýlový (<i>Spheniscus demersus</i>)	B3-2 PNN08	Akst <i>et al.</i> , 2002 Labuschagne <i>et al.</i> , 2013
tučňák Humboldtův (<i>S. humboldti</i>)	Sh1Ca12, Sh2Ca21	Schlosser <i>et al.</i> , 2003

Ve sloupcích tabulky je uveden zdrojový druh, název lokusu a literární zdroj.

Tabulka č. 2: Seznam EST ptačích mikrosatelitů a konzervovaných ptačích mikrosatelitů testovaných na plameňákovi karibském.

Zdroj	Název lokusu	Literární zdroj
EST ptačí mikrosatelity	TG01-086, TG01-148, TG02-120, TG03-002, TG03-035, TG04-041, TG04-061, TG05-030, TG09-014, TG22-001	Dawson <i>et al.</i> , 2010
Konzervované ptačí mikrosatelity	CAM-03, CAM-06, CAM-07, CAM-11, CAM-19, CAM-20, CAM-24	Dawson <i>et al.</i> , 2013

Ve sloupcích tabulky je uveden zdrojový druh, název lokusu a literární zdroj.

3.3 PCR amplifikace mikrosatelitů

Pro testování polymorfismu byla genomická DNA šesti nepříbuzných jedinců plameňáka karibského amplifikována celkem 14 páry primerů, z nichž 2 páry amplifikovaly polymorfni produkt. Pro analýzu a charakteristiku vybraných *cross-species* polymorfni mikrosatelitů byla genomická DNA třiceti nepříbuzných jedinců plameňáka karibského amplifikována celkem 25 páry primerů. Pro každou reakci byl do reakčního PCR mixu použit právě jeden pár primerů. Reakční PCR mix byl připravován pro 6 nebo 30 vzorků a jeho složení je uvedeno v tabulce č. 3.

Tabulka č. 3: Složení reakčního PCR mixu pro amplifikaci šesti, respektive třiceti vzorků DNA.

Složky reakčního PCR mixu	Objem [μ l]	Objem [μ l]
	pro 6 vzorků	pro 30 vzorků
Deionizovaná voda	44,4	222,0; 228,7*; 232,0**
Reakční pufr pro PCR 10x	6,7	33,5
Roztok $MgCl_2$ (25 mmol/l)	4,0	20,0; 13,3*; 10,0**
Roztok dNTPs (20 mmol/l)	0,7	3,5
Primer F (10 μ mol/l)	3,3	16,5
Primer R (10 μ mol/l)	3,3	16,5
<i>aTaq</i> DNA polymeráza (5 U/ μ l)	1,0	5

Ve sloupcích tabulky jsou uvedeny složky reakčního PCR mixu a jejich objemy pro 6 a 30 vzorků.

*Pro mikrosatelit Emm5 byla koncentrace roztoku $MgCl_2$ snížena na 2/3 tak, že byla jeho výsledná koncentrace v reakčním PCR mixu 1,2 mmol/l. Snížení objemu $MgCl_2$ bylo vyrovnáno zvýšením objemu deionizované vody.

**Pro lokus Em23 byla snížena koncentrace roztoku $MgCl_2$ na 1/2. Koncentrace $MgCl_2$ ve finálním reakčním PCR mixu byla tedy 0,9 mmol/l. Snížení objemu $MgCl_2$ bylo opět vyrovnáno zvýšením objemu deionizované vody.

Složky PCR mixu byly uchovány při -20 °C. Před přípravou reakčního PCR mixu byly roztoky rozmrazeny, zvortexovány a zcentrifugovány. Jednotlivé složky byly pipetovány do 1,5ml mikrozkuřavky podle tabulky č. 3 a reakční PCR mix byl následně zvortexován a zcentrifugován.

Genomická DNA šesti, respektive třiceti nepříbuzných jedinců plameňáka karibského byla po 1 μ l napipetována do jednotlivých 0,2ml PCR mikrozkušavek a následně k ní bylo přidáno po 9 μ l reakčního PCR mixu.

Reakční směs v PCR mikrozkušavkách byla vložena do termocykleru, kde probíhala amplifikace podle teplotního a časového nastavení uvedeného v následujícím schématu:

- | | | | |
|----|----------------------------|---|-----|
| 1. | 94 °C.....5 min | } | 35x |
| 2. | 94 °C.....30 s | | |
| | T _a °C.....30 s | | |
| | 72 °C.....30 s | | |
| 3. | 72 °C.....7 min | | |

Jako výchozí teplota *annealingu* pro jednotlivé PCR reakce při testování polymorfismu na DNA 6 nepříbuzných jedinců plameňáka karibského byla použita teplota 50 °C. Pro charakterizování polymorfních lokusů na DNA 30 nepříbuzných jedinců byla použita finální T_a z bakalářské práce Zlochové (2017), případně teplota z optimalizace mého vlastního testování polymorfismu na DNA 6 nepříbuzných jedinců. Pokud bylo potřeba, byla T_a následně upravena (viz Výsledky).

3.4 Zpracování PCR produktů pomocí elektroforetické separace

Následující postup byl optimalizován pro použití vyhřívané sekvenační elektroforetické komůrky S2 (Whatman Biometra) s rozměry skel 33 x 39 cm a 33 x 42 cm a tloušťkou gelu 0,4 mm. Elektroforetická separace probíhala za denaturujících podmínek.

Příprava polyakrylamidového gelu

1. Velké sklo bylo na ploše, které se později měl dotýkat polyakrylamidový gel, omyto deionizovanou vodou a osušeno papírovými utěrkami. Následně bylo sklo dvakrát omyto 96% ethanolem a vždy osušeno papírovými utěrkami. Čisté sklo bylo na ploše, která později přijde do kontaktu s polyakrylamidovým gelem, ošetřeno přípravkem odpuzujícím vodu (Rain off - tekuté stěrače). Po zaschnutí přípravku (5 minut) bylo sklo znovu dvakrát omyto deionizovanou vodou a osušeno papírovými utěrkami.
2. Malé sklo bylo také omyto deionizovanou vodou, osušeno papírovými utěrkami a poté dvakrát omyto 96% ethanolem a opět osušeno papírovými utěrkami.

Následně byla plocha skla, která později přijde do kontaktu s gelem, důkladně ošetřena 1 ml molekulárního lepidla. Ošetřená plocha byla po zaschnutí roztoku (5 minut) čtyřikrát omyta 96% ethanolem a vždy osušena papírovými utěrkami.

3. Velké sklo bylo položeno vodorovně na podložku do digestoře ošetřenou plochou nahoru. Při delších hranách skla byly na sklo umístěny 0,4 mm silné spacers a na ně bylo položeno malé sklo tak, aby jeho ošetřená plocha směřovala dolů do prostoru mezi malým a velkým sklem. Umístění spacerů bylo následně upraveno tak, aby se přesně překrývaly hrany skel a spacerů a gumové části těsně přiléhaly ke kratší hraně malého skla. Takto byla skla zpevněna pomocí čtyř klipsů.
4. V kádince byl připraven 6% polyakrylamidový gel a ten byl následně důkladně promíchán a pomalu naléván mezi malé a velké sklo tak, aby vyplnil celý prostor mezi oběma skly a nedošlo ke vzniku bublin v gelu.
5. Po nalití gelu byl v místě nalévání vsunut asi 5 mm do gelu hřebínek jeho rovnou hranou. Skla byla v místě hřebínku zpevněna čtyřmi klipsami.
6. Polyakrylamidový gel zpolymerizoval přibližně za 1 hodinu.

Elektroforetická separace, příprava a nanášení vzorků

1. Po zpolymerizování gelu byly všechny klipsy sejmuty a skla s gelem byla důkladně omyta od zbytků gelu zpolymerizovaného mimo prostor mezi skly. Omytá skla byla osušena papírovými utěrkami a vložena do elektroforetické komůrky tak, aby strana s hřebínkem směřovala nahoru a malé sklo bylo na vnitřní ploše přitisklé ke gumové části komůrky. Následně byla skla k elektroforetické komůrce důkladně připevněna pomocí šroubů.
2. Odtok z vrchní části elektroforetické komůrky byl uzavřen pomocí šroubu a do anodového i katodového prostoru byl nalit 0,5x TBE pufr. Z prostoru mezi skly byl opatrně vyjmut hřebínek, který byl následně vyčištěn od zbytků gelu, a tento prostor byl vyčištěn od zbytků gelu pomocí proudu pufru z injekční stříkačky. Poté byl anodový i katodový prostor uzavřen a elektroforetická komůrka byla zapojena do zdroje stejnosměrného elektrického proudu, na kterém byla nastavena hodnota výkonu 90 W. Hodnota napětí byla ponechána na maximu, tedy 3000 V a hodnota proudu byla taktéž ponechána na maximu (150 mA). Nahřívání gelu za těchto podmínek probíhalo půl hodiny.
3. V průběhu nahřívání gelu bylo do mikrozkuvek s PCR produkty přidáno po 5 μ l nanášecího pufru a před dokončením nahřívání byly vzorky 3 minuty denaturovány

při 94 °C v termocykleru. Po zkončení denaturace byly vzorky ihned vloženy do ledové tříště, aby se zabránilo opětovné renaturaci denaturovaných vláken PCR produktů.

4. Během denaturace PCR produktů byl zdroj stejnosměrného elektrického proudu vypnut, čímž bylo ukončeno nahřívání gelu. Po vyjmutí katody a otevření katodového prostoru byl opět důkladně vyčištěn prostor mezi skly od zbytků polyakrylamidu a rozpuštěné močoviny proudem pufru z injekční stříkačky. Následně byl do vyčištěného prostoru vsunut hřebínek tak, aby zasahoval zoubky asi 1 mm do gelu.
5. Osmikanálovou pipetou byly nanесeny 2 μ l vzorků mezi skla na gel do mezer mezi zoubky hřebínku. Poté byl katodový prostor opět uzavřen, připojena katoda a zdroj stejnosměrného elektrického proudu byl zapnut. Nastavení výkonu bylo na hodnotu 70 W a hodnoty napětí a proudu byly nechány na maximu (3000 V a 150 mA). Elektroforetická separace probíhala 90–240 minut.
6. Během separace vzorků byl připraven roztok fix/stop, 1% roztok kyseliny dusičné a vývojka, která byla následně uložena do chladničky.
7. Když uplynul čas elektroforetické separace, byl zdroj stejnosměrného elektrického proudu vypnut, elektrody byly poté odpojeny a povolením šroubu na pravém boku elektroforetické komůrky byl z katodového prostoru vypuštěn pufr. Skla byla vyjmuta, položena na podložku tak, aby velké sklo bylo dole a následně byly opatrně vyjmuty spacery. Pomocí čepele nože bylo vrchní malé sklo opatrně odlepeno i s polyakrylamidovým gelem a vloženo vodorovně gelem vzhůru do fotomisky.
8. Velké sklo, spacery i hřebínek byly důkladně omyty pomocí kartáče vodou a opláchnuty deionizovanou vodou. Poté byly připraveny k dalšímu použití.

Vizualizace elektroforetogramu

1. Fotomiska s malým sklem, na kterém byl přilepený polyakrylamidový gel, byla položena na orbitální třepačku v digestoři nastavenou na rychlost 90 otáček za minutu. Sklo bylo zalito připraveným fix/stop roztokem, který působil 20 minut. Po uplynutí doby působení byl roztok nalit pomocí nálevky zpět do Erlenmeyerovy baňky a uchován pro následné použití. Sklo s gelem bylo třikrát propláchnuto deionizovanou vodou.

2. Gel na skle ve fotomisce byl položen zpět na třepačku v digestoři a byl na 4 minuty zalit 1% roztokem kyseliny dusičné. Po uplynutí určené doby byl roztok vylit do výlevky a sklo s gelem ve fotomisce bylo čtyřikrát propláchnuto deionizovanou vodou.
3. Sklo s gelem bylo vloženo do jiné fotomisky a opět položeno na třepačku v digestoři. Poté bylo sklo zalito 0,1% roztokem dusičnanu stříbrného, do kterého bylo před použitím napipetováno 1,2 ml formaldehydu. Roztok působil půl hodiny a po uplynutí této doby byl nalit pomocí nálevky zpět do lahve a uložen do chladničky pro další použití. Sklo s gelem bylo na několik vteřin ponořeno do jiné předem připravené fotomisky s deionizovanou vodou.
4. Sklo s gelem bylo položeno do příslušné fotomisky na třepačku a zalito vývojkou, do které bylo před použitím přidáno 1,2 ml formaldehydu a 160 μ l 1% roztoku thiosíranu sodného. Postupně docházelo k vizualizaci stříbrem obarvených hnědošedých proužků PCR produktů. Když byly proužky dostatečně zřetelné, byla vizualizace zastavena nalitím uchovaného fix/stop roztoku, který působil 2 minuty. Následně byla směs vývojký a fix/stop roztoku vylita do výlevky a sklo s gelem bylo ponořeno do deionizované vody.
5. Omyté sklo s gelem bylo vloženo do sušárny a při 90 °C se sušilo asi půl hodiny.
6. Sklo s usušeným gelem bylo přeneseno na negatoskop, kde byl vyhodnocen výsledek PCR amplifikace a odečteny genotypy jednotlivých jedinců plameňáka karibského. Následně byl elektroforetogram naskenován.
7. Sklo s nepotřebným gelem bylo ponořeno do roztoku hydroxidu sodného o koncentraci 1 mol/l. Po několikahodinovém působení NaOH se gel od skla odlepil a sklo bylo poté pomocí kartáče důkladně omyto vodou se saponátem a opláchnuto deionizovanou vodou. Následně bylo sklo připravené pro další použití.

3.5 Statistické zpracování výsledků testování

U všech získaných polymorfních *cross-species* mikrosatelitů amplifikovaných na DNA 30 nepříbuzných jedinců plameňáka karibského byly určeny alelové konstituce. Po zpracování v programu MS Office Excel 2016 byla data převedena z formátu .xlsx do formátu .csv a zpracována v programu Cervus 3.0.6 (Kalinowski *et al.*, 2007), který vypočítal pro každý lokus pozorovanou heterozygotnost (H_O) a očekávanou heterozygotnost (H_E) a vyhodnotil, zda jsou lokusy v Hardy-Weinbergově rovnováze. Dále software spočítal polymorfní informační obsah (PIC), pravděpodobnosti chyb

v určování rodičovství a frekvenci nulových alel. Zároveň bylo analyzováno použitím webové verze programu Genepop 4.2 (Rousset, 2008), zda nejsou charakterizované polymorfni mikrosatelity ve vazbě. Tato analýza vazby byla provedena i mezi těmito a všemi dosud známými polymorfni mikrosatelity u plameňáka karibského.

3.6 Použité chemikálie

Akrylamid (Sigma)
aTaq DNA polymeráza (5 U/ μ l), M1241 (Promega)
Bromfenolová modř (Serva)
dNTPs (100 mmol/l, 400 μ l každého), U1240 (Promega)
Dusičnan stříbrný (Sigma)
Ethanol, 96% roztok (Lihovar Vrbátky)
Ethylendiaminotetraoctan sodný - Na₂EDTA (Lachner)
Formaldehyd (Lachema)
Formamid (Lachema)
Hydroxid sodný (Lachner)
Chlorid draselný (Lachema)
Chlorid hořečnatý hexahydrát (Lachema)
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' - tetramethylethylendiamin - TEMED (Serva)
Peroxodisíran amonný (Serva)
Rain off - tekuté stěrače (Sheran)
Thiosíran sodný (Lachema)
Trishydroxymethylaminomethan - Tris (AppliChem)
Triton X-100 (AppliChem)
Uhlícitan sodný (Lachner)
Xylenová modř - Xylencyanol FF (AppliChem)

3.7 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

MgCl₂, 25 mmol/l:

90 ml deionizované vody

0,508 g MgCl₂·6H₂O

po rozpuštění doplnit deionizovanou vodou na 100 ml

Molekulární lepidlo:

1 ml 0,5% kyseliny octové v 96% ethanolu

3 μl 3 - methakryloxypropyltrimethoxysilanu

Nanášecí pufr:

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' - tetramethylethylendiaminu

Reakční pufr pro PCR 10x, zásobní roztok:

80 ml deionizované vody
1,211 g trishydroxymethylaminomethanu (Tris) (nebo 6,7 ml Tris na 1 mol/l)
pH upravit pomocí HCl na hodnotu 9,0
3,73 g KCl
1 ml Triton X-100
po rozpuštění doplnit deionizovanou vodou na 100 ml

TBE pufr 10x, zásobní roztok:

55 g kyseliny borité (H_3BO_3)
108 g trishydroxymethylaminomethanu (Tris)
40 ml roztoku Na_2EDTA 0,5 mol/l, pH 8,0
doplnit deionizovanou vodou na 1 l

TE pufr:

10 ml zásobního roztoku trishydroxymethylaminomethanu (Tris) 1 mol/l, pH 8,0
200 µl zásobního roztoku Na_2EDTA 0,5 mol/l, pH 8,0
rozpustit v 800 ml deionizované vody
po rozpuštění doplnit 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

3.8 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 μ l (osmikanálová) a 0,3–1000 μ l (Thermo Labsystems)

Mikropipety Nichipet EX 0,5–1000 μ l (Nichiryo)

Minicentrifuga CLE CSQSP (Clever Scientific)

Minicentrifuga Prism mini (Labnet International)

Negatoskop NEGA1 (Maneko)

Sekvenační elektroforetická komůrka S2 (Whatman Biometra)

Spektrofotometr NanoDrop ND-1000 (Thermo Scientific)

Sušárna CAT 8050 (Contherm)

Termocykler GenePro (BIOER Technology)

Termocykler XP cyclor (BIOER Technology)

Termocykler PTC 100-96 VHB (MJ Research)

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)

4 Výsledky

Ve své diplomové práci jsem sledovala celkem čtyři dílčí části. První částí bylo otestování dvou konzervovaných ptačích mikrosatelitů, které zatím u plameňáka karibského testované nebyly, na DNA 6 nepříbuzných jedinců plameňáka karibského (*Phoenicopterus ruber*). Druhou dílčí částí bylo otestování 12 lokusů, které Zlochová (2017) označila za monomorfní při amplifikaci na DNA plameňáka karibského, ale Klaclová (2018) je při testování s DNA plameňáka růžového označila jako polymorfní. Dva lokusy od Klaclové (2018), které jsem opakovaným testováním na DNA 6 nepříbuzných jedinců plameňáka karibského označila za polymorfní jsem poté analyzovala a charakterizovala na DNA 30 nepříbuzných jedinců. Třetí a nerozsáhlejší částí byla analýza a charakteristika 23 *cross-species* mikrosatelitů na DNA 30 nepříbuzných jedinců plameňáka karibského, z nichž bylo 16 z řádu tučňáci (*Sphenisciformes*) a 7 univerzálních ptačích mikrosatelitů, které Zlochová (2017) označila za polymorfní testováním na DNA 6 nepříbuzných jedinců. Čtvrtou částí byla analýza všech 149 dosud charakterizovaných nezávislých polymorfních mikrosatelitů u plameňáka karibského (Drobek, 2010; Buržáková, 2013; Strejčková, 2018; tato práce), zda nejsou některé lokusy ve vazbě.

Mikrosatelity, u kterých jsem testovala polymorfismus, jsem amplifikovala pomocí *cross-species* PCR amplifikace na DNA šesti nepříbuzných jedinců plameňáka karibského. Pro polymerázovou řetězovou reakci jsem nastavila výchozí teplotu *annealingu* 50 °C a jako výchozí délku elektroforetické separace jsem použila 90 minut. V případě, že elektroforetogram nebyl zřetelně hodnotitelný, upravila jsem dále teplotu *annealingu*, případně délku elektroforetické separace. Nalezené polymorfní mikrosatelity jsem pak charakterizovala na DNA třiceti nepříbuzných jedinců plameňáka karibského. Jako výchozí teplotu *annealingu* a délku elektroforetické separace jsem použila data z bakalářské práce Zlochové (2017), případně data z mého vlastního předchozího testování polymorfismu na DNA 6 nepříbuzných jedinců. U většiny lokusů jsem ještě výsledné podmínky PCR nebo elektroforetické separace upravila (viz tabulky č. 4 a 5). V případě dvou mikrosatelitů jsem upravovala i koncentraci hořčičných iontů, protože i při vysoké teplotě *annealingu* byl produkt příliš silný a nečitelný. Snížení na dvoutřetinovou koncentraci MgCl₂ jsem provedla u amplifikace lokusu Emm5 tak, že jsem do reakčního PCR mixu napipetovala pouze 13,3 μl (namísto 20 μl) a chybějící

objem jsem doplnila deionizovanou vodou. Obdobným způsobem jsem u lokusu Em23 snížila koncentraci $MgCl_2$ v reakčním PCR mixu na 1/2.

Podkladem pro nejrozsáhlejší cíl mé diplomové práce byla bakalářská práce Alžběty Zlochové (2017), která hledala polymorfni *cross-species* mikrosatelity testováním lokusů odvozených z řádu tučňáci a univerzálních ptačích mikrosatelitů na DNA šesti nepříbuzných jedinců plameňáka karibského. Provedla jsem *cross-species* PCR amplifikaci 23 nalezených polymorfních mikrosatelitů (Zlochová, 2017) na DNA třiceti nepříbuzných jedinců plameňáka karibského a zjistila jsem, že jsou dva mikrosatelity monomorfní. Jednalo se o lokus Em9 od tučňáka nejmenšího (*Eudyptula minor*) a lokus Pygantarc07 od t. uzdičkového (*Pygoscelis antarctica*). Ostatních 21 mikrosatelitů bylo polymorfních a 14 z nich bylo od druhů z řádu tučňáci, 3 EST ptačí mikrosatelity (TG) a 4 konzervované ptačí mikrosatelity (CAM). Charakteristika jednotlivých mikrosatelitů je uvedena v tabulkách č. 4 a 5.

Testováním dvou EST ptačích mikrosatelitů, které Zlochová (2017) netestovala (TG01-086 a TG09-014), na DNA 6 nepříbuzných jedinců plameňáka karibského jsem zjistila, že jsou oba monomorfní a analýzu a charakteristiku na DNA 30 nepříbuzných jedinců jsem tedy u těchto 2 lokusů neprovedla.

Dalším dílčím cílem mé diplomové práce bylo přetestování mikrosatelitů, které Zlochová (2017) u plameňáka karibského označila za monomorfní, ale Klaclová (2018) u plameňáka růžového je označila jako polymorfni. Jednalo se o 12 lokusů, z nichž byly 4 z řádu tučňáci (Em8 a Emm5 od tučňáka nejmenšího, RM6 od t. kroužkového a Sh1Ca12 od t. Humboldtova), 5 EST ptačích mikrosatelitů (TG01-148, TG02-120, TG03-035, TG04-041 a TG05-030) a 3 konzervované ptačí mikrosatelity (CAM-03, CAM-07 a CAM-19). Tyto lokusy jsem testovala na DNA 6 nepříbuzných jedinců plameňáka karibského. Tímto opakovaným testováním jsem našla dva polymorfni *cross-species* mikrosatelity (Emm5 a RM6), které jsem následně amplifikovala na DNA 30 nepříbuzných jedinců plameňáka karibského. Lokus RM6 byl z důvodu přítomnosti velkého množství nespecifických produktů, tzv. *stutter* bandů, označen za nehodnotitelný. Pro analýzu a charakteristiku byl tedy použit pouze tříalelový mikrosatelit Emm5, přestože *stutter* bandy obsahoval též, ale ne v takovém množství, aby bylo nutné ho také vyloučit. Tento lokus i Zlochová (2017) doporučila pro analýzu na DNA většího počtu jedinců. Charakteristika tohoto lokusu je uvedena v tabulce č. 4.

Tabulka č. 4: Charakteristika 15 polymorfních mikrosatelitů z řádu tučňáci amplifikovaných u 30 nepříbuzných jedinců plameňáka karibského.

Název lokusu (GenBank Acc. no.)	Zdrojový druh	Jednotka repetice	Sekvence primerů (5' → 3')	T _a [°C]	t _s [min]	k	N	H _o	H _E	PIC	HW	Nulové alely
Ech005 (FM878336)	tučňák žlutorohý (<i>Eudyptes chrysolophus</i>)	CTTTT	F: GCCTTATGCAGGTACAGATGTCTTCTC R: TGCTGAAGGTAAAGAGCAGTGAAATC	68	240	8	30	0,800	0,759	0,719	NS	-0,0592
Ech009 (FM878340)		AC	F: CCTCTGTTGTACAAGCTGGATGC R: GCAATTCTGCTTGCCTCTGC	69	180	2	30	0,367	0,494	0,368	NS	0,1401
Ech011 (FM878342)		GT	F: CACAGCACTGTGACAGAAGCA R: TTAACCTGGTTTCGATTTGTCAGTCTTT	52	120	2	30	0,333	0,364	0,294	NS	0,0354
Ech024 (FM878355)		CT	F: TGTTTCTTGGCTTACTTCCACAG R: CCAAATATGTTGTGGTTCGACAGTG	63	90	2	27	0,148	0,352	0,286	NS	0,3999
Ech030 (FM878361)		CTAT	F: TGACGCCGCAGGGACTTC R: GCTCAGCTCTTGCTCACAGTTTCAG	69	180	5	30	0,767	0,713	0,649	NS	-0,0425
Ech039 (FM878370)		TTTCT	F: TCTTCCCAGGCAAGGAATAAC R: CTCTGACTAATTGCTAAGAAATACTCCTG	63	240	16	30	0,800	0,927	0,904	ND	0,0639
Emm5* (DQ83772933)	tučňák nejmenší (<i>Eudyptula minor</i>)	CTTT	F: ATTAACCTGGCCTTGGGTTC R: TTTATGCTCCCTCATTCCAC	53	110	3	30	0,433	0,579	0,505	NS	0,1383
Em2 (KM272222)		AGAT	F: GGCACCTGGGATCTTTCTTCC R: GACCATGCTGCAGGTTCTTG	66	120	3	30	0,367	0,315	0,278	NS	-0,0956
Em23** (KM272234)		CA	F: GATGCATGTGGAGGAAGTGC R: GGCAACATGGTAGCTGACAC	60	120	7	30	0,733	0,703	0,653	NS	-0,0245
Man27 (EU267114)	tučňák žlutoooký (<i>Megadyptes antipodes</i>)	GA/GT/ CA/GCA	F: GATCCTGAGAAGAGAGACAG R: GGCTGTTCAATTTGTCCAC	59	90	3	30	0,467	0,468	0,410	NS	0,0066
Man47 (EU267116)		TGA	F: ATACCTCCAGAATGGCTG R: CACTAAGGGTGACCAAGG	53	90	2	30	0,500	0,494	0,368	NS	-0,0141
Man55 (EU267120)		TTG	F: TTGAACTAGCAAGCAGTGTAG R: AAGGGCATTTCATTCTG	61	90	3	30	0,667	0,518	0,396	NS	-0,1337

Tabulka č. 4: Pokračování.

Název lokusu (GenBank Acc. no.)	Zdrojový druh	Jednotka repetice	Sekvence primerů (5' → 3')	T _a [°C]	t _s [min]	k	N	H _O	H _E	PIC	HW	Nulové alely
B3-2 (neuvedeno)	tučňák brýlový (<i>Spheniscus</i> <i>demersus</i>)	GT	F: GGTGGTTATAGATGCACGAC R: ACGTGCCCAGGAATCCAGTT	66	220	5	30	0,567	0,786	0,737	NS	0,1543
PNN08 (JX494408)		ATAG	F: GGAAATGCCACTGAAAACCTAA R: GATAGATGGGGAAGTGGAAACA	59	90	5	30	0,700	0,713	0,647	NS	0,0075
Sh2Ca21 (AF540011)	tučňák Humboldtův (<i>S. humboldti</i>)	CA	F: AAAATAAAGCCTATACACAACAGG R: GTGCACTTAATGGGGTGTATG	55	90	2	30	0,133	0,183	0,164	ND	0,1488

Ve sloupcích tabulky je uveden název lokusu i s kódem z databáze GenBank (*Accession number* - Acc. no.), zdroj, jednotka repetice, sekvence primerů, optimální teplota *annealingu* (T_a), doba elektroforetické separace (t_s), počet alel (k), počet jedinců (N), pozorovaná heterozygotnost (H_O), očekávaná heterozygotnost (H_E), polymorfní informační obsah (PIC), Hardy-Weinbergova rovnováha (HW: NS - lokus je v HW rovnováze; ND - nebylo možné určit, zda je lokus v HW rovnováze) a četnost nulových alel.

*snížená koncentrace MgCl₂ v reakčním PCR mixu na 2/3, tedy na 1,2 mmol/l (oproti standardním 1,8 mmol/l).

**snížená koncentrace MgCl₂ v reakčním PCR mixu na 1/2, tedy na 0,9 mmol/l.

Tabulka č. 5: Charakteristika 7 polymorfních univerzálních ptačích mikrosatelitů amplifikovaných u 30 nepříbuzných jedinců plameňáka karibského.

Název lokusu (GenBank Acc. no.)	Zdroj	Jednotka repetice	Sekvence primerů (5' → 3')	T _a [°C]	t _s [min]	k	N	H _o	H _E	PIC	HW	Nulové alely
TG03-002 (DV575298)	EST ptačí mikrosatelity	AT	F: TCTTGCCTTTTTGGTATGAGTATAG R: TACAAAGCACTGTGGAGCAG	64	90	2	30	0,300	0,259	0,222	ND	-0,0778
TG04-061 (CK235034)		A/GA	F: GACAATGGCTATGAAATAAATTAGGC R: AGAAGGGCATTGAAGCACAC	66	150	4	30	0,367	0,349	0,321	NS	-0,0252
TG22-001 (CK317333)		AT	F: TTGGATTCAGAACATGTAGC R: TCTGATGCAAGCAAACAA	60	180	2	30	0,133	0,127	0,117	ND	-0,0258
CAM-06 (neuvedeno)	konzervované ptačí mikrosatelity	AT	F: GTGATGGTCCAGGTCTTGC R: CAAGAGGAACAGATGAGGGTC	65	180	4	30	0,433	0,499	0,450	NS	0,0713
CAM-11 (neuvedeno)		GT	F: TGGTACAGGGACAGCAAACC R: AGATGCTGAGAGCGGATG	64	90	3	30	0,167	0,267	0,241	ND	0,2147
CAM-20 (neuvedeno)		AT	F: TAACAGGCAGGAATGCAGG R: TCAGCCAGTGTGGAGGTC	54	150	5	30	0,467	0,579	0,530	NS	0,1274
CAM-24 (neuvedeno)		CA	F: CCCACTTCAGTCTTCAGAGC R: TGGAGTATTTGGGATTGGAG	52	90	4	30	0,733	0,715	0,647	NS	-0,0326

Ve sloupcích tabulky je uveden název lokusu i s kódem z databáze GenBank (*Accession number* - Acc. no.), zdroj, jednotka repetice, sekvence primerů, optimální teplota *annealingu* (T_a), doba elektroforetické separace (t_s), počet alel (k), počet jedinců (N), pozorovaná heterozygotnost (H_o), očekávaná heterozygotnost (H_E), polymorfní informační obsah (PIC), Hardy-Weinbergova rovnováha (HW: NS - lokus je v HW rovnováze; ND - nebylo možné určit, zda je lokus v HW rovnováze) a četnost nulových alel.

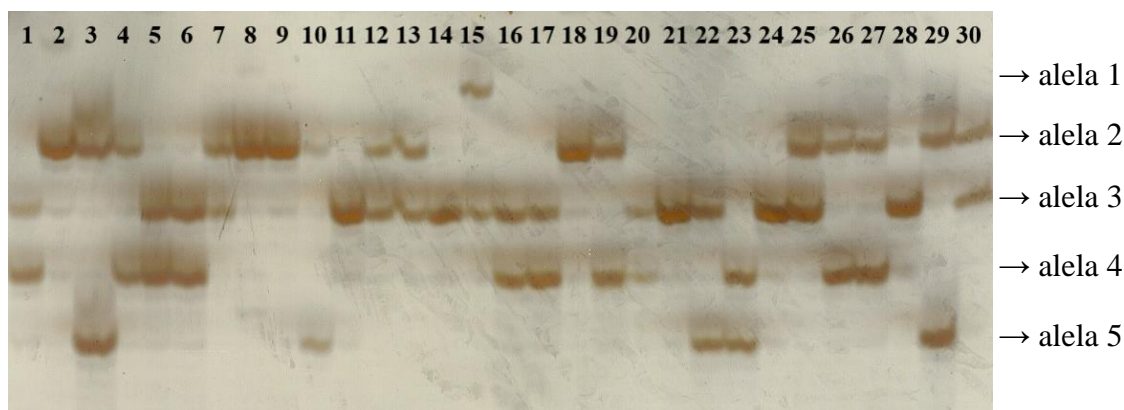
Genotypizací všech 22 polymorfních lokusů jsem u 30 jedinců plameňáka karibského našla 2–16 alel. Nejvíce bylo dvoualelových lokusů, kterých jsem charakterizovala celkem 7, tříalelových bylo 5, čtyřalelové lokusy byly 3, pětialelové mikrosatelity byly 4 a po jednom sedmialelovém, osmialelovém a šestnáctialelovém lokusu. Průměrně bylo tedy u 30 jedinců 4,2 alel na lokus. U mikrosatelitu Ech024 byly pozorovány u 3 jedinců nulové alely v homozygotním stavu, tedy ani po několikanásobném opakování PCR amplifikace těchto tří vzorků s primery pro amplifikaci lokusu Ech024 nebyl získán žádný produkt. Zjištění je v souladu s programem Cervus 3.0.6 (Kalinowski *et al.*, 2007), který uvádí u tohoto lokusu téměř 40% pravděpodobnost výskytu nulových alel (viz tabulka č. 4).

Z celkového počtu 113 testovaných mikrosatelitů z řádu tučňáci jsem charakterizovala u plameňáka karibského 14 polymorfních lokusů, což je asi 12,4 %. Univerzálních ptačích mikrosatelitů bylo celkem testováno 60 (Zlochová, 2017; tato práce) a z tohoto celkového počtu jsem charakterizovala 7 polymorfních lokusů. Úspěšnost amplifikace polymorfního univerzálního ptačího mikrosatelitu je tedy asi 11,7 %. Tyto univerzální ptačí mikrosatelity zahrnují EST ptačí mikrosatelity a konzervované ptačí mikrosatelity. EST ptačích mikrosatelitů bylo u plameňáka karibského celkem testováno 36, z nichž byly charakterizovány pouze 3 polymorfní lokusy, což je 8,3 %. Konzervovaných ptačích mikrosatelitů bylo celkem testováno u plameňáka karibského 24 a z tohoto celkového počtu jsem charakterizovala 4 polymorfní lokusy, tedy asi 16,7 %. Ze zmíněných tří kategorií mikrosatelitů tedy u plameňáka karibského nejúspěšněji probíhala amplifikace konzervovaných ptačích mikrosatelitů a nejméně úspěšná byla amplifikace EST ptačích mikrosatelitů.

Z tučňáčích mikrosatelitů jsem charakterizovala nejvíce polymorfních *cross-species* mikrosatelitů od tučňáka žltorohého (*Eudiptes chrysolophus*), kterých bylo polymorfních 6 z celkových 25 testovaných. Úspěšnost amplifikace polymorfního lokusu od tohoto druhu je tedy 24 %. Mikrosatelity od tučňáka nejmenšího (*Eudiptula minor*) jsem charakterizovala 3 z celkového počtu 28 testovaných, což je 10,7 %. Od tučňáka žlutookého (*Megadyptes antipodes*) jsem charakterizovala tři polymorfní lokusy a původní počet testovaných mikrosatelitů byl 12, takže relativní úspěšnost amplifikace polymorfního lokusu je zde 25 %. Dva lokusy jsem charakterizovala od tučňáka brýlového (*Spheniscus demersus*), přičemž původně bylo testováno 9 mikrosatelitů od tohoto druhu, takže je zde 22,2% pravděpodobnost amplifikace polymorfního lokusu.

Elektroforetogram mikrosatelitu PNN08 od tučňáka brýlového je znázorněn na obrázku č. 6. A jeden charakterizovaný lokus z původních 13 testovaných lokusů pocházel od tučňáka Humboldtova (*S. humboldti*). V tomto případě byla úspěšnost pouze 7,7 %.

Obrázek č. 6: Elektroforetogram produktů amplifikace mikrosatelitu PNN08 od tučňáka brýlového. Na DNA 30 nepříbuzných jedinců plameňáka karibského bylo nalezeno 5 alel při teplotě *annealingu* 59 °C a délce elektroforetické separace 90 minut.



Všech 22 nalezených polymorfních produktů charakterizovaných na DNA 30 nepříbuzných jedinců plameňáka karibského jsem analyzovala pomocí programu Cervus 3.0.6 (Kalinowski *et al.*, 2007). Kompletní analýzu uvádím v kapitole 9 Přílohy. Analyzované lokusy vykazují v průměru 4,182 alely na lokus, průměrná očekávaná četnost heterozygotů je 50,74 %, průměrný obsah polymorfní informace je 45,02 %. Pokud by se všech těchto 22 mikrosatelitů použilo pro paternitní analýzu, byla by chyba v případě přiřazení prvního rodiče k mláděti 0,845 %. V případě přiřazení druhého rodiče by tato chyba byla 0,015 %. Chyba přiřazení rodičovského páru by byla $3,1 \cdot 10^{-5}$ %. Pravděpodobnost, že by dva náhodně vybraní jedinci měli totožné alelové konstituce na všech 22 lokusech, je $1,31 \cdot 10^{-11}$ % a pravděpodobnost, že by dva náhodně vybraní sourozenci na všech 22 lokusech měli stejné alelové konstituce, je $3,5 \cdot 10^{-4}$ %.

Před vypracováním této práce bylo dosud známo 127 nezávislých polymorfních mikrosatelitů pro plameňáka karibského (Drobek, 2010; Buržáková, 2013; Strejčková, 2018). V této práci jsem charakterizovala dalších 22 polymorfních mikrosatelitů. Všech těchto 149 aktuálně známých nezávislých polymorfních mikrosatelitů pro plameňáka karibského jsem charakterizovala v programu Cervus 3.0.6 (Kalinowski *et al.*, 2007) a ve webové verzi programu Genepop 4.2 (Rousset, 2008) jsem si ověřila, že mezi žádnou dvojicí z těchto 149 nezávislých polymorfních mikrosatelitů není vazba. Těchto 149 polymorfních mikrosatelitů vykazuje v průměru 4,611 alely na lokus. průměrná očekávaná četnost heterozygotů je 52,69 %, průměrný obsah polymorfní informace je

47,20 %. Pokud by se všech těchto 149 mikrosatelitů použilo pro paternitní analýzu, byla by chyba v případě přiřazení prvního rodiče k mláděti $1,36 \cdot 10^{-14}$ %. V případě přiřazení druhého rodiče by tato chyba byla $1,84 \cdot 10^{-27}$ %. Chyba přiřazení rodičovského páru by byla $1,27 \cdot 10^{-47}$ %. Pravděpodobnost, že by dva náhodně vybraní jedinci měli totožné alelové konstituce na všech 149 lokusech, je $1,74 \cdot 10^{-92}$ % a pravděpodobnost, že by dva náhodně vybraní sourozenci na všech 149 lokusech měli stejné alelové konstituce, je $1,56 \cdot 10^{-37}$ %.

5 Diskuse

V této diplomové práci jsem analyzovala a charakterizovala celkem 22 polymorfních mikrosatelitů pomocí *cross-species* PCR amplifikace na DNA 30 nepříbuzných jedinců plameňáka karibského, Jednalo se o 15 mikrosatelitů odvozených od druhů z řádu tučňáci a 7 univerzálních ptačích mikrosatelitů.

Zlochová (2017) ve své bakalářské práci celkem testovala na DNA 6 nepříbuzných jedinců plameňáka karibského 113 mikrosatelitů z řádu tučňáci, ze kterých vybrala 16 polymorfních. Já jsem těchto 16 lokusů amplifikovala na DNA 30 jedinců a zpětně jsem 2 mikrosatelity u tohoto většího počtu jedinců označila za monomorfní. Důvodem původního označení lokusů za polymorfní (Zlochová, 2017) mohly být například artefakty PCR. Ke zbývajícím 14 polymorfním lokusům jsem přidala ještě jeden polymorfní mikrosatelit (Emm5) na základě opakovaného testování polymorfismu 12 lokusů, které byly u plameňáka karibského označeny za monomorfní (Zlochová, 2017), ale u sesterského druhu, plameňáka růžového, vykazovaly polymorfismus (Klaczová, 2018). Všechny 15 polymorfních mikrosatelitů z řádu tučňáci jsem analyzovala a charakterizovala na DNA 30 nepříbuzných jedinců plameňáka karibského.

U tučňáka žltorohého (*Eudyptes chrysolophus*) Ahmed *et al.* (2009) popsali celkem 25 polymorfních mikrosatelitů. Já jsem analyzovala a charakterizovala na DNA 30 nepříbuzných jedinců plameňáka karibského celkem šest polymorfních lokusů (Ech005, Ech009, Ech011, Ech024, Ech030 a Ech039). Ahmed *et al.* (2009) použili pro všechny lokusy teplotu *annealingu* (T_a) 60 °C. Lokus Ech005 autoři testovali u 27 jedinců a našli 33 alel a já jsem u 30 jedinců použila T_a 68 °C a popsala jsem 8 alel, což byl v rámci mé diplomové práce druhý nejvyšší počet alel. Pro mikrosatelit Ech009 jsem použila teplotu *annealingu* 69 °C a našla jsem u 30 jedinců 2 alely, zatímco autoři u 28 jedinců našli 8 alel. Lokus Ech011 vykazoval podle autorů 8 alel u 27 jedinců a já jsem popsala 2 alely za použití T_a 52 °C. Při nastavení teploty *annealingu* 63 °C jsem u mikrosatelitu Ech024 našla 2 alely, zatímco Ahmed *et al.* (2009) popsali 5 alel u 28 jedinců. Pro lokus Ech030 popsali autoři u 28 jedinců 11 alel, ale já jsem našla jen 5 alel a použila jsem T_a 69 °C. Lokus Ech039 vykazoval podle autorů 25 alel u 22 jedinců a já jsem u tohoto mikrosatelitu zaznamenala 16 alel u 30 jedinců při teplotě *annealingu* 63 °C. Tento lokus vykazoval v rámci celé této diplomové práce nejvyšší počet alel. Ahmed *et al.* (2009) testovali nalezené mikrosatelity od tučňáka žltorohého i pomocí *cross-species* PCR amplifikace u dalších 4 druhů tučňáků (t. patagonského, t. oslího, t. uzdičkového

a t. kroužkového) při T_a 60 °C. Mikrosatelit Ech009 byl polymorfní u tučňáka uzdičkového, kde měl 2 alely, a t. kroužkového, kde vykazoval 4 alely. Lokus Ech011 vykazoval 5 alel u tučňáka patagonského a 2 alely u t. kroužkového. Pro mikrosatelit Ech024 se podařilo amplifikovat jen tři druhy a pouze u tučňáka kroužkového byl tento lokus polymorfní se 3 alelami. Lokus Ech030 byl polymorfní u 3 druhů, přičemž u tučňáka patagonského vykazoval 3 alely a u t. oslího a t. uzdičkového vykazoval po pěti alelách. Na základě očekávaných a pozorovaných velikostí alel Ahmed *et al.* (2009) uvádějí, že páry primerů pro amplifikaci Ech005 a Ech039 amplifikovaly tyto mikrosatelity pouze u tučňáka žltorohého, ale u ostatních testovaných druhů tučňáků velmi pravděpodobně amplifikovaly jiné než mikrosatelitové lokusy. Tyto mikrosatelity u plameňáka karibského vykazovaly nejvyšší počty alel ze všech analyzovaných lokusů, tudíž je velice nepravděpodobné, že by byly náhodně amplifikovány jiné než mikrosatelitové amplikony s tak vysokou délkovou variabilitou, a tedy se zde téměř jistě jedná o mikrosatelity. Velikosti alel jsem ve své diplomové práci neporovnávala.

Mikrosatelity od tučňáka nejmenšího (*Eudyptula minor*) byly popsány v rámci dvou prací a celkem bylo nalezeno u tohoto druhu 28 lokusů, z nichž jsem charakterizovala u plameňáka karibského 3 mikrosatelity (Emm5, Em2 a Em23). Billing *et al.* (2007) našli celkem 8 mikrosatelitů u tučňáka nejmenšího, z nichž jsem analyzovala u 30 nepříbuzných jedinců plameňáka karibského lokus Emm5 a při teplotě *annealingu* 53 °C s dvoutřetinovou koncentrací $MgCl_2$ jsem popsala 3 alely. Autoři tento lokus amplifikovali při T_a 58 °C u 28 jedinců z Filipova ostrova, u nichž našli 11 alel, a u 15 jedinců z Troubrigerova ostrova, u nichž popsali 8 alel. Grosser *et Waters* (2015) popsali u tučňáka nejmenšího celkem 20 mikrosatelitů, u kterých testovali polymorfismus při teplotě *annealingu* 60 °C, ale neuvádějí, u kolika jedinců provedli amplifikaci. Lokus Em2 podle autorů vykazuje 17 alel, zatímco já jsem našla 3 alely při T_a 66 °C. U mikrosatelitu Em23 autoři popsali 9 alel a já jsem našla 7 alel také při teplotě *annealingu* 60 °C, ovšem s poloviční koncentrací $MgCl_2$. Jedná se o lokus, který vykazoval třetí nejvyšší počet alel v rámci mé diplomové práce.

Od tučňáka žlutookého (*Megadyptes antipodes*) Boessenkool *et al.* (2008) popsali celkem 12 mikrosatelitů, které amplifikovali při T_a 48 °C u 43 jedinců. Já jsem charakterizovala u 30 jedinců plameňáka karibského 3 mikrosatelity (Man27, Man47 a Man55). Pro lokus Man27 jsem našla 3 alely při teplotě *annealingu* 59 °C, zatímco autoři popsali pouze 2 alely. Lokus Man47 vykazoval podle autorů 4 alely, ale já jsem

nalezla při T_a 53 jen 2 alely. U mikrosatelitu Man55 jsem popsala 3 alely při T_a 61 °C, Boessenkool *et al.* (2008) našli pouze 2 alely.

U tučňáka kroužkového (*Pygocelis adeliae*) Roeder *et al.* (2001) našli celkem 6 mikrosatelitů, které testovali na 432 jedincích. Lokus RM6 amplifikovali při teplotě *annealingu* 57 °C a popsali 6 alel. Já jsem lokus amplifikovala při různých T_a , ale z důvodu přítomnosti velkého množství *stutter* bandů jsem mikrosatelit označila za nehodnotitelný a z tohoto důvodu není uveden v tabulce č. 4 a pro další analýzu s tímto lokusem nepočítám.

Mikrosatelity u tučňáka brýlového (*Spheniscus demersus*) byly popsány ve dvou pracech a celkem bylo nalezeno 9 lokusů, z nichž jsem charakterizovala pro plameňáka karibského 2 mikrosatelity (B3-2 a PNN08). Akst *et al.* (2002) testovali lokus B3-2 odvozený od tučňáka brýlového na DNA 46 jedinců dvou druhů z rodu *Spheniscus*, u tučňáka galapážského (*S. mendiculus*) a t. magellanského (*S. magellanicus*) při T_a 50 °C. U tučňáka galapážského byl lokus monomorfni, zatímco u t. magellanského vykazoval 8 alel. Tento lokus testovali i Billing *et al.* (2007) pomocí *cross-species* PCR amplifikace u 47 jedinců tučňáka nejmenšího z Filipova ostrova a při T_a 56 °C našli 8 alel. Já jsem mikrosatelit B3-2 amplifikovala u 30 nepříbuzných jedinců plameňáka karibského a při teplotě *annealingu* 66 °C jsem popsala 5 alel. Tento lokus byl obtížně hodnotitelný, protože má velmi krátkou jednotku repetice a i přesto, že byl separován 220 minut, byly proužky jednotlivých alel na elektroforetogramu velmi blízko u sebe. Labuschagne *et al.* (2013) popsali 8 mikrosatelitů od tučňáka brýlového, které testovali u 25 jedinců při T_a 50–60 °C, ale konkrétní teplotu *annealingu* pro jednotlivé lokusy autoři neuvádějí. Lokus PNN08 jsem amplifikovala u 30 jedinců při T_a 59 °C a popsala jsem 5 alel, zatímco autoři našli pouze 4 alely.

Od tučňáka Humboldtova (*Spheniscus humboldti*) bylo nalezeno celkem 13 mikrosatelitů v rámci tří prací. Schlosser *et al.* (2003) popsali celkem 7 mikrosatelitů, z nichž jsem charakterizovala na DNA 30 nepříbuzných jedinců jeden lokus (Sh2Ca21). Autoři testovali polymorfismus lokusu Sh2Ca21 při teplotě *annealingu* 53 °C a u 24 jedinců popsali 6 alel. Já jsem při T_a 55 °C našla pouze 2 alely. Schlosser *et al.* (2003) dále testovali polymorfismus pomocí *cross-species* PCR amplifikace u dalších 8 druhů tučňáků, z nichž u 7 byl lokus polymorfni.

Po jednom lokusu jsem amplifikovala ještě od tučňáka nejmenšího (Em9) a tučňáka uzdičkového (*Pygoscelis antarctica*) (Pygantarc07), které Zlochová (2017) označila u 6 jedinců plameňáka karibského jako polymorfní. Po amplifikaci u 30 jedinců jsem ovšem tyto lokusy vyhodnotila jako monomorfní. Žádný polymorfní mikrosatelit jsem neanalyzovala od tučňáka galapážského (*Spheniscus mendiculus*) a t. magellanského (*S. magellanicus*).

Párů primerů pro amplifikaci univerzálních ptačích mikrosatelitů bylo celkem testováno 60 a z tohoto počtu bylo nalezeno 7 polymorfních lokusů testováním na DNA 6 jedinců plameňáka karibského (Zlochová, 2017; tato práce). Těchto 7 mikrosatelitů jsem v rámci této práce analyzovala a charakterizovala na DNA 30 nepříbuzných jedinců.

Dawson *et al.* (2010) popsali celkem 36 párů primerů pro amplifikaci 35 EST ptačích mikrosatelitů. Při testování těchto lokusů na DNA 6 nepříbuzných jedinců plameňáka karibského byly nalezeny celkem 3 polymorfní mikrosatelity (Zlochová, 2017; tato práce) a tyto (TG03-002, TG04-061 a TG22-001) jsem analyzovala na DNA 30 nepříbuzných jedinců. Dawson *et al.* (2010) testovali polymorfismus všech lokusů při teplotě *annealingu* u 4 jedinců zebřičky pestré (*Taenopygia guttata*), 4 jedinců kura bankivského (*Gallus gallus*) a 1 jedince kura domácího (*Gallus gallus domesticus*). U lokusu TG03-002 jsem při T_a 64 °C našla 2 alely a autoři také popsali po dvou alelách pro zebřičku pestrou a kura bankivského a 1 alelu pro kura domácího. Lokus TG04-061 jsem amplifikovala při T_a 66 °C a detekovala jsem 4 alely, zatímco autoři našli 2 alely pro zebřičku a u kura byl lokus monomorfní. Pro lokus TG22-001 autoři popsali 3 alely u zebřičky a 1 alelu u kura a já jsem našla 2 alely při teplotě *annealingu* 60 °C. Autoři všechny lokusy testovali i u dalších druhů ptáků, jak je znázorněno v tabulce č. 6.

V rámci jiné práce Dawson *et al.* (2013) popsali 24 konzervovaných ptačích mikrosatelitů a já jsem v této práci analyzovala 4 polymorfní lokusy (CAM-06, CAM-11, CAM-20 a CAM-24) na DNA 30 nepříbuzných jedinců plameňáka karibského. Autoři amplifikovali všechny lokusy při teplotě *annealingu* 56 °C u 7–12 jedinců zebřičky pestré a 2–4 jedinců kura bankivského. Pro mikrosatelit CAM-06 jsem použila T_a 65 °C a našla jsem 4 alely, autoři popsali u 8 jedinců zebřičky 5 alel a u 4 jedinců kura byl lokus monomorfní. U lokusu CAM-11 jsem při T_a 64 °C detekovala 3 alely a Dawson *et al.* (2013) našli 6 alel u 12 jedinců zebřičky a 1 alelu u 4 jedinců kura. Lokus CAM-20 vykazoval při T_a 54 °C u 30 jedinců plameňáka 5 alel, u 12 jedinců zebřičky 6 alel

a u 2 jedinců kura byl monomorfní. Autoři u lokusu CAM-24 našli u 12 jedinců zebříčky 6 alel a u 4 jedinců kura jen 1 alelu a já jsem našla 4 alely při T_a 52 °C.

Tabulka č. 6: Počty alel vybraných mikrosatelitů u jednotlivých analyzovaných druhů ptáků.

Druhy	TG03-002	TG04-061	TG22-001	CAM-06	CAM-11	CAM-20	CAM-24
plameňák karibský	2 (30)	4 (30)	2 (30)	4 (30)	3 (30)	5 (30)	4 (30)
zebrička pestrá	2 (4)	2 (4)	3 (4)	5 (8)	6 (12)	6 (12)	6 (12)
kur bankivský	2 (4)	M (4)	M (4)	M (4)	M (4)	M (2)	M (4)
kur domácí	M (1)	M (1)	M (1)	NT	NT	NT	NT
amada Gouldové	2 (4)	M (4)	2 (4)	NT	NT	NT	NT
linduška kanárská	5 (8–22)	M (3)	3 (3)	2 (4)	3 (4)	M (4)	M (4)
vrabec domácí	2 (4)	3 (1–24)	M (4)	3 (11)	4 (11)	4 (12)	M (12)
zvonek zelený	P (4)	P (4)	P (4)	NT	NT	NT	NT
křivka obecná	P (4)	P (4)	P (4)	NT	NT	NT	NT
pěnkava obecná	P (4)	P (4)	P (4)	2 (4)	2 (3)	4 (4)	M (4)
hýl obecný	P (4)	P (4)	P (4)	3 (4)	3 (4)	4 (3)	M (4)
vlaštovka australská	3 (4)	2 (4)	5 (4)	NT	NT	NT	NT
sýkora modřínka	M (4)	2 (4)	M (4)	NT	NT	NT	NT
sýkora koňadra	M (4)	M (4)	M (4)	M (4)	M (4)	3 (4)	M (4)
rákosník velký	3 (4)	P (4)	3 (4)	NT	NT	NT	NT
sýkořice vínoprsá	2 (4)	M (4)	4 (4)	NT	NT	NT	NT
kos černý	2 (4)	M (4)	3 (4)	NA (4)	M (4)	3 (4)	M (4)
timáliovec pruhokřídlý	2 (4)	2 (4)	2 (4)	NT	NT	NT	NT
straka americká	M (4)	2 (4)	M (4)	NT	NT	NT	NT
popeláč šedý	2 (4)	M (4)	M (4)	NT	NT	NT	NT
kulík mořský	2 (4)	M (4)	M (4)	NT	NT	NT	NT
kolibřík rezavolesklý	M (4)	4 (6–8)	3 (4)	NT	NT	NT	NT
sova pálená	2 (4)	7 (194)	M (4)	3 (4)	2 (3)	M (3)	M (4)
agapornis růžohrdlý	2 (4)	M (4)	M (4)	NT	NT	NT	NT
pokřovník zelený	NT	NT	NT	2 (4)	3 (4)	2 (4)	2 (4)
buňáček dlouhokřídlý	NT	NT	NT	4 (6)	3 (6)	4 (6)	6 (6)
mandelík hajní	NT	NT	NT	3 (6)	P (23–30)	M (4)	P (23–30)

Ve sloupcích tabulky je uveden analyzovaný druh a názvy jednotlivých lokusů, počty testovaných jedinců jsou uvedeny v závorce, M - monomorfní lokus, P - polymorfní lokus, NT - netestováno, NA - neamplifikovalo se, plameňák karibský (tato práce), ostatní druhy pro TG (Dawson *et al.*, 2010) a pro CAM mikrosatelity (Dawson *et al.*, 2013)

Mikrosatelity z řádu tučňáci a univerzální ptačí mikrosatelity už byly dříve testovány, případně analyzovány, v rámci Laboratoře populační genetiky na Katedře buněčné biologie a genetiky PřF UPOL u několika druhů vodních ptáků. U plameňáka karibského bylo celkem testováno 113 mikrosatelitů z řádu tučňáci a 60 univerzálních ptačích mikrosatelitů na DNA 6 nepříbuzných jedinců (Zlochová, 2017; tato práce), z nichž jsem v rámci této práce analyzovala u 30 jedinců celkem 15 mikrosatelitů z řádu tučňáci a 7 univerzálních ptačích mikrosatelitů.

Na DNA 6 jedinců plameňáka růžového (*Phoenicopterus roseus*) Klaclová (2018) testovala také celkem 173 tučňáčích a univerzálních ptačích mikrosatelitů, z nichž vybrala celkem 13 polymorfních lokusů od tučňáků a 11 polymorfních univerzálních ptačích mikrosatelitů. Na základě srovnání s daty Klaclové (2018) jsem zjistila, že je celkem pro oba druhy plameňáka shodných 14 z výše jmenovaných polymorfních mikrosatelitů.

U potápky roháče (*Podiceps cristatus*) bylo testováno u 6 jedinců také celkem 113 tučňáčích a 60 univerzálních ptačích mikrosatelitů (Filipová, 2016; Janušová, 2017), Janušová (2017) vybrané polymorfní lokusy analyzovala u 13 jedinců. Celkem je tedy pro potápku charakterizováno 5 polymorfních mikrosatelitů z řádu tučňáci, z nichž 3 jsou polymorfní i u plameňáka karibského, a 13 univerzálních ptačích mikrosatelitů, z nichž jsou také 3 lokusy polymorfní i u plameňáka karibského.

U nesyta indomalajského (*Mycteria leucocephala*) Pechová (2014) testovala celkem pouze 77 mikrosatelitů z řádu tučňáci a 58 párů primerů pro univerzální ptačí mikrosatelity a vybrala 10 polymorfních lokusů od tučňáků a 4 polymorfní univerzální ptačí mikrosatelity. S plameňákem karibským jsou shodné celkem 3 polymorfní lokusy.

Všech 113 tučňáčích mikrosatelitů a 60 párů primerů pro amplifikaci univerzálních ptačích mikrosatelitů bylo testováno i u tří druhů z rodu pelikán (*Pelecanus*). U pelikána skvrnozobého (*P. philippensis*) jsem v rámci své bakalářské práce (Šuláková, 2017) našla celkem 8 polymorfních lokusů z řádu tučňáci, z nichž 1 je polymorfní i u plameňáka karibského a 6 polymorfních univerzálních ptačích mikrosatelitů, z nichž 2 jsou polymorfní i u plameňáka. Adámková (2019) popsala celkem 12 polymorfních mikrosatelitů u pelikána afrického (*P. rufescens*). Z osmi polymorfních tučňáčích mikrosatelitů je 1 polymorfní i u plameňáka karibského a ze 4 polymorfních univerzálních ptačích mikrosatelitů je také shodný s plameňákem karibským jen jeden. U pelikána kadeřavého (*P. crispus*) byly nalezeny celkem pouze 4 polymorfní

mikrosatelity (Nádvorník, osobní sdělení), z nichž 1 je polymorfní i u plameňáka karibského. Mikrosatelity, které jsou polymorfní u plameňáka karibského a zároveň nejméně u jednoho z výše jmenovaných druhů, jsou uvedeny v tabulce č. 7 i s počtem pozorovaných alel.

Tabulka č. 7: Počty alel vybraných polymorfních mikrosatelitů u jednotlivých analyzovaných, respektive testovaných druhů ptáků v rámci Laboratoře populační genetiky Katedry buněčné biologie a genetiky PřF UPOL.

Název lokusu	Zdroj	Jednotlivé druhy (počet jedinců) a počet alel						
		<i>Phorub</i> (30)	<i>Phoros</i> (6)	<i>Podcri</i> (13)	<i>Mycleu</i> (6)	<i>Pelphi</i> (6)	<i>Pelruf</i> (6)	<i>Pelcri</i> (6)
Ech005		8	M	9	4	M	M	M
Ech009		2	M	2	M	M	M	M
Ech011	tučňák žlutorohý	2	3	M	M	M	M	M
Ech024		2	2	M	M	M	M	M
Ech030		5	3	M	M	M	M	M
Emm5		3	4	3	M	2	2	M
Em2	tučňák nejmenší	3	2	M	NT	M	M	M
Em23		7	4	M	NT	M	M	M
Man27		3	3	M	2	M	M	M
Man47	tučňák žlutooký	2	2	M	M	M	M	M
Man55		3	2	M	M	M	M	M
PNN08	tučňák brýlový	5	2+4	M	M	M	M	M
TG04-061	EST ptačí mikrosatelity	4	M	6	M	M	M	M
CAM-11	konzervované	3	2	5	5	2	M	M
CAM-20	ptačí	5	3	M	M	M	M	M
CAM-24	mikrosatelity	4	6	5	M	2	2	2

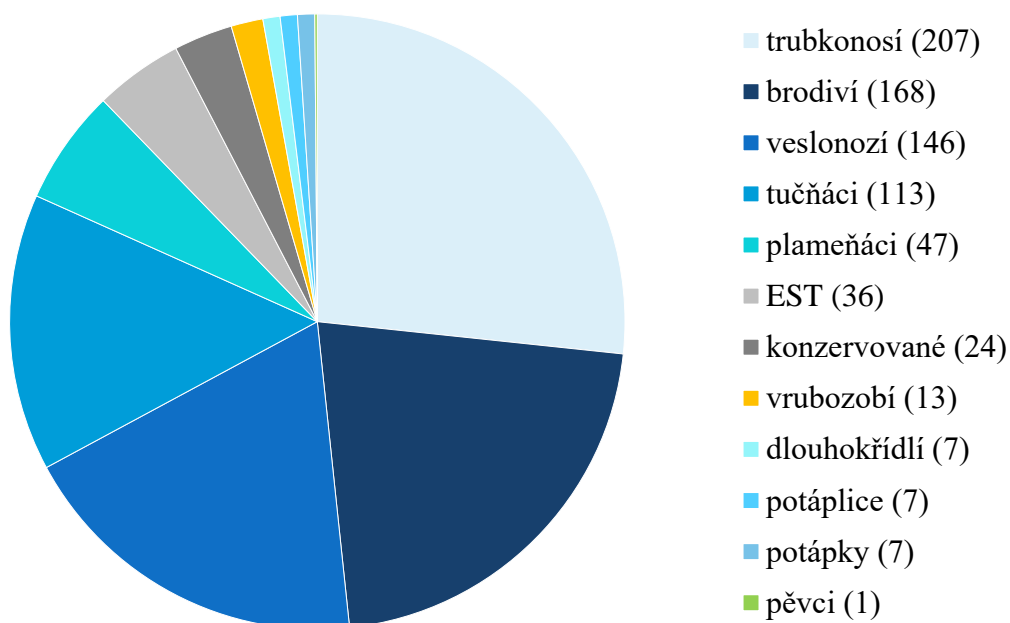
Ve sloupcích tabulky je uveden název lokusu, jeho zdroj a počet alel u jednotlivých analyzovaných druhů ptáků s počtem jedinců v závorkách: *Phorub* - plameňák karibský (tato práce), *Phoros* - plameňák růžový (Klaczová, 2018), *Podcri* - (Janušová, 2017), *Mycleu* - nesyt indomalajský (Pechová, 2014), *Pelphi* - pelikán skvrnozobý (Šuláková, 2017) a *Pelruf* - pelikán africký (Adámková, 2019). M - monomorfní lokus, NT - netestováno.

Z tabulky č. 7 je patrné, že z charakterizovaných polymorfních *cross-species* mikrosatelitů z řádu tučňáci a univerzálních ptačích mikrosatelitů je nejuniverzálnějším markrem konzervovaný ptačí mikrosatelit CAM-24, který byl polymorfní u šesti ze sedmi

analyzovaných druhů vodních ptáků a jen u nesýta indomalajského byl tento mikrosatelit monomorfní. U pěti druhů byly polymorfní lokusy Emm5 od tučňáka nejmenšího a CAM-11 z konzervovaných ptačích mikrosatelitů. Lokus Ech005 od tučňáka žlutorohého a Man27 od tučňáka žlutookého vykazoval polymorfismus u 3 druhů. Ostatní mikrosatelity byly polymorfní pouze u plameňáka karibského a jednoho dalšího druhu (Ech009, Ech011, Ech024 a Ech030 od tučňáka žlutorohého, Em2 a Em23 od tučňáka nejmenšího, Man47 a Man55 od tučňáka žlutookého, PNN08 od tučňáka brýlového, TG04-061 z EST ptačích mikrosatelitů a CAM-20 z konzervovaných ptačích mikrosatelitů).

Pro plameňáka karibského bylo v rámci Laboratoře populační genetiky na Katedře buněčné biologie a genetiky provedeno testování polymorfismu na DNA 6 nepříbuzných jedinců celkem 776 párů primerů pro amplifikaci mikrosatelitů (Drobek, 2008; Drobek, 2010; Matošková, 2011; Buržáková, 2013; Strejčková, 2016; Zlochová, 2017; tato práce). Celkem bylo testováno 168 párů primerů z řádů brodiví (Ciconiiformes - v tradičním pojetí), 146 párů primerů z řádu veslonozí (Pelecaniformes - v tradičním pojetí), 7 párů primerů od dlouhokřídých, 7 párů primerů od potáplic, 13 párů primerů od vrubozobých, 7 párů primerů od potápek, 47 párů primerů od plameňáků, 207 párů primerů od trubkonosých, 1 pár primerů z řádu pěvců, 113 párů primerů od tučňáků, 36 párů primerů pro amplifikaci EST ptačích mikrosatelitů a 24 párů primerů pro konzervované ptačí mikrosatelity. Relativní zastoupení testovaných lokusů od jednotlivých řádů (skupin) ptáků je znázorněné v grafu č. 1. Většina párů primerů pro amplifikaci mikrosatelitů pocházela od druhů z kladu Aequorlitorornithes (s výjimkou 13 lokusů od vrubozobých a 1 od pěvců) a dalšími byly univerzální ptačí mikrosatelity (EST ptačí mikrosatelity a konzervované ptačí mikrosatelity).

Graf č. 1: Všechny páry primerů pro amplifikaci mikrosatelitů testované během více než 10 let u plameňáka karibského v Laboratoři populační genetiky na Katedře buněčné biologie a genetiky PřF UPOL.

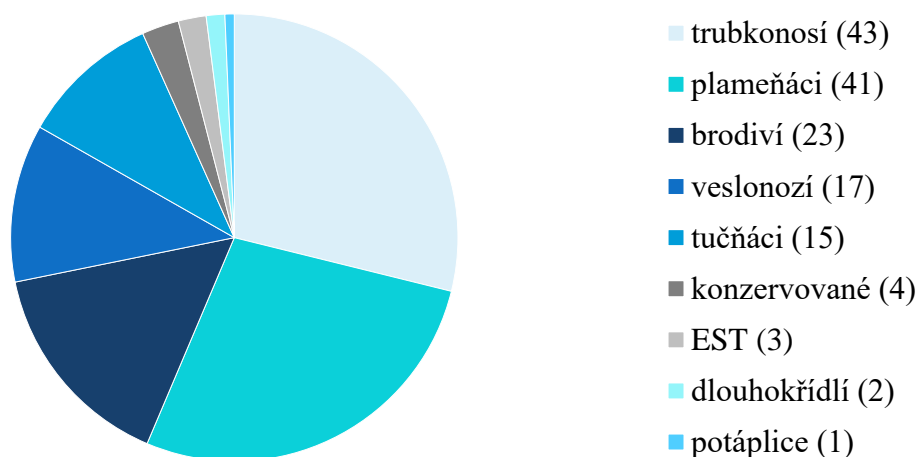


Graf znázorňuje počty všech testovaných párů primerů pro amplifikaci mikrosatelitů podle řádů (skupin), ze kterých pocházejí. Odstíny modré znázorňují skupiny ptáků řazených do kladu *Aequorlitorornithes* (Prum *et al.*, 2015), odstíny šedé jsou vyvedeny univerzální ptačí mikrosatelity, oranžově jsou znázorněni vrubozobí a světle zeleně pěvci.

Ze zmíněných 776 párů primerů pro amplifikaci mikrosatelitů bylo kompletně charakterizováno na DNA 30 nepříbuzných jedinců 149 nezávislých polymorfních lokusů (Drobek, 2010; Buržáková, 2013; Strejčková, 2018; tato práce). Průměrně tedy byly pro plameňáka karibského nalezeny a charakterizovány nezávislé polymorfní mikrosatelity s pravděpodobností 19,2 %. Konkrétně se jednalo o 23 mikrosatelitů z řádu brodiví (*Ciconiiformes* - v tradičním pojetí), 17 lokusů z řádu veslonozí (*Pelecaniformes* - v tradičním pojetí), 2 lokusy od dlouhokřídlech, 1 mikrosatelit z řádu potáplice, 15 lokusů z řádu tučňáci, 41 mikrosatelitů od plameňáků, 43 lokusů od trubkonosých, 3 EST ptačí mikrosatelity a 4 konzervované ptačí mikrosatelity. Relativní zastoupení nezávislých polymorfních lokusů z jednotlivých řádů (skupin) je znázorněno v grafu č. 2.

Tato diplomová práce se zabývala charakteristikou celkem 22 nezávislých polymorfních mikrosatelitů, což je 14,8 % ze všech 149 dosud charakterizovaných nezávislých polymorfních mikrosatelitů analyzovaných u plameňáka karibského.

Graf č. 2: Všechny nezávislé polymorfní mikrosatelity charakterizované u plameňáka karibského v Laboratoři populační genetiky na Katedře buněčné biologie a genetiky PřF UPOL.



Graf znázorňuje všechny charakterizované nezávislé polymorfní mikrosatelity v závislosti na řádech (skupinách), ze kterých byly odvozeny. Barevné rozdělení jednotlivých skupin je stejné jako v grafu č. 1, odstíny modré znázorňují skupiny ptáků řazených do kladu Aequorlornithes (Prum *et al.*, 2015) a odstíny šedé jsou vyvedeny univerzální ptačí mikrosatelity.

Porovnáním hodnot uvedených v grafu č. 1 a 2 lze dospět k poznatku, že u plameňáka karibského byla úspěšnost amplifikace nezávislého polymorfního lokusu z kladu Aequorlornithes 23,68 %, zatímco amplifikace polymorfního univerzálního ptačího mikrosatelitu proběhla s pravděpodobností 12,5 %. V případě 13 párů primerů pro amplifikaci lokusů od vrubozobých a 1 páru primerů od pěvců nedošlo u plameňáka karibského k amplifikaci žádného polymorfního lokusu.

Konkrétnějším rozbořením výsledků lze vyhodnotit, že nejméně úspěšně došlo k amplifikaci nezávislých polymorfních mikrosatelitů z řádu plameňáci, kde bylo charakterizováno 41 polymorfních lokusů z celkových 47 testovaných, což je 87,23 %. Druhou skupinou, ze které byla vysoká úspěšnost amplifikace nezávislého polymorfního lokusu je řád dlouhokřídlí, kde bylo celkem testováno ovšem pouze 7 párů primerů a charakterizovány byly 2 nezávislé polymorfní mikrosatelity, tedy 28,57 %. Třetím řádem, ze kterého bylo charakterizováno více než 20 % nezávislých polymorfních lokusů, byl řád trubkonosí, kde bylo celkem testováno 207 párů primerů a z nich bylo charakterizováno celkem 43 nezávislých polymorfních lokusů, což je 20,77 %. V případě lokusů od potáplic byla pravděpodobnost amplifikace polymorfního lokusu 14,29 %, ale zde bylo také testováno opět pouze 7 párů primerů, ze kterých byl 1 lokus polymorfní.

Polymorfni mikrosatelity z řádu brodiví (v tradičním pojetí) byly amplifikovány s úspěšností 13,69 %, tedy 23 lokusů ze 168 testovaných. Od tučňáků bylo charakterizováno 15 nezávislých polymorfni mikrosatelitů ze 113 testovaných, což je 13,27 %. V rámci kladu Aequorlitorornithes byla nejnižší úspěšnost (11,64 %) při amplifikaci polymorfni lokusů z řádu veslonozí (v tradičním pojetí) kde bylo charakterizováno pouze 17 lokusů ze 148 testovaných. Od potápek nebyl amplifikován žádný polymorfni produkt, což může být způsobeno tím, že z tohoto řádu bylo v Laboratoři populační genetiky celkem testováno pouze 7 párů primerů.

Z univerzálních ptačích mikrosatelitů byly úspěšněji amplifikovány polymorfni lokusy z konzervovaných ptačích mikrosatelitů, kde byly z celkových 24 testovaných lokusů charakterizovány 4 polymorfni mikrosatelity, tedy 16,67 %. Nižší pravděpodobnost amplifikace polymorfniho lokusu (pouze 8,33 %) byla u EST ptačích mikrosatelitů, zde bylo testováno celkem 36 párů primerů a u plameňáka karibského byly polymorfni pouze 3 lokusy.

Vzhledem k tomu, že byla u plameňáka karibského tak vysoká úspěšnost amplifikace nezávislých polymorfni mikrosatelitů odvozených od druhů z kladu Aequorlitorornithes, navrhuji otestovat polymorfismus u dalších mikrosatelitových lokusů z tohoto kladu, které ještě testované nebyly. Především bych doporučila použít páry primerů pro amplifikaci mikrosatelitů odvozených od plameňáků, které zatím testované nebyly (Bauer, 2007; Zaccara *et al.*, 2011; Frias-Soler *et al.*, 2014). Dále by bylo vhodné otestovat více lokusů z řádů dlouhokřídlí (Küpper *et al.*, 2007; Farrell *et al.*, 2012) a potápky (Humple, 2009), jelikož z těchto řádů bylo zatím testováno pouze po 7 lokusech a konkrétně například v případě mikrosatelitů od potápek lze očekávat vyšší četnost polymorfismu, protože jsou potápky a plameňáci už dlouhou dobu řazeni v systému ptáků jako sesterské skupiny (Hackett *et al.*, 2008; Yuri *et al.*, 2013; Jarvis *et al.*, 2014; Prum *et al.*, 2015; Reddy *et al.*, 2017). Mohly by být také otestovány další lokusy z řádů tučňáci (Vianna *et al.*, 2017), trubkonosí (Danckwerts *et al.*, 2016; Booth Jones *et al.*, 2017), brodiví (Ciconiiformes - v tradičním pojetí) (Turjeman *et al.*, 2016; Wirtz *et al.*, 2016), veslonozí (Pelecaniformes - v tradičním pojetí) (Rodrigues *et al.*, 2017) a od kagu chocholatého (Stoeckle *et al.*, 2012).

6 Závěr

V této diplomové práci jsem se zabývala analýzou a charakteristikou vybraných polymorfních *cross-species* mikrosatelitů u plameňáka karibského (*Phoenicopus ruber*). Jednalo se o lokusy z řádu tučňáci, EST ptačí mikrosatelity a konzervované ptačí mikrosatelity, které jsem analyzovala pomocí *cross-species* PCR amplifikace a následné elektroforetické separace v 6% polyakrylamidovém gelu za denaturujících podmínek.

Podkladem pro tuto diplomovou práci byla především bakalářská práce Zlochové (2017), která pro plameňáka karibského našla ze 169 testovaných mikrosatelitů 23 polymorfních lokusů a z těchto jsem 21 polymorfních lokusů vygenotypovala na DNA 30 nepříbuzných jedinců plameňáka karibského. Další polymorfní lokus (Emm5) jsem získala opakovaným testováním 12 mikrosatelitů, které byly polymorfní u sesterského druhu, plameňáka růžového (Klaczalová, 2018).

Celkem jsem tedy amplifikovala pro plameňáka karibského 22 nezávislých polymorfních *cross-species* mikrosatelitů, z nichž je 15 lokusů odvozeno od druhů z řádu tučňáci (6 lokusů od tučňáka žltorohého, 3 lokusy od t. nejmenšího, 3 lokusy od t. žlutookého, 2 lokusy od t. brýlového a 1 lokus od t. Humboldtova), 3 EST ptačí mikrosatelity a 4 konzervované ptačí mikrosatelity. U všech 22 lokusů jsem určila genotypy (našla jsem 2–16 alel) a následně jsem mikrosatelity charakterizovala v programu Cervus 3.0.6 a pomocí programu Genepop 4.2 jsem analyzovala, zda nejsou některé lokusy ve vazbě.

Pro plameňáka karibského je v současné době nalezeno a charakterizováno na DNA 30 nepříbuzných jedinců celkem 149 nezávislých polymorfních mikrosatelitů, z nichž je 141 *cross-species* a 8 *de novo*.

7 Seznam použitých zkratek

A	adenin
C	cytozin
CAM	<i>conserved avian microsatellite</i> (konzervovaný ptačí mikrosatelit - původ názvu mikrosatelitu)
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i> (deoxyribonukleová kyselina)
EST	<i>expressed sequence tag</i> (exprimovaný sekvenční úsek)
G	guanin
IUCN	<i>International Union for Conservation of Nature</i> (Mezinárodní svaz ochrany přírody)
LINEs	<i>long interspersed nuclear elements</i> (dlouhé rozptýlené jaderné repetice)
N	libovolný nukleotid (A, C, G nebo T)
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (polymerázová řetězová reakce)
PIC	<i>polymorphic information content</i> (polymorfní informační obsah)
SINEs	<i>short interspersed nuclear elements</i> (krátké rozptýlené jaderné repetice)
SSRs	<i>simple sequence repeats</i> (opakování jednoduchých sekvencí / jednoduché opakující se sekvence)
STRs	<i>short tandem repeats</i> (krátká tandemová opakování)
T	thymin
T _a	teplota <i>annealingu</i>
TG	<i>Taeniopygia</i> a <i>Gallus</i> (původ názvu mikrosatelitu)
t _s	délka elektroforetické separace produktů PCR amplifikace v 6% polyakrylamidovém gelu za denaturujících podmínek
VNTRs	<i>variable number tandem repeats</i> (variabilní počet tandemových opakování)

8 Literatura

- Adámková, V. (2019): *Cross-species* amplifikace mikrosatelitů z řádu tučňáci a konzervovaných ptačích mikrosatelitů u pelikána afrického (*Pelecanus rufescens*). Bakalářská práce (Dep. in: Knihovna biologických oborů PřF UP v Olomouci).
- Ahmed, S., Hart, T., Dawson, D. A., Horsburgh, G. J., Trathan, P. N. et Rogers, A. D. (2009): Isolation and characterization of macaroni penguin (*Eudyptes chrysolophus*) microsatellite loci and their utility in other penguin species (Spheniscidae, AVES). *Molecular Ecology Resources*, 9, 1530–1535.
- Akst, E., Boersma, P. et Fleischer, R. (2002): A comparison of genetic diversity between the Galápagos Penguin and the Magellanic Penguin. *Conservation Genetics*, 3, 375–383.
- Allendorf, F. W., Luikart, G. H., et Aitken, S. N. (2012): *Conservation and the Genetics of Populations*. John Wiley & Sons Ltd, Chichester.
- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schäffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. et Lipman, D. J. (1997): Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acid Research*, 25, 3389–3402.
- Anonymous (2018): BirdLife International *Phoenicopterus ruber*. The IUCN Red List of Threatened Species. Navštíveno na: <https://www.iucnredlist.org>, 18. 4. 2019.
- Bauer, A. 2007: Isolation of polymorphic microsatellites in *Phoenicopterus ruber* / *P. roseus*. Diplomová práce (Dep. in: Institute of Pharmacy and Molecular Biotechnology, Heidelberg University, Heidelberg, Germany).
- Bennett, P. (2000): Demystified ...: Microsatellites. *Molecular Pathology*, 53, 177–183.
- Billing, T. M., Guay, P. J., Peucker, A. J. et Mulder, R. A. (2007): Isolation and characterization of polymorphic microsatellite loci for the study of paternity and population structure in the little penguin *Eudyptula minor*. *Molecular Ecology Notes*, 7, 425–427.

- Biscotti, M. A., Olmo, E. *et* Heslop-Harrison, J. P. (2015): Repetitive DNA in eukaryotic genomes. *Chromosome Research*, 23, 415–420
- Boessenkool, S., King, T. M., Seddon, P. J. *et* Waters, J. M. (2008): Isolation and characterization of microsatellite loci from the yellow-eyed penguin (*Megadyptes antipodes*). *Molecular Ecology Resources*, 8, 1043–1045.
- Booth Jones, K. A., Nicoll, M. A., 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. *et* Norris, K. (2017): Widespread gene flow between oceans in a pelagic seabird species complex. *Molecular ecology*, 26, 5716–5728.
- Brown, R. M. *et* 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.
- Buržáková, K. (2013): Analýza a charakteristika polymorfních *cross-species* mikrosatelitů u plameňáka karibského (*Phoenicopterus ruber*). Diplomová práce (Dep. in: Knihovna biologických oborů PřF UP v Olomouci).
- Campbell, N. A. *et* Reece, J. B. (2006): *Biologie*. Computer Press, Brno.
- Dakin, E. E. *et* Avise, J. C. (2004): Microsatellite null alleles in parentage analysis. *Heredity*, 93, 504–509.
- Danckwerts, D. K., Corré, S., Pinet, P., Le Corre, M. *et* Humeau, L. (2016): Isolation and characterization of 15 polymorphic microsatellite loci for the Barau's Petrel (*Pterodroma baraui*), an endangered endemic of Reunion Island (Indian Ocean). *Waterbirds*, 39, 413–417.
- Dawson, D. A., Ball, A. D., Spurgin, L. G., Martín-Gálvez, D., Stewart, I. R., Horsburgh, G. J., Potter, J., Molina-Morales, M., Bicknell, A. W. J., Preston, S. A. J., Ekblom, R., Slate, J. *et* Burke, T. (2013): High-utility conserved avian microsatellite markers enable parentage and population studies across a wide range of species. *BMC Genomics*, 14, 176.
- 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. *et* 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.
- del Hoyo, J., Elliott, A. *et* Sargatal, J. (Eds.) (1992): Handbook of the birds of the world. Vol. 1, Ostrich tu ducks. Lynx Edicions, Barcelona.
- Drobek, A. (2008): Studium paternity u plameňáků (*Phoenicopterus* sp.) pomocí analýzy mikrosatelitové DNA. Bakalářská práce (Dep. in: Knihovna biologických oborů PřF UP v Olomouci).
- Drobek, A. (2010): Analýza mikrosatelitových lokusů pro determinaci paternity u plameňáka karibského (*Phoenicopterus ruber*) a plameňáka růžového (*P. roseus*). Diplomová práce (Dep. in: Knihovna biologických oborů PřF UP v Olomouci).
- Farrell, L. L., Dawson, D. A., Horsburgh, G. J., Burke, T. *et* Lank, D. B. (2012): Isolation, characterization and predicted genome locations of ruff (*Philomachus pugnax*, AVES) microsatellite loci. *Conservation genetics resources*, 4, 763–771.
- Filipová, K. (2016): *Cross-species* amplifikace mikrosatelitů z řádu tučňáci a konzervovaných ptačích mikrosatelitů u potápky roháče (*Podiceps cristatus*). Bakalářská práce (Dep. in: Knihovna biologických oborů PřF UP v Olomouci).
- Frias-Soler, R., Tindle, E., Lopez, G. E., Blomberg, S., Studer-Thiersch, A., Wink, M. *et* Tindle, R. (2014): Genetic and Phenotypic Evidence Supports Evolutionary Divergence of the American Flamingo (*Phoenicopterus ruber*) Population in the Galápagos Islands. *Waterbirds*, 37, 349–468.
- Given, A. D., Mills, J. A. *et* 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.
- Gosler, A. (1994): Atlas ptáků světa, České vydání 1. Příroda, Bratislava.
- Grosser, S. *et* Waters, J. M. (2015): Development and characterisation of 20 novel microsatellite markers for the little blue penguin (*Eudyptula minor*) using next-generation sequencing. *Conservation Genetics Resources*, 7, 143–145.

- Hackett, S. J., Kimball, R. T., Reddy, S., Bowie, R. C., 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. *et* Yuri, T. (2008): A phylogenomic study of birds reveals their evolutionary history. *Science*, 320, 1763–1767.
- Howard, R. *et* Moore, A. (1991): A complete checklist of the birds of the world. No. Ed. 2. Academic Press Ltd., Londýn.
- Humple, D. L. (2009): Genetic structure and demographic impacts of oil spills in Western and Clark's grebes. Dizertační práce (Dep. in: Department of Biology, Sonoma State University, Kalifornie).
- Janušová, D. (2017): Charakteristika vybraných polymorfních *cross-species* mikrosatelitů z kladu Aequorlitorinithes u potápky roháče (*Podiceps cristatus*). Diplomová práce (Dep. in: Knihovna biologických oborů PřF UP v Olomouci).
- 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., Jønsson, 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. *et* Zhang, G. (2014): Whole-genome analyses resolve early branches in the tree of life of modern birds. *Science*, 346, 1320–1331.

- Jeffreys, A. J., Wilson, V., et Thein, S. L. (1985): Individual-specific 'fingerprints' of human DNA. *Nature*, 316, 76–79.
- Kalinowski, S. T., Taper, M. L. et Marshall, T. C. (2007): Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. *Molecular Ecology*, 16, 1099–1106.
- Kang, S., Jung, J. W., Ahn, D. H., Lee, J. E., Kim, J. H. et Park, H. (2015): Isolation and characterization of polymorphic microsatellite loci from the chinstrap penguin, *Pygoscelis antarctica*. *Conservation Genetics Resources*, 7, 561–563.
- Klaczová, M. (2018): *Cross-species* amplifikace mikrosatelitů z řádu tučňáci a konzervovaných ptačích mikrosatelitů u plameňáka růžového (*Phoenicopterus roseus*). Bakalářská práce (Dep. in: Knihovna biologických oborů PřF UP v Olomouci).
- Küpper, C., Horsburgh, G. J., Dawson, D. A., French-Constant, R., Székely, T. et Burke, T. (2007): Characterization of 36 polymorphic microsatellite loci in the Kentish plover (*Charadrius alexandrinus*) including two sex-linked loci and their amplification in four other *Charadrius* species. *Molecular Ecology Notes*, 7, 35–39.
- Labuschagne, C., Kotzé, A., Grobler, P., Dalton, D. L. et van Wyk, A. M. (2013): Isolation and characterization of species-specific microsatellite loci in African penguin (*Spheniscus demersus*). *Conservation Genetics Resources*, 5, 169–171.
- Manišová, B. (2011): Analýza vybraných polymorfních *cross-species* mikrosatelitů pro determinaci paternity u plameňáka růžového (*Phoenicopterus roseus*). Bakalářská práce (Dep. in: Knihovna biologických oborů PřF UP v Olomouci).
- Matošková, T. (2011): Analýza vybraných polymorfních *cross-species* mikrosatelitů pro determinaci paternity u plameňáka karibského (*Phoenicopterus ruber*). Bakalářská práce (Dep. in: Knihovna biologických oborů PřF UP v Olomouci).
- Mehrotra, S., et Goyal, V. (2014). Repetitive Sequences in Plant Nuclear DNA: Types, Distribution, Evolution and Function. *Genomics, Proteomics*, 12, 164–171.

- Nagy, S., Poczai, P., Cernák, I., Gorji, A., Hegedűs, G. *et* Taller, J. (2012). PICcalc: an online program to calculate polymorphic information content for molecular genetic studies. *Biochemical Genetics*, 50, 670–672.
- Oliveira, E. J., Pádua, J. G., Zucchi, M. I., Vencovsky, R. *et* Vieira, M. L. C. (2006): Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. *Genetics and Molecular Biology*, 29, 294–307.
- Pechová, A. (2014): *Cross-species* amplifikace mikrosatelitů z řádu tučňáci a konzervovaných ptačích mikrosatelitů u nesyta indomalajského (*Mycteria leucocephala*). Bakalářská práce (Dep. in: Knihovna biologických oborů PřF UP v Olomouci).
- Prum, R. O., Berv, J. S., Dornburg, A., Field, D. J., Townsend, J. P., Lemmon, E. M. *et* Lemmon, A. R. (2015): A comprehensive phylogeny of birds (Aves) using targeted nextgeneration DNA sequencing. *Nature*, 526, 569–573.
- 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. *et* 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. *et* Verdugo, C. (2017): Characterisation of 11 microsatellite DNA markers from the Neotropic Cormorant (*Phalacrocorax brasilianus*). *Avian Biology Research*, 10, 45–48.
- Roeder, A. D., Marshall, R. K., Mitchelson, A. J., Visagathilagar, T., Ritchie, P. A., Love, D. R., Pakai, T. J., McPartlan, H. C., Murray, N. D., Robinson, N. A., Kerry, K. R. *et* Lambert, D. M. (2001): Gene flow on the ice: genetic differentiation among Adélie penguin colonies around Antarctica. *Molecular Ecology*, 10, 1645–1656.
- Rousset, F. (2008): Genepop'007: a complete re-implementation of the genepop software for Windows and Linux. *Molecular Ecology Resources*, 8, 103–106.
- Schlosser, J. A., Dubach, J. M., Garner, T. W. J., Araya, B., Bernal, M., Simeone, A., Smith, K. A. *et* Wallace, R. S. (2009): Evidence for gene flow differs from

- observed dispersal patterns in the Humboldt penguin, *Spheniscus humboldti*. *Conservation Genetics*, 10, 839–849.
- Sibley, C. G., Ahlquist, J. E. *et* Monroe, B. L. (1988): A Classification of the Living Birds of the World Based on DNA-DNA Hybridization Studies. *The Auk*, 105, 409–423.
- Snustad, D. P. *et* Simmons, M. J. (2017): *Genetika*. Druhé, aktualizované vydání. Vydavatelství MU, Brno.
- Stoeckle, B. C., Theuerkauf, J., Rouys, S., Gula, R., Lorenzo, A., Lambert, C., Kaeser, T. *et* Kuehn, R. (2012): Identification of polymorphic microsatellite loci for the endangered Kagu (*Rhynochetos jubatus*) by high-throughput sequencing. *Journal of Ornithology*, 153, 249–253.
- Strejčková, B. (2016): *Cross-species* amplifikace mikrosatelitů z řádu trubkonosí u plameňáka karibského (*Phoenicopterus ruber*). Bakalářská práce (Dep. In: Knihovna Biologických oborů PřF UP v Olomouci).
- Strejčková, B. (2018): Analýza a charakteristika polymorfních *cross-species* mikrosatelitů od trubkonosých u plameňáka karibského (*Phoenicopterus ruber*). Diplomová práce (Dep. In: Knihovna Biologických oborů PřF UP v Olomouci).
- Šuláková, M. (2017): *Cross-species* amplifikace mikrosatelitů z řádu tučňáci a konzervovaných ptačích mikrosatelitů u pelikána skvrnozobého (*Pelecanus philippensis*). Bakalářská práce (Dep. In: Knihovna Biologických oborů PřF UP v Olomouci).
- Thomas, G. H. (2015): An avian explosion. *Nature*, 526, 516–517.
- Tóth, G., Gáspári, Z. *et* Jurka, J. (2000): Microsatellites in Different Eukaryotic Genomes: Survey and Analysis. *Genome Research*, 10, 967–981.
- Turjeman, S. F., Centeno-Cuadros, A., *et* 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*, 39, 11–16.
- Vianna, J. A., Noll, D., Mura-Jornet, I., Valenzuela-Guerra, P., González-Acuña, D., Navarro, C., Loyola, D. E. *et* 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.

Weising, K., Nybom, H., Wolff, K. K. *et* Kahl, G. (2005): *DNA Fingerprinting in Plants: Principles, Methods, and Applications*, Second Edition. CRC Press, Boca Raton.

Winkler, D. W., Billerman, S. M. *et* Lovette, I. J. (2015): *Bird families of the world*. Lynx Edicions, Barcelona.

Wirtz, S., Böhm, C., Fritz, J., Hankeln, T. *et* Hochkirch, A. (2016): Isolation of microsatellite loci by next-generation sequencing of the critically endangered Northern Bald ibis, *Geronticus eremita*. *Journal of Heredity*, 107, 363–366.

Yuri, T., Kimball, R. T., Harshman, J., Bowie, R. C. K., Braun, M. J., Chojnowski, J. L., Han, K.-L., Hackett, S. J., Huddleston, C. J., Moore, W. S., Reddy, S., Sheldon, F. H., Steadman, D. W., Witt, C. C. *et* Braun, E. L. 2013: Parsimony and Model-Based Analyses of Indels in Avian Nuclear Genes Reveal Congruent and Incongruent Phylogenetic Signals. *Biology*, 2, 419–444.

Zaccara, S., Crosa, G., Vanetti, I., Binelli, G., Childress, B., McCulloch, G. *et* Harper, D. M. (2011): Lesser Flamingo *Phoeniconaias minor* as a nomadic species in African shallow alkaline lakes and pans: genetic structure and future perspectives. *Ostrich - Journal of African Ornithology*, 82, 95–100.

Zane, L., Bargelloni, L. *et* Patarnello, T. (2002): Strategies for microsatellite isolation. *Molecular Ecology*, 11, 1–16.

Zlochová, A. (2017): *Cross-species amplifikace mikrosatelitů z řádu tučňáci a konzervovaných ptačích mikrosatelitů u plameňáka karibského (Phoenicopterus ruber)*. Bakalářská práce (Dep. In: Knihovna Biologických oborů PřF UP v Olomouc

9 Přílohy

Příloha č. 1: Výstup z programu Cervus 3.0.6 (Kalinowski *et al.*, 2007) pro 22 polymorfních mikrosatelitů charakterizovaných na DNA 30 nepříbuzných jedinců plameňáka karibského. Ve sloupcích tabulky je uveden název lokusu, počet alel (k), počet genotypovaných jedinců (N), pozorovaná heterozygotnost (HObs), očekávaná heterozygotnost (HExp), obsah polymorfní informace (PIC), pravděpodobnost chybného přiřazení prvního rodiče v případě, že není známý ani jeden z rodičů (NE-1P), pravděpodobnost chybného přiřazení druhého rodiče v případě, že je známý první rodič (NE-2P), pravděpodobnost chybného přiřazení celého rodičovského páru (NE-PP), pravděpodobnost, že by se našli dva jedinci s identickou alelovou konstitucí pro příslušný lokus (NE-I) a pravděpodobnost, že by dva sourozenci měli identickou alelovou konstituci pro příslušný lokus (NE-SI), soulad s Hardy-Weinbergovou rovnováhou (HW) (NS - v souladu, ND - nelze hodnotit) a odhadovaná frekvence nulových alel (F(Null)).

Locus	k	N	HObs	HExp	PIC	NE-1P	NE-2P	NE-PP	NE-I	NE-SI	HW	F(Null)
Ech005	8	30	0.800	0.759	0.719	0.635	0.451	0.252	0.092	0.400	NS	-0.0592
Ech009	2	30	0.367	0.494	0.368	0.882	0.816	0.723	0.382	0.603	NS	0.1401
Ech011	2	30	0.333	0.364	0.294	0.936	0.853	0.768	0.476	0.690	NS	0.0354
Ech024	2	27	0.148	0.352	0.286	0.940	0.857	0.773	0.488	0.699	NS	0.3999
Ech030	5	30	0.767	0.713	0.649	0.721	0.551	0.375	0.141	0.435	NS	-0.0425
Ech039	16	30	0.800	0.927	0.904	0.304	0.179	0.052	0.015	0.298	ND	0.0639
Emm5	3	30	0.433	0.579	0.505	0.838	0.696	0.546	0.250	0.528	NS	0.1383
Em2	3	30	0.367	0.315	0.278	0.952	0.851	0.748	0.508	0.722	NS	-0.0956
Em23	7	30	0.733	0.703	0.653	0.712	0.532	0.338	0.134	0.438	NS	-0.0245

Locus	k	N	HObs	HExp	PIC	NE-1P	NE-2P	NE-PP	NE-I	NE-SI	HW	F (Null)
Man27	3	30	0.467	0.468	0.410	0.894	0.763	0.624	0.341	0.605	NS	0.0066
Man47	2	30	0.500	0.494	0.368	0.882	0.816	0.723	0.382	0.603	NS	-0.0141
Man55	3	30	0.667	0.518	0.396	0.870	0.793	0.688	0.355	0.584	NS	-0.1337
B3-2	5	30	0.567	0.786	0.737	0.624	0.445	0.264	0.088	0.385	NS	0.1543
PNN08	5	30	0.700	0.713	0.647	0.722	0.554	0.379	0.144	0.435	NS	0.0075
Sh2Ca21	2	30	0.133	0.183	0.164	0.984	0.918	0.856	0.689	0.832	ND	0.1488
TG03-002	2	30	0.300	0.259	0.222	0.967	0.889	0.814	0.588	0.769	ND	-0.0778
TG04-061	4	30	0.367	0.349	0.321	0.939	0.815	0.685	0.454	0.692	NS	-0.0252
TG22-001	2	30	0.133	0.127	0.117	0.992	0.942	0.893	0.774	0.881	ND	-0.0258
CAM-06	4	30	0.433	0.499	0.450	0.873	0.723	0.562	0.300	0.580	NS	0.0713
CAM-11	3	30	0.167	0.267	0.241	0.965	0.871	0.776	0.565	0.760	ND	0.2147
CAM-20	5	30	0.467	0.579	0.530	0.821	0.654	0.473	0.225	0.522	NS	0.1274
CAM-24	4	30	0.733	0.715	0.647	0.726	0.559	0.388	0.144	0.434	NS	-0.0326

Number of individuals:	30
Number of loci:	22
Mean number of alleles per locus:	4.182
Mean proportion of loci typed:	0.9955
Mean expected heterozygosity:	0.5074
Mean polymorphic information content (PIC):	0.4502
Combined non-exclusion probability (first parent):	0.00844553
Combined non-exclusion probability (second parent):	0.00014659
Combined non-exclusion probability (parent pair):	0.00000031
Combined non-exclusion probability (identity):	1.307E-0013
Combined non-exclusion probability (sib identity):	0.00000350