

Univerzita Palackého v Olomouci

Diplomová práce

Olomouc 2019

Bc. Dominika Verešová

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



**Analýza a charakteristika vybraných
polymorfních mikrosatelitů z řádů
trubkonosí a tučňáci a konzervovaných
ptačích mikrosatelitů u pelikána kadeřavého
(*Pelecanus crispus*) a u plameňáka růžového
(*Phoenicopterus roseus*).**

Diplomová práce

Bc. Dominika Verešová

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2019

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

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Akademický rok: 2018/2019

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Dominika VEREŠOVÁ**

Osobní číslo: **R180461**

Studijní program: **N1501 Biologie**

Studijní obor: **Molekulární a buněčná biologie**

Název tématu: **Analýza a charakteristika vybraných polymorfních mikrosatelitů z řádů trubkonosí a tučňáci a konzervovaných ptačích mikrosatelitů u pelikána kadeřavého (*Pelecanus crispus*) a u plameňáka růžového (*Phoenicopterus roseus*).**

Zadávatel: **Katedra buněčné biologie a genetiky**

Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

1. Vypracování rešerše na téma diplomové práce. 2. Shromáždění dostupných literárních zdrojů. 3. Amplifikace a charakteristika mikrosatelitových lokusů na DNA jedinců pelikána kadeřavého a plameňáka růžového z chovu ZOO Dvůr Králové; jedná se o mikrosatelity označené jako polymorfní v bakalářské práci studentky a dále v bakalářské práci studentky Moniky Klaclové. Tyto mikrosatelity srovnat s polymorfními lokusy charakterizovanými v diplomových pracích Veroniky Mikulové, Anny Chmelařové, Aleše Drobka a Barbory Málkové. Rozsah práce 60 stran

Rozsah grafických prací:

Rozsah pracovní zprávy:

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

- 1) Prum, R.O. et al. (2015). A comprehensive phylogeny of birds (Aves) using targeted next-generation DNA sequencing. *Nature*, 526, 569573.
- 2) Dawson, D.A. et al. (2013): High-utility conserved avian microsatellite markers enable parentage and population studies across a wide range of species. *BMC Genomics*, 14, 176.
- 3) Dawson, D.A. et al. (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, 475494.
- 4) Ahmed, S. et al. (2009): Isolation and characterization of macaroni penguin (*Eudyptes chrysolophus*) microsatellite loci and their utility in other penguin species (Spheniscidae, AVES). *Molecular Ecology Resources* 9, 15301535.
- 5) Bicknell, A.W.J. et al. (2011): Characterisation and predicted genome locations of Leach's storm-petrel (*Oceanodroma leucorhoa*) microsatellite loci (Procellariidae, Aves). *Conservation Genetics Resources* 3, 711716.



Vedoucí diplomové práce:

RNDr. Petr Nádvořník, Ph.D.

Katedra buněčné biologie a genetiky

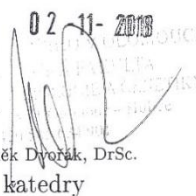
Datum zadání diplomové práce: **12. října 2018**

Termín odevzdání diplomové práce: **31. července 2020**

L.S.

doc. RNDr. Martin Kubala, Ph.D.
děkan

02-11-2018
FACULTA
Přírodovědné
vedoucí katedry



V Olomouci dne

Bibliografické údaje

Meno a priezvisko autora: Bc. Dominika Verešová

Názov práce: Analýza a charakteristika vybraných polymorfných mikrosatelitů z řádů trubkonosí a tučňáci a konzervovaných ptačích mikrosatelitů u pelikána kadeřavého (*Pelecanus crispus*) a u plameňáka růžového (*Phoenicopterus roseus*).

Typ práce: magisterská

Pracoviško: Katedra buněčné biologie a genetiky, PřF UP v Olomouci

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

Rok obhajoby práce: 2020

Klíčové slová: *cross-species* PCR amplifikácia, mikrosatelity, pelikán kučeravý, plameniák ružový, rúrkonosce, tučniaky, univerzálne vtáče mikrosatelity

Počet strán: 67

Počet príloh: 2

Jazyk: slovenčina

Súhrn

Táto diplomová práca sa venovala analýze a charakteristike vybraných polymorfných mikrosatelitových lokusov u plameniaka ružového a pelikána kučeravého pomocou metódy *cross-species* PCR amplifikácie.

V teoretickej časti bol popísaný fylogenetický vývoj vtákov celkovo, so zameraním na taxonomické zaradenie plameniaka ružového a pelikána kučeravého. Sú charakterizované mikrosatelity a ich identifikácia pri použití polymerázovej reťazovej reakcie (PCR). Koniec tejto časti bol zameraný na *de novo* mikrosatelity a vybrané polymorfné *cross-species* mikrosatelity u plameniakov, konkrétne plameniaka ružového a pelikánov, konkrétne pelikána kučeravého.

Experimentálna časť sa zaoberala *cross-species* PCR amplifikáciou 13 mikrosatelitových lokusov, odvodených pre vtáky z radu tučniaky a 11 univerzálnych vtáčích mikrosatelitových lokusov na DNA 22 nepríbuzných jedincov plameniaka ružového, ktoré boli pred tým určené ako polymorfné na DNA 6 nepríbuzných jedincov plameniaka ružového (Klaczová, 2018). Celkovo bolo nájdených 22 párov primerov, ktoré amplifikovali 23 polymorfných oblastí (2 polymorfné oblasti amplifikoval primerový pár pre lokus PNN08). Ďalej bolo amplifikovaných 12 mikrosatelitových lokusov, ktoré som označila v mojej bakalárskej práci ako polymorfné na DNA 6

jedincov pelikána kučeravého (Verešová, 2018). Lokusy, odvodené od zástupcov z radu rúrkonosce a bahniaky, boli amplifikované na DNA 41 jedincov pelikána kučeravého. Celkom 11 mikrosatelitových lokusov poskytlo polymorfny PCR produkt. Polymorfne lokusy boli programom Genepop 4.1 (Rousset, 2008) testované na väzbu a určené ako nezávislé. Program Cervus 3.0.6 (Kalinowski *et al.*, 2007) potom následne charakterizoval jednotlivé nezávislé lokusy pre plameniaka ružového a pelikána kučeravého.

Bibliographical identification

Author's first name and surname: Bc. Dominika Verešová

Title: Analysis and characterization of selected polymorphic microsatellites from the orders of the Tubinares and Penguins and preserved bird microsatellites in the Dalmatian pelican (*Pelecanus crispus*) and the American flamingo (*Phoenicopterus roseus*).

Type of thesis: master

Department: Department of cell biology and genetics, Faculty of Science UP Olomouc

Supervisor: RNDr. Petr Nádvorník, Ph.D.

The year of presentation: 2020

Keywords: cross-species PCR amplification, microsatellites, Dalmatian pelican, American flamingo, Tubinares, Penguins, universal bird microsatellites

Number of pages: 67

Number of appendices: 2

Language: Slovak

Summary

This master thesis dealt with the analysis and characteristics of selected polymorphic microsatellite loci in American flamingo and Dalmatian pelican using the method of cross-species PCR amplification.

The theoretical part described the phylogenetic development of birds in general, focusing on the taxonomic classification of American flamingo and Dalmatian pelican. Microsatellites and their identification using polymerase chain reaction (PCR) are characterized. The end of this part is focused on *de novo* microsatellites and selected polymorphic *cross-species* microsatellites in flamingos, specifically American flamingo and pelicans, specifically Dalmatian pelicans.

The experimental part deals with *cross-species* PCR amplification of 13 microsatellite loci derived for Penguin birds and 11 universal avian microsatellite loci on DNA of 22 unrelated individuals of American flamingo, which were previously determined to be polymorphic on DNA of 6 unrelated individuals of American flamingo (Kláclová, 2018). A total of 22 primer pairs were found that amplified 23 polymorphic regions (2 polymorphic regions were amplified by a primer pair for the PNN08 locus). Furthermore, 12 microsatellite loci were amplified, which I marked in my bachelor

thesis as polymorphic on the DNA of 6 individuals of the Dalmatian pelican (Verešová, 2018). Loci derived from representatives of the Tubinares and Shorebirds were amplified on the DNA of 41 individuals of the Dalmatian pelican. The polymorphic PCR products yielded a total of 11 microsatellite loci. Polymorphic loci were tested for linkage by Genepop 4.1 (Rousset, 2008) and determined to be independent. Then the Cervus 3.0.6 program (Kalinowski et al., 2007) characterized the individual independent loci for the American flamingo and the Dalmatian pelican.

Prehlasujem, že som túto diplomovú prácu vypracovala samostatne pod vedením RNDr. Petra Nádvorníka, Ph.D. s použitím uvedených literárnych zdrojov.

V Olomouci dňa 24. 7. 2020

.....

Veľké ďakujem patrí môjmu školiteľovi RNDr. Petru Nádvorníkovi, Ph. D., ktorý mi vždy ochotne pomáhal pri vykonaní praktickej časti tejto práce, za jeho rady a pomoc pri spracovaní diplomovej práce a v neposlednej rade ďakujem svojej rodine, ktorá mi dala zázemie a možnosť študovať.

Obsah

1	Úvod	1
2	Ciele práce	2
3	Literárny prehľad	3
3.1	Fylogenetický vývoj vtákov	3
3.2	Taxonomické zaradenie plameniaka ružového	6
3.2.1	Rad plameniáci (Pheonicopteriformes).....	7
3.2.2	Plameniak ružový.....	7
3.3	Taxonomické zaradenie pelikána kučeravého.....	8
3.4	Mikrosatelity	9
3.4.1	Problematická identifikácia mikrosatelitových produktov polymerázovej reťazovej reakcie (PCR)	12
3.5	Polymorfne mikrosatelity u plameniakov a pelikánov.....	14
3.5.1	<i>De novo</i> mikrosatelity u plameniakov.....	14
3.5.2	<i>Cross-species</i> mikrosatelity u plameniaka ružového	15
3.5.3	<i>De novo</i> mikrosatelity u pelikánov.....	16
3.5.4	<i>Cross-species</i> mikrosatelity u pelikána kučeravého.....	17
4	Materiál a metódy	18
4.1	Biologický materiál.....	18
4.2	Chemikálie	18
4.3	Roztoky	19
4.4	Laboratórne prístroje.....	21
4.5	Analyzované mikrosatelitové primery	21
4.6	<i>Cross-species</i> PCR amplifikácia	24
4.7	Elektroforetická separácia PCR produktov	25
5	Výsledky	28
5.1	Plameniak ružový.....	28
5.2	Pelikán kučeravý	34
6	Diskusia	39
6.1	Univerzálne vtáacie mikrosatelity a mikrosatelity odvodené pre tučniaky amplifikované u plameniaka ružového	39
6.2	Mikrosatelity odvodené pre rúrkonosce amplifikované u pelikána kučeravého	44

7	Záver	47
8	Použitá literatúra	48
9	Prílohy.....	63

Zoznam symbolov a skratiek

AFLP	dĺžkový polymorfizmus amplifikovaných fragmentov (z angl. <i>amplified fragment length polymorphism</i>)
DNA	deoxyribonukleová kyselina (z angl. <i>deoxyribonucleic acid</i>)
PCR	polymerázová reťazová reakcia (z angl. <i>polymerase chain reaction</i>)
RAPD	náhodne amplifikovaná polymorfna DNA (z angl. <i>randomly amplified polymorphic DNA</i>)
RFLP	dĺžkový polymorfizmus restričných fragmentov (z angl. <i>restriction fragment length polymorphism</i>)
SSRs	jednoduché repetitívne sekvencie (z angl. <i>simple sequence repeats</i>)
STRs	krátke tandemové repetície (z angl. <i>short tandem repeats</i>)

Zoznam grafov

Graf č. 1: Rozdelenie polymorfných mikrosatelitových primerových párov u plameniaka ružového na základe druhov, pre ktoré boli mikrosatelity pôvodne izolované.32

Graf č. 2: Rozdelenie polymorfných mikrosatelitových lokusov u pelikána kučeravého na základe druhov, pre ktoré boli mikrosatelity pôvodne izolované.37

Zoznam obrázkov

Obrázok č. 1: Porovnanie vtáčích fylogenez - Jarvis *et al.* (2014) a Prum *et al.* (2015) podľa Thomas *et al.* (2015).5

Obrázok č. 2: Elektroforetogram mikrosatelitového lokusu CAM-07 amplifikovaného pri T_a 56 °C u 22 nepříbuzných jedincov plameniaka ružového, s 3 detegovanými alelami.34

Zoznam tabuliek

Tabuľka č. 1: Prehľad 24 <i>cross-species</i> mikrosatelitov amplifikovaných u 6 jedincov plameniaka ružového, označených za polymorfne v práci Klaclovej (2018).	22
Tabuľka č. 2: Prehľad 12 <i>cross-species</i> mikrosatelitov amplifikovaných u 6 jedincov pelikána kučeravého, označených za polymorfne v mojej bakalárskej práci (Verešová, 2018).	23
Tabuľka č. 3: Zložky PCR mixu pre 22 a 41 vzoriek.	24
Tabuľka č. 4: Charakteristika 23 polymorfných mikrosatelitových lokusov testovaných na 41 nepříbuzných jedincov plameniaka ružového..	29
Tabuľka č. 5: Charakteristika 11 polymorfných mikrosatelitových lokusov testovaných na 41 nepříbuzných jedincov pelikána ružového.	35
Tabuľka č. 6: Prehľad polymorfných mikrosatelitov pôvodne navrhnutých pre vtákov z radu tučniaky a univerzálne vtáacie primery testovaných u rôznych druhov vodných vtákov v rámci testovania v Laboratóriu populačnej genetiky na Katedre bunčnej biologie a genetiky PŕF UPOL.	42
Tabuľka č. 7: Prehľad polymorfných mikrosatelitov pôvodne navrhnutých pre vtákov z radu rúrkonosce, resp. bahniaky, testovaných u rôznych druhov vodných vtákov v rámci testovania v Laboratóriu populačnej genetiky na Katedre bunčnej biologie a genetiky PŕF UPOL.	4

1 Úvod

Mikrosatelity sú typom tandemových repetícií, ktorých dĺžka repetitívnej jednotky je 1–10 párov bází. Vyskytujú sa skoro v celom genóme a vďaka ich vysokej variabilite sa využívajú ako genetické markery. V praxi sa veľmi často využívajú ako markery pre určovanie paternity živočíchov, pri cielelom rozmnožovaní konkrétnych jedincov a v ďalších populačno-genetických štúdiách. Mikrosatelity môžu byť odvodené *de novo* pre konkrétny druh, metódou *in silico* alebo pomocou *cross-species*.

Použitie metódy *cross-species* je výhodné medzi príbuznými druhmi, nakoľko nie je potrebné odvodzovať mikrosatelity *de novo* pre tieto druhy. Úspešnosť *cross-species* môže poskytnúť určité odpovede na príbuzenské vzťahy medzi živočíchmi v rámci ich vývojových fylogénéz.

Testovanie veľkého počtu *cross-species* mikrosatelitových lokusov sa zaoberá Laboratórium populačnej genetiky Katedry bunčnej biologie a genetiky na Přírodovědecké fakultě Univerzity Palackého v Olomouci. Testujú sa mikrosatelitové lokusy odvodené predovšetkým od zástupcov radov brodivce, bahniaky (Charadriiformes, česky dlouhokřídli), veslonožce, rúrkonosce (Procellariiformes, česky trubknosi), tučniaky a univerzálne vtáče mikrosatelity, izolované pre zebričku austrálsku (*Taeniopygia guttata*, česky zebříčka pestrá) a kuru červenú (*Gallus gallus*, česky kur bankivský) na DNA rôznych druhoch vodných vtakov patriacich do skupiny Aequorlitorניתhes.

V tejto práci sa zaoberám analýzou a charakteristikou mikrosatelitov, ktoré boli určené ako polymorfne v mojej (Verešová, 2018) a Klaclovej bakalárskej práci (Klaclová, 2018).

2 Ciele práce

1. Vypracovanie rešerše na tému diplomovej práce.
2. Zhromaždenie dostupných literárnych zdrojov.
3. Amplifikácia a charakteristika mikrosatelitových lokusov na DNA jedincoch pelikána kučeravého a plameniaka ružového z chovu ZOO Dvůr Králové; jedná sa o mikrosatelity označené ako polymorfné v bakalárskej práci študentky (2018) a ďalej v bakalárskej práci študentky Moniky Klačlovej (2018). Tieto mikrosatelity porovnať s polymorfnými lokusmi charakterizovanými v diplomových prácach Veroniky Mikulovej (2010), Anny Chmelařovej (2012), Aleša Drobka (2010) a Barbory Málkovej (2013).

3 Literárny prehľad

3.1 Fylogenetický vývoj vtákov

V rámci stavovcov sú vtáky jednou z najvýraznejších skupín živočíchov. Sú nesmierne rozmanité, rozmiestnené po celom svete, zaplňajú celý rad ekologických nik a siahajú od veľkosti malého kolibríka až po mohutného pštrosa. Spolu s ich pernatými telami optimalizovanými pre let, rýchlym metabolizmom, vyvinutými zmyslami, schopnosťou napodobňovať vokalizácie či používať nástroje z nich robia jedny z najinteligentnejších organizmov na planéte (Brusatte *et al.*, 2015).

Podľa Mindella *et Brown* (2008) bolo do roku 2008 žijúcich približne 9 až 10 000 druhov vtákov patriacich do 20–28 radov triedy Aves. Postupne sa však počet druhov vtákov rapídne zvýšil cca na 11 000 druhov. Tento vzrast nebol zapríčinený novoobjavenými druhmi, ale pokročilejšími technológiami, ktoré umožnili zachytiť detailnejšie informácie o jednotlivých genómoch vtákov, a využitím týchto poznatkov pre stanovenie taxonomických jednotiek pre presné rozpoznávanie medzi druhmi navzájom.

Až na pár výnimiek, molekulárna fylogenetická analýza podporila rozdelenie na základe morfológie na monofyletickú skupinu Palaeognathae, kam sa zaraďujú nelietavé druhy ako kivi, pštrosy, emu a skupinu Neognathae, tvoriace zvyšok vtácej diverzity. K tomuto rozdeleniu došlo asi pred 120 miliónmi rokov. Toto rozdelenie je podporené štúdiami morfológie (Cracraft *et Clarke*, 2001), jadrovej DNA (García-Moreno *et Mindell*, 2000) a štúdiami mitochondriálnych genómov (Harrison *et al.*, 2004).

Asi o 15 miliónov rokov, sa Neognathae začali formovať na ďalšie dva nadrady, ktoré boli spájané s prerozdeľovaním kontinentov. Na základe sekvenovania dlhších sekvencií z jadrových génov sa vyčlenil nadrad Galloanseres obsahujúci rad zúbkozobce (Anseriformes, česky vrubozobí) a hrabavce (Galiformes, česky hrabaví) (Cracraft *et al.*, 2004). Zvyšok skupiny Neognathae, obsahujúci všetko od holubov a sov až po sokoly a papagáje, sa nazýva Neoaves (Van Tuinen, 2009). Avšak fylogenetické vzťahy v tomto nadrade nie sú dodnes úplne a jasne rozlúštené (Pratt *et al.*, 2008). Odkrývanie hlbokých fylogenetických vzťahov u týchto vtákov je náročné, nakoľko sú výsledkom rapídnej divergencie na začiatku ich evolučnej histórie (Chojnowski, *et al.*, 2008).

Hackett *et al.* (2008) zhromaždili veľký súbor údajov o sekvenciách DNA od 169 druhov vtákov skupiny Neoaves k riešeniu fylogenetických vzťahov. Prvú skupinu fylogenetického rozdelenia tvoria suchozemské vtáky obsahujúce rad spevavce (Passeriformes), ktorý je spojenými s ďalšími morfológicky odlišnými radmi ako šplhavce (Piciformes), sokoli (Falconiformes), sovy (Strigiformes), papagáje (Psittaciformes) a podobne. V druhej skupine sa nachádza klad s vodnými vtákmi, zahrňujúci členov radov veslonožce (Pelecaniformes), brodivce (Ciconiiformes), rúrkonosce (Procellariiformes, česky trubkonosí), tučniaky (Sphenisciformes) a potáplice (Gaviiformes) (Ericson *et al.*, 2006). Sesterskú skupinu k týmto vodným vtákom tvoria turaká (Musophagiformes) a k oboj týmto skupinám je príbuzný klad tvorený krátkokrídlivcami (Gruiformes), kukučkami (Cuculiformes) a dropmi (Otididae).

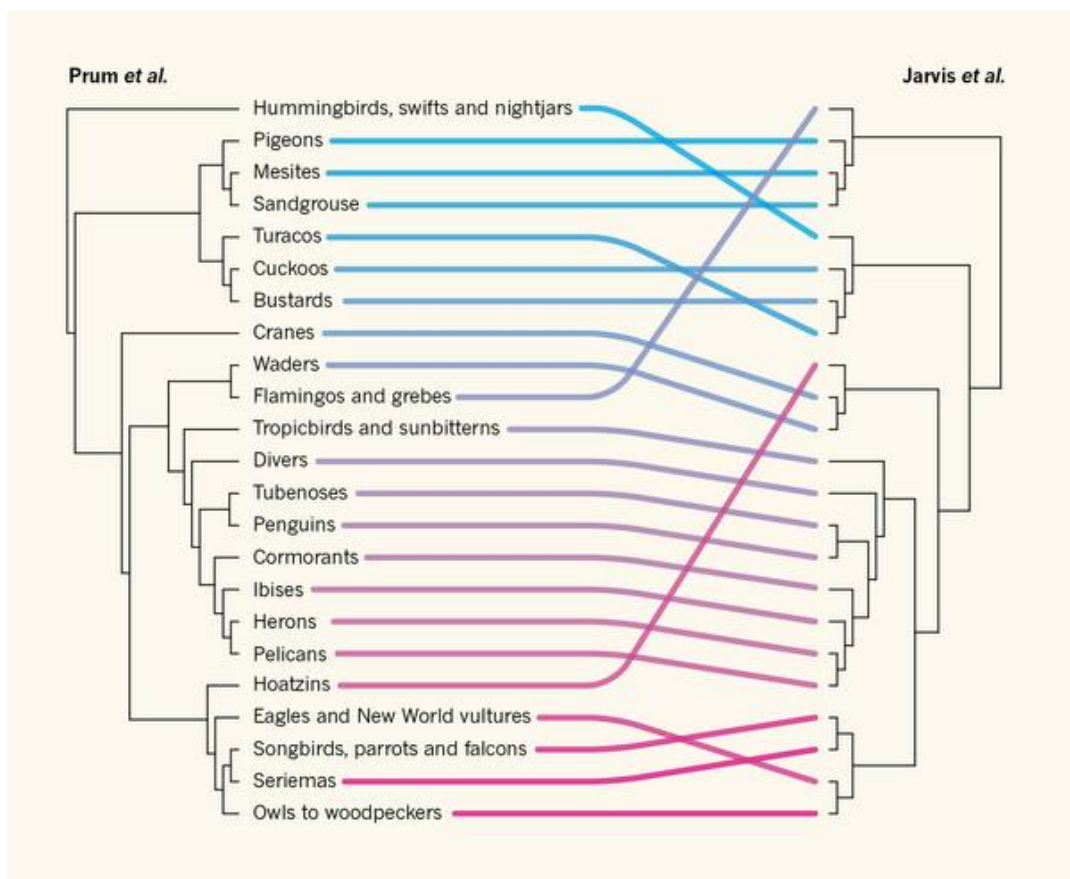
Podľa datovanej fylogény Jarvisa *et al.* (2014), spoločný predok vtákov Neoaves žil v mezozoiku, v kriede. Predpokladá sa, že tento predchodca by mohol byť ekologicky podobný k dnešným moderným vtákom. Po vyhynutí niekoľkých skupín vtákov na konci kriedy došlo k rýchlej speciácii druhov a k vzniku dvoch hlavných skupín. Prvou z nich je Columbea a druhú skupinu vtákov tvoria zástupcovia kladu Passerea, ktorý je rozdelený na suchozemské (Telluraves) a vodné vtáky (Aequornithia) (Ericson *et al.*, 2006).

Je dávno známe, že fylogenetické tvrdenia sa nevytvárajú len na základe počtu analyzovaných vzoriek a ich vývojového stupňa, ale závisia aj od počtu a od vzťahov jednotlivých taxónov, ktoré boli zozbierané v závislosti od rôznych bodov záujmu (Townsend *et Lopez-Giraldez*, 2010).

Podľa Pruma *et al.* (2015) je použitie 48 vtáčích druhov pre štúdium fylogény vtákov založené na genomickej analýze nedostatočné na to, aby s istotou vyriešila hlboké fylogenetické vzťahy medzi hlavnými skupinami moderných vtákov. Z tohto dôvodu odobrali vzorky 198 druhom vtákov a skúmali 394 lokusov z konzervovaných oblastí genómu (Lemmon *et al.*, 2012). Výsledky analýzy potvrdili tradičné rozdelenie vtákov, avšak v rámci skupiny Neoaves sa fylogenetický strom výrazne líšil od predchádzajúcej štúdie Jarvisa *et al.* (2014). Prum *et al.* (2015) rozdeľujú moderné vtáky celkovo na 5 skupín a to tak, že prvé dve skupiny sú na rovnakej úrovni, avšak druhá skupina sa opäť delí na dve skupiny pokračujúc takto až do piatej úrovne. To znamená, že každá skupina je po sebe idúcou sesterskou skupinou k zostávajúcim ďalším skupinám.

Z obrázka č. 1 je jasné, že Jarvisove *et al.* (2014) a Prumove *et al.* (2015) fylogenetické stromy sa výrazne líšia a to hlavne v najvyšších uzloch hierarchie, najviac viditeľnej u vodných vtákov (Thomas, 2015). V ďalších dielčích skupinách také výrazne zmeny nie sú. Prum *et al.* (2015) si tieto nezrovnalosti odôvodňujú fenoménom nazývaným „príťažlivosť dlhých vetví“ (z angl. *long-branch attraction*). K tomuto javu dochádza, keď evolučne vzdialení príbuzní sú nesprávne považovaní za blízkych príbuzných. Takáto interpretácia je možná, pokiaľ evolúcia prebehla mimoriadne vysokou mierou alebo keď daná línia nemá žiadnych blízkych príbuzných. Thomas (2015) tiež tvrdí, že veľa fylogenetických vzťahov by sa zásadne zmenilo v prípade, ak by Prum *et al.* (2015) zúžili svoj výskum na 48 druhov.

Obrázok č. 1: Porovnanie vtáčích fylogenez - Jarvis *et al.* (2014) a Prum *et al.* (2015) podľa Thomas *et al.* (2015).



Naopak Reddy *et al.* (2017) na základe svojich výskumov zistili, že aj napriek zvýšenému počtu odobratých vzoriek z ďalších taxónov, fylogenetické vzťahy jednotlivých skupín vtákov na základe Jarvisovej *et al.* (2014) analýzy sa práve

utvrďujú. Najpravdepodobnejší dôvod vysvetlenia rozdielnych fylogenetických stromov je využitie rôznych typov údajov. Konkrétne, analýza zmesi exónov, intrónov a ultrakonzervovaných elementov v štúdií Jarvisa *et al.* (2014) a použitia primárneho kódovania exónov v experimentoch Pruma *et al.* (2015).

Otázkou ale naďalej zostáva, či fylogenomika dokáže objasniť všetky evolučné spojitosti a či fylogenetické softvéri sú dostatočné a presné na rozriešenie zložitých fylogenetických stromov triedy vtákov. Je pravdepodobné, že riešenie evolučných vzťahov pomocou rôznych programov, poskytne odlišné výsledky v dôsledku rutinných numerických optimalizácií. Preto je nutné jednotlivé výsledky hodnotiť rovnakými analýzami a následne potom charakterizovať tieto výsledky ďalšími programami (Reddy *et al.*, 2017).

3.2 Taxonomické zaradenie plameniaka ružového

Plameniáci sú skupina vodných vtákov, ktorých taxonomické zaradenie sa považovalo za jedno z najkontroverznejších a z najdlhopretrvávajúcich problémov vtácej fylogeny. Na základe morfológie boli za najpriamejších príbuzných plameniakov považované dlhonohé brodivce alebo zúbkozobce kvôli podobne stavanému zobáku (Sibley *et Ahlquist*, 1990). Napriek tomu, plameniáci vykazujú unikátne znaky spojené s ich životným štýlom kŕmenia.

Analýzou mitochondriálnych a jadrových sekvencií, van Tuinen *et al.* (2001) zistili fylogenetickú príbuznosť medzi plameniakmi a potápkami (Podicipedidae) a to s vysokou štatistickou podporou. Tieto príbuzenské vzťahy tak môžu poukazovať aj na príklad vývoja odlišnej stratégie kŕmenia (van Tuinen *et al.*, 2001), kedy plameniaky filtrujú vodu s potravou (Zweers *et al.*, 1994), a potápkky sa naopak živia rybami a malými článkonožcami (del Hoyo, 1992). Mayr (2004) na základe najskôr prehliadaných morfológických, oologických, parazitologických a aj molekulárnych dôkazov, potvrdzuje sesterský klad plameniáci - potápkky ako jeden z najpodporovanejších kladov moderných vtákov.

Fylogenetický systém vytvorený Hackettom *et al.* (2008) vyčleňuje klad plameniaky - potápkky k typicky vodným vtákom a ako ich najbližších príbuzných uvádza vtákov z čeľade faetonovité (Phaetontidae) a skupinu suchozemských vtákov Columbimorphae, do ktorej sa zaraďujú stepokurovité, mäkkozobí a mesitovité. Táto spojitosť naznačuje, že vodné aj suchozemské adaptácie týchto vtákov sú konvergentné

(Mayr, 2004). Jarvis *et al.* (2014) však vyčleňujú faetonov z týchto vzťahov a za ich najbližších príbuzných označujú pachriaštele (Eurypygiformes, česky slunatci). Naopak Prum *et al.* (2015) ponechávajú vtákov z nadradu Columbimorphae v rámci skupiny Columbaves a príbuzenský klad plameniáci - potápky uvádzajú ako najpríbuznejší s vtákmi skupiny bahniaky (Charadriiformes, česky dlouhokřídli) v skupine vodných vtákov Aequorlitorornithes.

3. 2. 1 Rad plameniáci (Pheonicopteriformes)

Z druhovej pestrosti je rad plameniáci jedným z najmenších radov súčasnosti. Podľa rôznych autorov zahŕňa 5 alebo 6 druhov a nie je tiež jasné, či tieto druhy patria do dvoch či troch rodov. Prvým z nich je *Phoenicopterus* s členmi ako plameniák ružový (*P. roseus*), plameniák červený (*P. ruber*, česky plameňák karibský) a plameniák čilský (*P. chilensis*). Druhý rod *Phoenicoparrus* zahŕňa plameniaka žltého (*P. andinus*, česky plameňák andský) a plameniaka krátkozobého (*P. jamesi*, česky plameňák Jamesov). Podľa Krienitza (2018), tretí rod tvorí druh s rovnomenným a jediným druhom a to plameniakom menším (*Phoeniconaias minor*). Jenkin (1957) rozdeľuje plameniaky na základe morfoloicky odlišnej čeľuste a stratégie kŕmenia len na dva rody a to na *Phoenicopterus* a *Phoenicoparrus*. Olson *et Feduccia*, 1980) však rozlišujú len 5 druhov, pričom plameniák červený (*P. ruber*, česky plameňák karibský) sa rozlišuje na dva odlišné a geograficky separované poddruhy a to *Phoenicopterus ruber ruber* a *P. r. roseus*. Torres *et al.* (2014) ponechávajú vo fylogenetickom strome tieto dva poddruhy ako samostatné druhy.

3. 2. 2 Plameniák ružový

Vďaka svojmu vzrastu sa plameniaky ružové (*Phoenicopterus roseus*) považujú za najväčších žijúcich plameniakov na Zemi (Feduccia, 1999). Sú typické svojím štíhlym vzrastom, dlhým krkom a nohami. Ich telo je pokryté ružovobielym perím, pričom krídla sú oveľa výraznejšie a môžu mať až sýtočervenú farbu. Kôrovce (česky korýši) a riasy, obsahujúce karotenoidné pigmenty, tvoria základ ich stravy, ktorá spôsobuje špecificky sfarbené perie (Amat *et al.*, 2011). Potravu filtrujú z plytkej vody pomocou tvarovaného zobáka zahnutého nadol (Zweers *et al.*, 1994). Taktiež ním

dokážu vymodelovať hniezdo z bahna, do ktorého potom kladú jedno biele vajce, na ktorom samica sedí asi 30 dní.

Hlavne počas hniezdenia sa tento druh plameniaka považuje za spoločenského vtáka. Vytvára kolónie, ktoré môžu mať cez 200 000 vtákov. Napriek tomu, tieto vtáky vykazujú medzi sebou veľmi slabé sociálne väzby, výnimku tvoria pár samec - samica. Hniezdia spolu najmä kvôli spoločnej ochrane pred predátormi. Mimo dobu párenia a hniezdenia dokážu migrovať na obrovské vzdialenosti. Pri lete, hniezdení či hľadaní potravy sa dorozumievajú zmesou trúbivých zvukov podobných husám (Feduccia, 1999).

Vyskytujú sa najmä na území Afriky, juhovýchode Ázie až po Indiu a na juhu Európy vrátane Španielska, Grécka, Talianska či Chorvátska. K najväčšiemu hniezdisku patrí jazero Natron v severnej Tanzánii (Koshti *et* Bony, 2016).

Obvykle sa títo plameniáci vo voľnej prírode dožívajú okolo 30–40 rokov, v zajatí sa môže dĺžka ich života predĺžiť aj o 20 rokov.

3.3 Taxonomické zaradenie pelikána kučeravého

Pelikáni sú zvyčajne zaraďovaní do radu veslonožce, avšak na ich taxonómiu majú rôzni autori výrazne odlišný názor. Charakteristickým znakom tejto skupiny je noha, ktorú používajú na veslovanie vo vode (Hedges *et* Sibley, 1994), ktorá mylne poukazuje na príbuzenské vzťahy medzi pelikánmi a ďalšími zástupcami, vytvorené len na základe morfológických znakov (Sibley *et* Ahlquist, 1990). Avšak, na základe molekulárnych analýz sa vzťahy medzi týmito druhmi podstatne líšia a tak aj napriek odlišnej morfológii označujú pelikána a člnozobca ako vývojovo príbuzné druhy (Sibley *et* Ahlquist, 1990).

Tradične sú do skupiny veslonožce zaradené čeľade anhingovité (Anhingidae), faetonovité (Phaetontidae), fregatkovité (Fregatidae), kormoránovité (Phalacrocoracidae), pelikánovité (Pelecanidae) a sulovité (Sulidae, česky terejovité) (Hedges *et* Sibley, 1994).

Hackett *et al.* (2008) a Jarvis *et al.* (2014) vo svojich fylogenetických štúdiách miešajú veslonožce a brodivce do jedného kladu a ako ich najbližších príbuzných uvádzajú sesterský klad tvorený zástupcami z radov rúrkonosce a tučniaky.

Prum *et al.* (2015) na základe svojich molekulárnych analýz potvrdzujú vzťahy medzi pelikánmi, člnozobcami a následne takatrou (*Scopus*, česky kladivouš), pričom

rúrkonosce vyčleňujú z bližšieho príbuzenského vzťahu s veslonožcami a uvádzajú opäť rúrkonosce a tučniaky do sesterského kladu rovnako ako Hackett *et al.* (2008) a Jarvis *et al.* (2014) vo svojich predchádzajúcich štúdiách. K oddeleniu rúrkonoscov a veslonožcov došlo už v paleocéne, pričom k diverzifikácii vtákov z radu rúrkonosce došlo až začiatkom oligocénu. Obdobie paleogénu sa teda uvádza ako obdobie rapidnej speciácie vtákov, preto nie je úplne možné presne rozdeľovať jednotlivé fylogenetické uzly ale brať ich ako sieť rýchlo vyvíjajúcich sa druhov (Thomas, 2015). Dnes sú pelikáni v rámci taxonómie samostatný rod oddelený od skupiny veslonožcov. Zvyšok druhov pôvodne radených do spoločného príbuzenského vzťahu s pelikánmi sa vyčlenil a dnes spadá do radu Suliformes, tvorený fregatkami, kormoránmi, sulovitými a anhingami. O taxonomickom zaradení faetonov bolo diskutované v kapitole 3.2.

Evolučný a fylogenetický vývoj veslonožcov sa snažil pochopiť aj tím vedcov z Číny (Huang *et al.*, 2019). Vo svojej vedeckej štúdií po prvýkrát sekvenovali a popisali celý mitochondriálny genóm pelikána kučeravého. Mitochondriálna DNA bola odobratá zo svalov zvierat'a, spracovaná a následne sekvenovaná Illumina Miseq platformou. Mitochondriálny genóm tohto pelikána tvorí 37 génov. Ďalej, pomocou kompletných mitochondriálnych genómov 26 druhov z radu veslonožce a za použitia metódy *neighbour-joining analyse* bol vytvorený fylogenetický strom. Tento strom ako aj celá štúdia potvrdila, že najbližší príbuzný druh pelikána kučeravého je pelikán hnedý (*Pelecanus occidentalis*).

Ďalšie informácie o pelikánovi kučeravom a ďalších druhoch z čeľade pelikánovité som spracovala vo svojej bakalárskej práci *Cross-species* amplifikácie mikrosatelitů z řádu trubkonosů u pelikána kadeřavého (*Pelecanus crispus*) z roku 2018 (Verešová, 2018).

3.4 Mikrosatelity

Mikrosatelity alebo inak označované ako SSRs (Simple Sequence Repeats) alebo STRs (Short Tandem Repeats) sú podkategóriou tandemovo opakujúcich sa sekvencií DNA, pričom tieto úseky DNA majú dĺžku 1–10 párov bází (Bruford *et Wayne*, 1993). Nachádzajú sa skoro vo všetkých kódujúcich aj nekódujúcich úsekoch DNA, v prokaryotických aj eukaryotických genómoch (Toth *et al.*, 2000). Sú široko rozptýlené po genóme organizmu a vďaka rôznorodému počtu opakovaných úsekov DNA dávajú informáciu o polymorfných miestach DNA a ich alelickej variabilite

(Tautz, 1989). K polymorfizmu dĺžky mikrosatelitu však môžu prispieť aj „prerušujúce motívy“, ktoré sa postupne líšia od opakovaného motívu a mutácií v príľahlých oblastiach (Angers *et Bernatchez*, 1997).

Podľa Vieira *et al.* (2016), vznik mikrosatelitového lokusu môže začať mutáciou úseku DNA s minimálne ôsmimi repetíciami alebo *de novo* z miest bez opakujúcich sa motívov, ktoré vedú k tvorbe „proto-mikrosatelitných“ miest. V ďalšej generácii bunky v priebehu replikácie sa potom tieto miesta rozširujú napríklad prostredníctvom sklúznutia DNA polymerázy. Niektoré štúdiá tiež naznačujú, že zrod mikrosatelitov podmieňujú transpozóny či minisatelity ako progenitory mikrosatelitov (Trivedi, 2004).

Vo všeobecnosti inými slovami sú mikrosatelity teda polymorfizmy pozorované ako rozdielne počty opakovania motívu spôsobených sklzom polymerázy na vláknach DNA pri jej replikácii (angl. *DNA slippage*) alebo chybami rekombinácie (Schlötterer *et Tautz*, 1992). V kódujúcich génoch majú mikrosatelity vyššiu mieru mutácií (10^{-2} – 10^{-6}) (Li *et al.*, 2002) než bodové mutácie (10^{-9}) (Hodel *et al.*, 2016). Iné mikrosatelitné mutácie môžu byť spôsobené rôznymi nukleotidovými substitúciami či duplikáciami (Hancock, 1999). Množstvo rôznych faktorov ako napr. veľkosť alely, veľkosť motívu, obsah G/C, genómové umiestnenie, hraničná sekvencia či rýchlosť rekombinácie a transkripcie, ovplyvňujú mutačne procesy v mikrosatelitoch (Primmer *et al.*, 1996). Miera mutácie mikrosatelitov môže byť druhovo aj pohlavím špecifická, keďže muži majú vyššiu mieru mutácií v porovnaní so ženami v pomere 17:3 (Brinkmann *et al.*, 1998). Miera mutácií v mikrosatelitoch je navyše ovplyvnená aj stabilizačnými proteínmi a ich sekundárnymi štruktúrami (Eckert *et al.*, 2002). Podľa viacerých autorov platí, že čím dlhší je motív repetitívnej jednotky, tým vyššia je frekvencia mutácií, zatiaľ čo kratšie repetitívne jednotky majú nižšiu frekvenciu mutácií (Vieira *et al.*, 2016). Mutácie, ktoré sa vyhli korekcii opravných replikačných systémov, vytvárajú nové alely v lokusoch mikrosatelitoch. Z tohto dôvodu môžu v danom lokuse existovať rôzne alely, čo znamená, že mikrosatelity sú informatívnejšie ako iné molekulárne markery, dokonca vrátane SNP (Vieira *et al.*, 2016).

Existuje veľa dôkazov na podporu hypotézy, že mikrosatelity nie sú náhodne distribuované pozdĺž genómu. Všeobecne možno povedať, že ich výskyt je nižší v génových oblastiach, vzhľadom na skutočnosť, že majú vysokú mieru mutácií, ktorá by mohla ohroziť génovú expresiu. Štúdie naznačujú, že v kódujúcich oblastiach prevládajú mikrosatelity s génovými motívmi typu tri- a hexanukleotidové, čo je výsledok selekčného tlaku proti mutáciám, ktoré menia čítací rámec (Zhang *et al.*,

2004). Mikrosatelity môžu tiež pochádzať z kódujúcich oblastí, čo vedie k výskytu repetitívnych úsekov v proteínových sekvenciách následkom čoho sa u ľudí vyskytujú rôzne genetické poruchy. V databázach proteínových sekvencií sa uvádza, že tandemové repetície sú bežné v mnohých proteínoch a mechanizmy zapojené do ich genetiky môžu prispievať k rýchlej evolúcii proteínov (Katti *et al.*, 2000). Distribúcia mikrosatelitných motívov tiež naznačuje, že mikrosatelity rôznych typov hrajú rôzne úlohy v rôznych génových oblastiach, ako napríklad v promotoroch, intrónoch, netranslatovaných oblastiach (UTR), ale aj v exónoch (Li *et al.*, 2004). Mikrosatelity sa tiež nachádzajú v transpozónoch a iných opakujúcich sa rozptýlených motívoch DNA (Richard *et al.*, 2008).

Expanzia v tandemových opakovaníach môže viesť nielen k zmene fenotypu buniek ale aj spôsobiť ochorenie a nežiaduce vlastnosti. U ľudí môžu spôsobiť syndróm fragilného X, spinocerebelárnu ataxiu, niektoré druhy rakoviny (Mitas, 1997) a ďalšie neurogeneratívne ochorenia ako napríklad Huntingtonova choroba spôsobená expanziou (CAG)_n motívu (Vieira *et al.*, 2016).

Zmeny mikrosatelitov spojené s chorobami u ľudí sú všeobecne známe a môžu vyvolávať falošný dojem, že účinky týchto mutácií sú prevažne nepriaznivé. Naopak, niektoré príklady poskytujú dôkaz, že alely mikrosatelitov môžu ponúkať potenciálne selektívne výhody (Kashi *et al.*, 2006). Mikrosatelity sú v súčasnosti kvalifikované ako významné zložky genómu pre adaptáciu populácie a fenotypovú plasticitu v rámci generácií a naprieč generáciami v meniacom sa a potencionálne škodlivom prostredí (Nevo, 2001). Okrem toho sa hromadia dôkazy, že tieto tandemové repetície môžu mať funkčnú úlohu v kódujúcich sekvenciách a tiež slúžiť ako regulačné prvky (Kashi *et al.*, 1997). Detekcia mikrosatelitov v transkriptoch a regulačných oblastiach genómu podnietila záujem vedcov a stále viac publikácií uvádza dôkaz, že mikrosatelity zohrávajú úlohu v relevantných procesoch, ako je regulácia transkripcie a translácie (Hodel *et al.*, 2016), organizácia chromatinu (Trivedi, 2004), veľkosť genómu a bunkový cyklus, umlčanie génov (Vieria *et al.*, 2016) či alternatívny zostrih a transport mRNA (Saeed *et al.*, 2016).

V porovnaní s inými genetickými markermi ako sú RFLP, RAPD, AFLP, mikrosatelity sú charakterizované vysokou frekvenciou distribúcie, kodominancie, vysokým polymorfizmom a skvelou reprodukovateľnosťou (Gupta *et al.*, 2000). Jediná ich nevýhoda spočíva v tom, že musia byť najskôr v genóme nájdené a charakterizované (Queller *et al.*, 1993) Avšak dnes, vďaka vynaloženému úsiliu

vedcov po celom svete existujú mitrosatelitové databázy tisícok organizmov (Aishwarya *et al.*, 2008).

3. 4. 1 Problematická identifikácia mikrosatelitových produktov polymerázovej reťazovej reakcie (PCR)

Napriek veľkému množstvu výhod použitia mikrosatelitov, existuje pár situácií, kedy je hodnotenie mikrosatelitov nepresné až chybné. Prvou z nich je výskyt tzv. nulových alel. Nulová alebo neaplikujúca alela je podľa definície akákoľvek alela mikrosatelitového lokusu, ktorú nie je možné po prebehnutí PCR reakcie úspešne detegovať (Dakin *et Avise*, 2004). Výskyt nulových alel sa prejavuje najmä pri detekcii prostredníctvom *cross-species* PCR amplifikácie. Celkovo je známe, že primery mikrosatelitového lokusu, odvodeného pre zdrojový druh, majú komplementárnu sekvenciu k špecifickej sekvencii u cieľového druhu. Iné alely iných mikrosatelitových lokusov sa môžu v rôznej miere líšiť od ich referenčných sekvencií vďaka rôznym bodovým mutáciám, a tak môžu byť menej vhodné pre amplifikáciu týchto lokusov (Primmer *et al.*, 1995). Mutácie v týchto miestach DNA (angl. *flanking regions*) potom spôsobujú nedostatočnú hybridizáciu primeru s komplementárnou sekvenciou templátovej DNA, čím znemožňujú prebehnutie PCR reakcie a tým aj amplifikácie danej alely mikrosatelitového lokusu (Dakin *et Avise*, 2004).

Ďalším dôvodom výskytu nulových alel je preferencia amplifikácie kratších alel voči dlhším alelám (Gagneux *et al.*, 1997). Takto amplifikované alely sa nazývajú ako „častočne nulové alely“ (z angl. *partial nulls*), pretože ich je možné zviditeľniť zmenou kontrastu či zvýšením množstva DNA v reakčnej zmesi. V molekulárnych štúdiách sa opakovane preukázala súvislosť medzi prítomnosťou nulových alel a oblasťami ohraničujúcimi mikrosatelitové motívy. Tieto oblasti sú vysoko variabilné a málo stabilné než sekvencie v iných genómových oblastiach a preto tam tak často dochádza k spomínaným mutáciám (Meglecz *et al.*, 2004). Prítomnosť nulových alel sa však javí ako najkritickejšia pri využití mikrosatelitovej DNA k určeniu rodičovských vzťahov, obzvlášť pri určovaní paternity. Dôsledkom výskytu nulovej alely u heterozygotného otca, môže byť potom tento otec považovaný za homozygotného v danom lokuse a tak byť vylúčený z otcovstva.

V populačných štúdiách sa dbá na pomer homozygotných a heterozygotných jedincov, pretože nadbytok homozygotov vedie k odchýlkam od Hardy-Weinbergovej

rovnováhy. Či je alela skutočne neamplifikujúca, je možné zistiť zmenou sekvencií nenasadajúceho primeru od miesta mutácie a tým umožniť pripojenie primeru na templát DNA, prebehnutie PCR reakcie a detekciu výsledného produktu (Dakin *et al.*, 2004). Mnoho vedcov tiež používa rôzne populačno-genetické softvéry ako GenePop (Raymond *et al.*, 1995) alebo Cervus (Marshall *et al.*, 1998) na výpočet očakávanej frekvencie nulových alel v populáciách.

Po amplifikovaní mikrosatelitového lokusu môže byť z hľadiska hodnotenia problematický výskyt viacerých bandov tzv. *stutter* bandov, ktoré sa môžu prekrývať s hlavnou alelou. *Stutter* bandy vznikajú pri amplifikácii reťazca DNA, kedy DNA polymeráza sklzáne z DNA vlákna a skrúti DNA reťazec o jednu či dve (prípadne viac) jednotiek repetícií, ktoré budú kratšie ako hlavná alela, pričom na géle bude hlavná alela vizuálne tmavšia oproti zvyšku ďalších bandov (Walsh *et al.*, 1996). Pravdepodobnosť sklzu DNA je nepriamo úmerná so snižujúcou sa dĺžkou repetitívnej jednotky. Odlišná amplifikácia býva pozorovaná u heterozygotov v danom lokuse, pričom táto odlišnosť je spôsobená preferenčnou amplifikáciou kratšej alely. Najčastejšie sa tak *stutter* bandy vyskytujú v dinukleotidových repetíciách, menej v trinukleotidových či tetranukleotidových opakovaniach (Daniels *et al.*, 1998). V prípade lokusu s dinukleotidovou jednotkou repetície, je najčastejší *stutter* band o dve bázy kratší než band hlavnej alely, ďalšie viditeľné *stutter* bandy môžu byť kratšie aj o 4 a 6 báz (Murray *et al.*, 1993).

Posledným z javov, ktorý by mohol negatívne ovplyvniť populačné a fylogenetické štúdie je alelová homoplázia. Homoplazické mikrosatelitové alely sú alely, ktoré sú v danom jednom lokuse rovnako dlhé, ale líšia sa svojim pôvodom kvôli vysokej mutačnej rýchlosti mikrosatelitových lokusov (Estoup *et al.*, 2002). Existujú dva typy homoplazických alel. Prvou z nich sú mikrosatelitové alely identické v dĺžke, ale sekvenčne variabilné, preto ich je možné veľmi ľahko rozlíšiť pomocou sekvenačných metód. Druhým typom sú alely identické v dĺžke aj v sekvencii, ale odlišujú sa evolučným pôvodom (Anmarkrud *et al.*, 2008). Takéto alely je možné detegovať pomocou mutácií zdokumentovaných v rodokmeňoch (Estoup *et al.*, 2002). Títo autori však vo svojich štúdiách dospeli k záveru, že alelová homoplázia nie je zásadným problémom pri hodnotení populačných štúdií, nakoľko veľká dĺžková variabilita mikrosatelitných lokusov často do značnej miery kompenzuje ich homoplazický vývoj. Výnimku zahŕňajú mikrosatelity s vysokou frekvenciou mutácií a veľkostne obmedzené alely vo veľkých populáciách.

3. 5 Polymorfné mikrosatelity u plameniakov a pelikánov

Je známe, že mikrosatelity je možné izolovať *de novo* alebo je ich možné nájsť pomocou *cross-species* PCR amplifikácie. *Cross-species* PCR amplifikácia je ďalšou možnosťou ako amplifikovať mikrosatelitové lokusy a nájsť polymorfizmus u blízko príbuzných druhov (Moore *et al.*, 1991). Hľadáním mikrosatelitov za použitia tejto metódy u veľkých vodných vtákov sa zaoberá najmä Laboratórium populačnej genetiky na Katedre bunčnej biologie a genetiky PôF UPOĽ, ktoré využíva mikrosatelitové lokusy izolované od vtákov zaradených do radov bahniaky, brodivce, potápk, potáplice, rúrkonosce, tučniaky, veslonožce, zúbkozobce a spevavce spolu s univerzálnymi vtáčimi mikrosatelitmi.

3. 5. 1 *De novo* mikrosatelity u plameniakov

U troch druhov plameniakov bolo doteraz *de novo* popísaných 70 párov primerov pre mikrosatelitové lokusy.

Pre analýzu rodičovstva a ďalšie populačné štúdie plameniaka červeného sa podarilo izolovať 13 mikrosatelitových primerových párov. Konkrétne, išlo o 6 polymorfných párov primerov Pru μ 1–Pru μ 6 charakterizovaných prácou Kapila (2005) a 7 párov primerov Pru μ 7–Pru μ 13 popísaných v práci Preston (2005). V roku 2010, Drobek testoval tieto mikrosatelity pomocou *cross-species* a zistil určitý nesúlad a teda, že primerové páry Pru μ 7, Pru μ 8 a Pru μ 9 amplifikujú jeden a ten istý lokus, tak isto ako aj primerové páry Pru μ 10, Pru μ 11 a Pru μ 12, ktoré navyše totožne amplifikujú spomínaný daný lokus. Z toho vyplýva, že celkom bolo v týchto dvoch prácach nájdených 8 mikrosatelitových lokusov. Práca Frias-Soler *et al.* (2014) dohromady uvádza 14 nájdených mikrosatelitov, pričom 3 z nich (označené ako PhoeniE) boli identifikované už v experimente Bauera (2007). Bauerova práca však vyšla len v nemeckej verzii. Celkovo teda Frias-Soler *et al.* (2014) označujú 6 mikrosalitov zo 14 za polymorfné.

Pri štúdiu genetickej diverzity plameniaka ružového bolo doteraz izolovaných a charakterizovaných 37 polymorfných mikrosatelitových lokusov (Geraci *et al.*, 2010), ktoré obsahovali 2 až 33 alel na lokus.

Zaccara *et al.* (2011) identifikovali 6 polymorfných mikrosatelitov z DNA plameniakov menších žijúcich v dvoch rôznych afrických populáciách a u týchto mikrosatelitov detegovali 4–13 alel na lokus.

Frias-Soler *et al.* (2014) využili polymorfne lokusy Pr μ 1, Pr μ 2 (Kapil, 2005) a lokusy PhoeniE37, PhoeniE104, PhoeniE66 (Bauer, 2007) k štúdiu populačných vzťahov medzi galapáškymi plameniákmi.

3. 5. 2 *Cross-species* mikrosatelity u plameniaka ružového

Drobek (2010) vo svojej diplomovej práci okrem *de novo* mikrosatelitov nájdených pre plameniaka karibskeho (popísaných vyššie), testoval pomocou *cross-species* PCR amplifikácie 214 párov primerov od druhov patriacich do radov brodivce, veslonožce, zúbkozobce, potáplice, bahniaky a tučniaky u 6 nepríbuzných jedincov plameniaka ružového. Celkovo určil 29 polymorfných mikrosatelitov a to hlavne z radov brodivce a veslonožce. Ďalej, potom tieto lokusy charakterizoval a genotypoval celkovo u 22 nepríbuzných jedincov.

Ďalšie testovanie na 6 nepríbuzných jedincoch plameniaka ružového previedla, pomocou *cross-species* PCR amplifikácie, Manišová (2011). Zo 37 izolovaných mikrosatelitov odvodených od brodivcov a veslonožcov vykazovalo polymorfizmus 5 mikrosatelitov.

O charakterizáciu týchto 5 mikrosatelitov u 22 nepríbuzných jedincov plameniaka ružového sa zaoberala Málková (2013), pričom 1 mikrosatelit z pôvodných piatich polymorfných mikrosatelitov (Manišová, 2011) vyhodnotila ako monomorfný. Ďalej z 19 mikrosatelitov odvodených pre brodivce, Málková (2013) označila 2 ako polymorfne *cross-species* mikrosatelity pre plameniaka ružového. Poslednou časťou testovania bolo overenie 9 polymorfných mikrosatelitov od plameniaka karibského na DNA plameniaka ružového, nakoľko sa uvádza, že tieto dva druhy sú si fylogeneticky veľmi blízke. Týmto spôsobom tak Málková (2013) zistila chybné detegovaný monomorfizmus Manišovou (2011) u 4 mikrosatelitov.

Za použitia celkovo 213 párov primerov odvodených prevažne pre vtáky z radu rúrkonosce testovala Kůrová (2017) na DNA 6 nepríbuzných jedincov plameniaka ružového. Z amplifikovaných produktov určila 48 polymorfných mikrosatelitov prevažne od čeladi vichrovníkovité (Procellariidae, česky buňňákovití), a vichrovníčkovité (Hydrobatidae, česky buňňáčkovití)

Klaczová (2018) vo svojej bakalárskej práci tiež pomocou *cross-species* PCR amplifikácie testovala 173 párov primerov u 6 jedincov plameniaka ružového. Mikrosatelitové primery boli izolované pre tučniaky a zvyšok tvorili vtáče univerzálne

primery, odvodené od homologických sekvencií mikrosatelitov DNA zebričky austrálskej (*Taeniopygia guttata*, česky zebrička pestrá) a kury červenej (*Gallus gallus*, česky kur bankivský). Celkovo bolo nájdených 24 polymorfných mikrosatelitových lokusov, 13 lokusov pre rad tučniaky a 11 univerzálnych vtáčích mikrosatelitov. Analýze a charakteristike mikrosatelitov, ktoré Klaclová označila za polymorfné (Klaclová, 2018), sa budem ďalej venovať v praktickej časti tejto diplomovej práci.

Posledné testovanie u 22 jedincov plameniaka ružového previedla Zlochová (2019). Najskôr bolo Zlochovou testovaných 48 lokusov, u ktorých bol predtým zistený polymorfizmus na 6 jedincoch plameniaka ružového (Kůrová, 2017). Zlochová ďalej testovala lokusy, ktoré boli v predchádzajúcich prácach určené Kůrovou (2017) ako monomorfné, pričom testovanie prebehlo len na 6 jedincoch. Strejčková (2018) však označuje zmieňované lokusy za polymorfné u 30 jedincoch plameniaka karibského. Zlochová preto testovala spomínaných 16 mikrosatelitových lokusov (Kůrová, 2017) u 22 jedincoch plameniaka ružového. Dohromady analyzovala 43 polymorfných mikrosatelitových lokusov u plameniaka ružového.

3. 5. 3 *De novo* mikrosatelity u pelikánov

Štúdie zaoberajúce sa izoláciou *de novo* mikrosatelitov u pelikánov sú dve, v ktorých autori charakterizovali dohromady 19 mikrosatelitových lokusov.

Hickman *et al.* (2008) charakterizovali 9 mikrosatelitových lokusov pre pelikána bieleho (*Pelecanus erythrorhynchos*, česky pelikán severoamerický) ako nástroj pre štúdium populačnej štruktúry pelikánov. Skrining prebehol u 23 jedincoch pochádzajúcich z východnej a západnej populácie štyroch lokalít Severnej Ameriky. Počet alel na lokus u týchto jedincov sa pohyboval v rozmedzí 2–8.

Na porovnanie stupňa genetického toku medzi rôznymi kolóniami pelikána ružového (*P. onocrotalus*, česky pelikán biely), bolo izolovaných desať mikrosatelitových lokusov), vykazujúc polymorfizmus a variabilitu alel od 2 po 19 (De Ponte Machado *et al.*, 2009). Ďalej, 8 vybratých mikrosatelitov testovali *cross-species* PCR amplifikáciou na ďalších troch druhoch pelikánov: pelikán biely, pelikán hnedý (*P. occidentalis*), pelikán červenavý (*P. rufescens*, česky pelikán africký). Tieto mikrosatelity vykazovali polymorfizmus a rôzne úrovne heterozygotnosti, a preto môžu byť do budúca vhodným nástrojom pre fyleogeografické a demografické štúdiá všetkých druhov pelikánov.

3. 5. 4 *Cross-species* mikrosatelity u pelikána kučeravého

Dva polymorfné mikrosatelitové lokusy boli nájdené u pelikána kučeravého Ranochovou (2008) pri testovaní 62 párov primerov, ktoré boli izolované pre fylogeneticky príbuzné druhy, konkrétne pre druhy z radov brodivce, veslonožce a potápky. Testovanie prebehlo aj u pelikána ružového a pelikána červenkavého.

Následne na to, primery odvodené od vtákov patriacich do rovnakých rodov ako v predchádzajúcej štúdií, testovala Mikulová (2010). Konkrétne testovala 58 párov primerov na 5 nepríbuzných jedincoch pelikána kučeravého. Najviac mikrosatelitov vykazujúc polymorfizmus bolo od veslonožcov, pričom dohromady bolo polymorfných 9 mikrosatelitov.

Chmelařová (2010) sa vo svojej práci zaoberala hľadaním *cross-species* polymorfných mikrosatelitových lokusov u 6 jedincoch pelikána kučeravého. Využila pri tom 223 primerových párov odvodených od vtákov z radov veslonožce, brodivce, potáplice, zúbkozobce, plamieniaky, bahniaky a tučniaky. Celkovo určila 11 *cross-species* polymorfných mikrosatelitov, s 2 až 6 alelami, ktoré je možné využiť ako genetické markery pre analýzu paternity tohto druhu pelikána.

Do pozornosti sa dostali aj mikrosatelitové primery, použité k amplifikácii mikrosatelitových lokusov u pelikána ružového a pelikána sivého (*Pelecanus philippensis*, česky pelikán skvrnozobý), ktoré vykazovali u týchto druhov polymorfné produkty, pričom u pelikána kučeravého boli označené ako monomorfné. Nakoľko sú tieto druhy fylogeneticky veľmi príbuzne, Chmelařová (2012) preto retestovala všetkých 77 párov primerov znova na DNA pelikána kučeravého a určila z nich 7 polymorfných mikrosatelitových lokusov, ktoré následne charakterizovala na 41 nepríbuzných jedincoch tohto druhu.

Vo svojej bakalárskej práci (Verešová, 2018) som testovala 207 primerových párov na 6 jedincoch pelikána kučeravého, ktoré boli pôvodne navrhnuté k amplifikácii mikrosatelitových oblastí u zástupcov z radu rúrkonosce a 6 primerových párov pre zástupcov z radov bahniaky a spevavce, ktoré predtým vykazovali polymorfné *cross-species* mikrosatelity u rúrkonoscov. Celkovo som našla 12 polymorfných mikrosatelitových lokusov s 2 až 3 alelami. Dôkladnejšia analýza týchto polymorfných mikrosatelitov prebehne v druhej polovici experimentálnej práce, pričom testovanie prebehne na 41 jedincoch pelikána kučeravého.

4 Materiál a metódy

4.1 Biologický materiál

Krv pre izoláciu DNA, využitá v experimentálnej časti tejto diplomovej práce bola odobraná pracovníkmi ZOO Dvůr Králove a to 22 jedincom plameniaka ružového (*Phoenicopterus roseus*) a 41 jedincom pelikána kučeravého (*Pelecanus crispus*). Použitím fenol-chloroformovej metódy bola z tejto krvi izolovaná genomická DNA. Extrakciu genomickej DNA vykonal vedúci diplomovej práce, následne DNA rozpustil v TE pufru a narietil na koncentráciu 10–50 µg/ml.

4.2 Chemikálie

- akrylamid (Sigma)
- *aTaq* DNA polymeráza (5U/µl), M1241 (Promega)
- bromfenolová modrá (Serva)
- dNTPs (100 mmol/l, 400 µl každého), U1240 (Promega)
- deionizovaná voda
- dusičnan strieborný (Sigma)
- etanol – 96% roztok (Lieho var Vrbátky)
- etyléndiaminotetraoctan sodný (Na₂EDTA) (Lachner)
- formaldehyd (AppliChem)
- formamid (Lachema)
- hydroxid sodný (Lachner)
- chlorid sodný (Lachema)
- kyselina boritá (Lachner)
- kyselina dusičná - 65% roztok (Lachner)
- kyselina octová (Lachner)
- 3-metakryloxypropyltrimetoxysilan (Serva)
- močovina (Lachner)
- N, N'-metylénbisakrylamid (AppliChem)
- N, N, N', N'-tetrametyletyléndiamín (TEMED) (AppliChem)
- peroxidisíran amonný (Lachner)
- Rain off – tekuté stierače (Sheran)
- thiosíran sodný (Lachema)

- trishydroxymetylaminometán (Tris) (AppliChem)
- uhličitan sodný (Lachner)
- xylénová modrá (Xylencyanol FF) (AppliChem)

4.3 Roztoky

- dusičnan strieborný, 0,1% roztok

- 0,8 g dusičnanu strieborného
- 800 ml deionizované vody
- pred použitím pridať 1,2 ml formaldehydu

- fix/stop roztok

- 800 ml deionizovanej vody
- 88 ml ľadovej kyseliny octovej

- hydroxid sodný, 1 mol/l roztok

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

- kyselina dusičná, 1% roztok

- 12 ml 65% kyseliny dusičnej
- 800 ml deionizovanej vody

- nanášací roztok pre elektroforetickú separáciu

- 0,125 g xylénovej modrej
- 0,125 g bromfenolovej modrej
- 25 ml deionizovanej vody
- 100 ml formamidu

- peroxodisíran amonný, 10% roztok

- 1 g peroxodisíranu amonného
- rozpustiť v 10 ml deionizovanej vody
- uchovávať v chladničke

- polyakrylamidový gél, 6%

- 60 ml 6% zásobného roztoku akrylamidu
- 400 µl 10% roztoku peroxodisíranu amonného $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$

- 40 μ l N, N, N', N' - tetrametyletyléndiamínu

- reakčný pufr pre aTaq DNA polymerázu, 10x

- 80 ml deionizovanej vody
- 1,211 g Tris (alebo 6,7 ml Tris 1 mol/l)
- pH upraviť pomocou HCl na hodnotu 9
- 3,73 g KCl
- 1 ml Triton X-100
- po rozpustení doplniť na 100 ml

- roztok 3-metakryloxypropyltrimetoxysilanu

- 1 ml 0,5% kyseliny octovej v 96% etanole
- 3 μ l 3-metakryloxypropyltrimetoxysilanu

- vývojka

- 24 g uhličitanu sodného
- 800 ml deionizovanej vody
- vychladiť na teplotu nižšiu ako 10 °C
- pred použitím pridať 1,2 ml formaldehydu a 160 μ l 1% roztoku tiosíranu sodného

- zásobný roztok akrylamidu, 6%

- 420 g močoviny
- 484 ml deionizovanej vody
- 50 ml 10x TBE
- 150 ml 40% zásobného roztoku akrylamid : N, N'- metylénbisakrylamid 19:1
- po rozpustení všetkých zložiek sfiltrovať a uložiť v tmavej fľaši v 4 °C

- zásobný roztok TBE pufr, 10x

- 55 g kyseliny boritej
- 108 g trishydroxymetylaminometánu
- 40 ml roztoku Na₂EDTA 0,5 mol/l, pH 8,0
- doplniť deionizovanou vodou na 1 l

4.4 Laboratórne prístroje

- elektroforetický zdroj EV232 (Consort)
- hybridizačná pec HB-2D (Techne)
- chladnička kombinovaná (Whirlpool)
- laboratórne váhy Mark S622 (BEL Engineering)
- magnetická miešačka MR Hei-Combi (Heidolph)
- mikropipety Finnpiquette - 0,5 až 10 μ l (osemkanálová) a 0,3 μ l až 1 ml (Thermo Lab Systems)
- mikropipety Nichipet EX 0,5 μ l až 1 ml (Nichiryo)
- minicentrifuga CLE CSQSP (Clever Scientific)
- minicentrifuga Prism mini (Labnet International)
- spektrofotometer ND-1000 (Thermo Scientific)
- negatoskop NEGA1 (Maneko)
- sekvenačná elektroforetická komôrka S2 (Whatman Biometra)
- sušiareň CAT 8050 (Contherm)
- termocykler GenePro (BIOER)
- termocykler PTC 100-96 VHB (MJ Research)
- termocykler TC XP (BIOER)
- trepačka Orbit 1 900 (Labnet International)
- vortex mixer (Labnet International)
- vortex MS2 (Ika)
- výrobník deionizovanej a ultračistej vody typ 02 (AquaOsmotic)
- výrobník ľadovej drte (Brema Ice Makers)

4.5 Analyzované mikrosatelitové primery

V tejto práci boli vykonané dva samostatné experimenty, v ktorých bola využitá metóda *cross-species* PCR amplifikácie.

V prvej časti práce bola vykonaná analýza a charakterizácia *cross-species* mikrosatelitov pomocou PCR amplifikácie na 22 nepríbuzných jedincoch plameniaka ružového. Išlo o 24 mikrosatelitových lokusov, ktoré Klaclová (2018) vo svojej práci, u 6 druhov plameniaka ružového, označila za polymorfne. Trinásť z nich bolo pôvodne izolovaných pre vtáky patriace do radu tučniaky a 11 odvodených na základe homológie

s mikrosatelitnými sekvenciami genomickej DNA zebričky austrálskej a kury červenej, konkrétne 5 EST vtáčích mikrosatelitov a 6 konzervovaných vtáčích mikrosatelitov.

Tabuľka č. 1: Prehľad 24 *cross-species* mikrosatelitov amplifikovaných u 6 jedincov plameniaka ružového, označených za polymorfne v práci Klaclovej (2018).

Zdroj	Názov lokusu (Accession No.)	Literárny zdroj
tučniak jedнопáсы (tučňák Humboldtův, (<i>Spheniscus humboldti</i>)	Sh1Ca12 (AF540007)	Schlosser <i>et al.</i> , 2003
tučniak modrý (tučňák nejmenší, <i>Eudyptula minor</i>)	Em2 (KM272222)	Grosser <i>et Waters</i> , 2015
	Em8 (KM272226)	
	Em23 (KM272234)	
	Emm5 (DQ83772933)	Billing <i>et al.</i> , 2007
tučniak okatý (tučňák kroužkový, <i>Pygoscelis adeliae</i>)	RM6 (AF289547)	Roeder <i>et al.</i> , 2001
tučniak okuliarnatý (tučňák brýlový, <i>Spheniscus demersus</i>)	PNN08 (JX494408)	Labuschagne <i>et al.</i> , 2013
tučniak žltohlavý (tučňák žltorohý, <i>Eudyptes chrysolophus</i>)	Ech011 (FM878342)	Ahmed <i>et al.</i> , 2009
	Ech024 (FM878355)	
	Ech030 (FM878361)	
tučniak žltooký (tučňák žltooký, <i>Megadyptes antipodes</i>)	Man27 (EU267114)	Boessenkool <i>et al.</i> , 2008
	Man47 (EU267116)	
	Man55 (EU267120)	
EST vtáče mikrosatelity	TG01-148	Dawson <i>et al.</i> , 2010
	TG02-120	
	TG03-035	
	TG04-041	
	TG05-030	
konzervované vtáče mikrosatelity	CAM-03 (nevedeno)	Dawson <i>et al.</i> , 2013
	CAM-07 (nevedeno)	
	CAM-11 (nevedeno)	
	CAM-19 (nevedeno)	
	CAM-24 (nevedeno)	

Ďalej bolo testovaných a charakterizovaných 12 *cross-species* mikrosatelitových lokusov na 41 jedincov pelikána kučeravého, ktoré vykazovali polymorfizmus u 6 jedincov pelikána kučeravého (Verešová, 2018). Testované mikrosatelitové lokusy boli odvodené od zástupcov patriacich do radu rúrkonosce a jeden mikrosatelitový lokus, konkrétne Calex-01 bol pôvodne izolovaný pre kulíka morského, patriaceho do radu bahniaky. Tento mikrosatelit bol testovaný z dôvodu zistenia polymorfizmu pri *cross-species* PCR amplifikácií u zástupcov z radu rúrkonosce.

Tabuľka č. 2: Prehľad 12 *cross-species* mikrosatelitov amplifikovaných u 6 jedincov pelikána kučeravého, označených za polymorfne v mojej bakalárskej práci (Verešová, 2018).

Zdrojový druh	Názov lokusu (Accession No.)	Literárny zdroj
albatros čiernonohý (albatros černonohý, <i>Phoebastria nigripes</i>)	BFAL4 (neuvedené)	Hernandez <i>et al.</i> , 2014
	BFAL14 (neuvedené)	
albatros nemenlivý (albatros laysanský, <i>P. immutabilis</i>)	LAAL7 (neuvedené)	
albatros sivohlavý (albatros šedohlavý, <i>Diomedea chrysostoma</i>)	Dc19 (AF096800)	Burg, 1999
	Dc31 (AF096810)	
víchrovník azorský (buňňáček Monteirův, <i>Oceanodroma monteiroi</i>)	Omn6 (JQ303230)	Bried <i>et al.</i> , 2012
víchrovník severský (buňňáček dlouhokřídľý, <i>O. leucorhoa</i>)	Ole03 (FR696379)	Bicknell <i>et al.</i> , 2011
	Ole25 (FR696401)	
víchrovník bielobradý (buňňák bělobradý, <i>Procellaria</i>)	Paequ2 (AY371070)	Techow <i>et O</i> 'Ryan, 2004
víchrovník holubí (buňňák Bulwerův, <i>Bulweria bulwerii</i>)	Bb21 (HM171897)	Andris <i>et al.</i> , 2010
víchrovník plavý (buňňák šedý, <i>Calonectris diomedea</i>)	Cd1 (EU029083)	Bried <i>et al.</i> , 2008
kulík morský (kulík mořský, <i>Charadrius alexandrius</i>)	Calex-01 (AM072446)	Brown <i>et al.</i> (2009) podľa Küpper <i>et al.</i> (2007)

4.6 Cross-species PCR amplifikácia

PCR amplifikácia bola prevedená vždy jedným párom primerov na genomickej DNA testovaného druhu vtáka. Pre plameniaka ružového bolo testovaných 22 jedincov s použitím primerových párov pre amplifikáciu EST vtáčích mikrosatelitov a konzerovaných vtáčích mikrosatelitov a primerových párov izolovaných pre tučniaky. Primery odvodené od rúrkonosov a jeden pár primerov od kulíka morského boli amplifikované na genomickej DNA 41 jedincoch pelikána kučeravého. Zložky PCR mixu pre jednu vzorku sú uvedené v tabuľke č. 3.

Tabuľka č. 3. Zloženie PCR mixu pre 22 a 41 vzoriek.

Zložky PCR mixu	Objem [μl]	
	pre 22 vzoriek	pre 41 vzoriek
deionizovaná voda	176,0	336,0
reakčný pufoer 10x	26,8	51,2
roztok MgCl ₂ (25 mmol/l)	16,0	30,5
roztok dNTPs (20 mmol/l)	2,8	5,3
primer F (10 μmol/l)	13,2	25,2
primer R (10 μmol/l)	13,2	25,2
<i>aTaq</i> DNA polymeráza (5 U/μl)	6,0	11,6

1. Pred napipetovaním zložiek nechať jednotlivé zložky dôkladne rozmraziť, zvortexovať a scentrifugovať.
2. Do 0,2ml PCR skúmaviek napipetovať po 1 μl genomickej DNA.
3. Zložky PCR mixu napipetovať podľa tabuľky č. 3 do 1,5ml mikroskúmavky, zvortexovať a scentrifugovať.
4. PCR mix rozpipetovať po 9 μl a pridať k 1 μl genomickej DNA (celkový objem 10 μl).
5. Po napipetovaní vložiť PCR skúmavky do termocykléru a nastaviť zvolený program podľa schémy č. 1.

Schéma č. 1: Teplotný a časový profil PCR reakcie.

1. 94 °C ... 5 min
 2. 94 °C ... 30 s
 - T_a 30 s
 - 72 °C ... 30 s
 3. 72 °C ... 7 min
- } 35 cyklov

T_a predstavuje annealingovú teplotu, počas ktorej dochádza k nasadeniu primerov na špecifické miesta DNA. Táto teplota je u každého páru primeru špecifická. Bola určená optimalizáciou na 6 jedincov testovaného druhu vtáka v iných prácach (Klaclová 2018, Verešová 2018). V priebehu tohto experimentu bola teplota v niektorých prípadoch ešte upravená, aby bol výsledný produkt čo najviac rozlíšiteľný.

4.7 Elektroforetická separácia PCR produktov

Separácia produktov pomocou elektroforézy prebiehala vo vyhriatej sekvenačnej elektroforetickej komôrke S2 Whatman Biometra, s rozmermi skiel 330 x 390 mm a 330 x 420 mm, s hrúbkou gélu 0,4 mm.

1. Sklá dôkladne umyť vodou a osušiť. Opláchnuť deionizovanou vodou, osušiť a 2x opláchnuť 96% etanolom a osušiť.
2. Na väčšie sklo na ploche, ktoré sa bude dotýkať gélu, naniesť prípravok pre odpudzovanie vody. Rain-off rozotrieť a nechať 5 minút schnúť, potom opláchnuť deionizovanou vodou a osušiť.
3. Plochu menšieho skla, ktorá bude v kontakte s géлом ošetriť 1 ml roztoku 0,5% kyseliny octovej v 96% etanole s 3 µl 3-metakryloxypropyltrimetoxysilanu. Opatrne rozotrieť po celej ploche skla, nechať zaschnúť a potom 4x opláchnuť 96% etanolom a osušiť.
4. V digestori položiť väčšie sklo ošetrovanou plochou hore, po stranách položiť 0,4mm spacery a na ne položiť ošetrovanou plochou dolu menšie sklo.
5. Pripraviť 6% polyakrylamidový gél v kadičke, premiešať a pomaly nalievať medzi sklá.
6. Po vyplnení celého priestoru medzi sklami gélom, vsunúť medzi sklá zvrchu hrebienok jeho rovnou stranou asi 1 cm hlboko. V mieste hrebienku zopnúť sklá aspoň 4 klipsami a nechať gél minimálne hodinu polymerizovať.

7. Po stuhnutí gélu odstrániť klipsy a sklá umyť vodou od zvyškou polyakrylamidu, osušiť a pomocou šróbovacích úchytoŧ umiestniť do elektroforetickej komôrky s hrebienkom hore a kratším sklom dovnútra elektoreforetickej komôrky.
8. Elektródové priestory zaliat' 0,5x TBE pufrom, vytiahnuť hrebienok z gélu a vzniknutú medzeru medzi sklami vyčistiť prúdom pufru injekčnou striekačkou. Uzavrieť elektródové priestory, nasadiť elektródy a spustiť nahrievanie gélu jednosmerným elektrickým prúdom, pričom hodnota výkonu dosahuje 90 W (hodnoty elektrického prúdu aj napätia sú 3 000 V/150 mA). Gél nahrievať asi 30 minút.
9. Asi 5 minút pred nanesením vzoriek, tieto vzorky zmiešať s 5 µl nanášacieho pufru a vložiť na 3 minúty do termocykleru nastaveným na denaturáciu. Po uplynutí času, zastaviť termocykler a vzorky ihneď presunúť do ľadu.
10. Po 30 minútach nahrievaniu gélu, vypnúť zdroj elektrického prúdu a medzi sklá hore vsunúť hrebienok, tentokrát opačnou stranou zúbkami nadol asi 1 mm hlboko do gélu.
11. Pipetou naniest' po 2 µl jednotlivých vzoriek do medzier medzi zúbkami hrebienku. Po napipetovaní vzoriek opäť uzavrieť a spustiť zdroj prúdu ako v predchádzajúcom prípade, ale výkon znížiť na 70 W. Nechať separovať 90 až 180 min.
12. Behom sešparacie vzoriek vopred pripraviť jednotlivé roztoky: 800 ml roztoku CH₃COOH (označený ako fix/stop roztok), 800 ml roztoku 1% HNO₃, 800 ml roztoku 0,1% roztoku AgNO₃ a 800 ml 3% roztoku Na₂CO₃ (označený ako vývojka), ktorý sa umiestni kvôli vychladeniu do chladničky.
13. Po uplynutí času elektroforetickej sešparácie, vypnúť zdroj prúdu, odpojiť elektródy, vypustiť pufr do zberných priestorov a gél opatrne vybrať a umiesniť do vodorovnej polohy menším sklom hore. Opatrne odobrať hrebienok, spacersy a skla od seba odpáčiť pomocou čepele noža.
14. Menšie sklo s prilepeným géлом hore uložiť do fotomisky, zaliat' fix/stop roztokom a nechať premiešavať na miešačke asi 20 minút.
15. Fix/stop roztok zliať späť a sklo s géлом premyť 3x asi po 2 minúty deionizovanou vodou. Ďalej premyť sklo s géлом roztokom HNO₃ na trepačke po dobu 4 minút, roztok potom vyliat' a znova premyť 4x deionizovanou vodou.

16. Nasledovne, sklo s gélom umiesniť na trepačku a zaliat' roztokom AgNO₃, do ktorého je potrebné tesne pred použitím pridať 1,2 ml formaldehydu. Nechať posôbiť 30 minút.
17. Na konci pôsobenia pripraviť misku s deionizovanou vodou a druhú misku s vychladenou vývojkou, do ktorej sa pridá pred použitím 1,2 ml formaldehydu a 160 µl 1% roztoku Na₂S₂O₃.
18. Po uplynutí času v roztoku AgNO₃, roztok zliat' späť do zásobnej fľaše. Sklo s gélom ponoriť do misky s deionizovanou vodou na 5 sekúnd a potom presunúť do misky s vývojkou a nechať trepať na miešačke kvôli sledovaniu vyvíjaniu hnedočierných prúžkov, ktoré predstavujú striebrom ofarbené PCR produkty.
19. Po objavení dostatočne viditeľných a zreteľných prúžkov, vyvíjanie sfarbenia zastaviť fix/stop roztokom uchovaným z kroku 15. Fix/stop roztok nechať posôbiť na gél asi 2 minúty, potom ponoriť sklo s gélom do deionizovanej vody a preniesť do sušiarne na 1 hodinu, kde sa vysuší pri 60 °C.
20. Po vysušení sklo s gélom vyhodnotiť na negatoskope.
21. Sklo s už nepotrebným gélom je možné odlepiť po ponorení na niekoľko hodín do roztoku NaOH o koncentrácii 1 mol/l.

4.8 Spracovanie amplifikovaných mikrosatelitových lokusov

Z vyhodnotených mikrosatelitových lokusov boli určené genotypy všetkých testovaných jedincov daného zvierat'a. Pomocou programu MS Office Excel 2016 boli tieto genotypy spracované a následne prevedené z formátu .xlsx do formátu .csv. V tomto formáte boli genotypy vyhodnotené programom Cervus 3.0.6. (Kalinowski *et al.*, 2007), analyzujúcim pozorovanú a očakávanú heterozygotnosť jednotlivých lokusov, obsah informácie o polymorfizme, pravdepodobnosť výskytu nulových alel a odchýlky od Hardy-Weinbergovej rovnováhy. Použitím programu Genepop 4.1 (Rousset, 2008) bola tiež určená prípadná väzba mikrosatelitových lokusov.

5 Výsledky

Praktickou časťou a tým aj cieľom tejto diplomovej práce bola analýza a charakteristika vybraných polymorfných *cross-species* mikrosatelitových lokusov na DNA izolovanej od dvoch druhov vtákov, plameniakovi ružovom a pelikánovi kučeravom. Jednotlivé výsledky budú rozdelené na dve časti, každá prisluchajúca jednému druhu.

5.1 Plameniak ružový

Na 22 nepríbuzných jedincoch tohto druhu bolo testovaných 24 mikrosatelitových lokusov, ktoré boli predtým označené ako polymorfné na 6 nepríbuzných jedincoch plameniaka ružového (Klaclová, 2018). Jednotlivých 13 mikrosatelitových lokusov bolo pôvodne navrhnutých pre vtákov z radu tučniaky a zvyšných 10 mikrosatelitov tvorili vtáacie univerzálne mikrosatelity odvodené v zhode s mikrosatelitovými sekvenciami genomickej DNA zebričky austrálskej a kury červenej.

Ďalej bola prevedená amplifikácia a genotypizácia mikrosatelitových lokusov. Pri amplifikácii PCR produktov bola ako teplota annealingu použitá teplota, ktorú určila Klaclová (2018) vo svojej bakalárskej práci. Túto teplotu som ďalej optimalizovala pre konkrétne stanovenie genotypov jednotlivých mikrosatelitových lokusov u všetkých jedincov. U plameniaka ružového sa annealingová teplota pohybovala v rozmedzí od 44°C do 66 °C. V prípade 3 polymorfných lokusov (Ech011, Man27 a CAM-24) bola optimalizácia prevedená znížením koncentrácie horečnatých iónov v amplifikačnej zmesi z 1,42 mmol/l na 1,07 mmol/l. Poslednou optimalizačnou možnosťou bolo zvýšenie času elektroforetickej separácie pre zreteľnejšie odlíšenie alel jednotlivých lokusov. Tento čas sa celkovo pohyboval v rozmedzí 90 až 180 minút.

Všetkých 24 mikrosatelitových primerových párov poskytlo PCR produkt, avšak v rámci hodnotenia boli dva mikrosatelity, predtým určené chybne ako polymorfné (Klaclová, 2018), vyhodnotené ako monomorfné. Lokusy RM6 a CAM-20 som preto z ďalšej analýzy vylúčila. Amplifikáciou primerovým párom PNN08 boli získané dva rôzne polymorfné PCR produkty. Celkovo bolo teda použitím 22 párov primerov detegovaných 23 polymorfných mikrosatelitových lokusov s rozsahom alel od 2 až 7.

Jednotlivý prehľad a charakteristika všetkých polymorfných mikrosatelitových lokusov plameniaka ružového je uvedený v tabuľke č. 4.

Tabuľka č. 4: Charakteristika 23 polymorfných mikrosatelitových lokusov testovaných na 22 nepříbuzných jedincov plameniaka ružového. V tabuľke je uvedený názov mikrosatelitového lokusu spolu s kódom nachádzajúcim sa v databáze GenBank (Accession Number), zdroj, sekvencia primerov, jednotka repetície, počet alel, annealingová teplota (T_a), čas elektroforetickej separácie (ELFO), súlad s Hardy-Weinbergovou rovnováhou (HW) (NS - v súlade s HW rovnováhou, ND - testovanie nie je možné, * - signifikantná odchýlka na hladine 5 %) a pravdepodobnosť výskytu nulových alel.

Názov lokusu (Accession No.)	Zdroj	Sekvencia primerov (5' → 3')	Jednotka repetície	Počet alel	T_a [°C]	ELFO [min]	HW	Nulové alely
Ech011 (FM878342)	tučniak žltohlavý <i>Eudyptes chrysolophus</i>	F: CACAGCACTGTGACAGAAGCA R: TTAAGTGGTTCGATTTGTCAGTCTTT	GT	2	44 ^x	90	NS	0,09
Ech024 (FM878355)		F: TGTTTCTTGCTTGCTACTTCCACAG R: CCAAATATGTTGTGGTCGACAGTG	CT	2	63	90	ND	-0,01
Ech030 (FM878361)		F: TGACGCCGCAGGGACTTC R: GCTCAGCTCTTGCTCACAGTTTCAG	CTAT	6	55	180	NS	-0,04
Em2 (KM272222)	tučniak modrý <i>Eudyptula minor</i>	F: GGCAGTGGGATCTTTCTTCC R: GACCATGCTGCAGGTTCTTG	AGAT	2	59	120	ND	-0,02
Em8 (KM272226)		F: GGTGCTGGGAGATGGCTTC R: ACGAAATGGTTTGGCTGGTG	AGAT	5	50	90	NS	-0,06
Em23 (KM272234)		F: GATGCATGTGGAGGAAGTGC R: GGCAACATGGTAGCTGACAC	CA	7	58	120	NS	-0,03
Emm5 (DQ83772933)		F: ATTAAGTGGCCTTGGGTTTC R: TTTATGCTCCCTCATTCCAC	CTTT	5	54	90	*	-0,25

Tabuľka č. 4: Pokračovanie 1.

Názov lokusu (Accession No.)	Zdroj	Sekvencia primerov (5' → 3')	Jednotka repetície	Počet alel	T _a [°C]	ELFO [min]	HW	Nulové alely
Man27 (EU267114)	tučniak žltooký <i>Megadyptes antipodes</i>	F: GATCCTGAGAAGAGAGACAG R: GGCTGTTTCATTTTGTCAC	GA/GT/ CA/GCA	6	52 ^x	120	NS	0,23
Man47 (EU267116)		F: ATACCTCCAGAATGGCTG R: CACTAAGGGTGACCAAGG	TGA	2	50	90	ND	0,75
Man55 (EU267120)		F: TTGAACTAGCAAGCAGTGTAG R: AAGGGCATTTCATTCT	TTG	2	58	120	ND	-0,06
PNN08 (JX494408)	tučniak okuliarnatý <i>Spheniscus demersus</i>	F: GGAAATGCCACTGAAAACCTAA R: GATAGATGGGGAAGTGGAAACA	ATAG	2; 5	55	90	NS; NS	-0,1; 0,17
Sh1Ca12 (AF540007)	tučniak jedнопásky <i>S.</i> <i>humboldti</i>	F: GCACACTGTGAGCTTGACAC R: CTTGGGCTCTCAAATACCC	T/AC	2	55	120	NS	0,03
TG01-148 (CK301512)	EST vtáčie mikrosatelity	F: TTGCAACACATTCTAATATTGC R: TTAAAGTACATCAAACAACAAAATC	AT/AC	2	44	90	ND	0,12
TG02-120 (DV945440)		F: TTGGGCAAAGATGATATGAATG R: AGCCAGGTCCAGTTTCTAAGC	AT	2	55	180	NS	0,37
TG03-035 (DV578303)		F: TGATGGCCAAATGCATACTC R: TATTTACAATATCTGCAGAAACAATCC	GT	2	59	90	ND	-0,02
TG04-041 (CK316380)		F: CTGAATTGTTGACCTTTGCTTAC R: GTCCTTTTAGAAAGCAGCACAG	CT/AG	2	49	90	ND	-0,08
TG05-030 (CK308028)		F: CTTCCATCACATCTGTAAC R: GTAAACATTAATATGCACTTTCTTAG	AT	3	60	90	ND	0,13

Tabuľka č. 4: Pokračovanie 2.

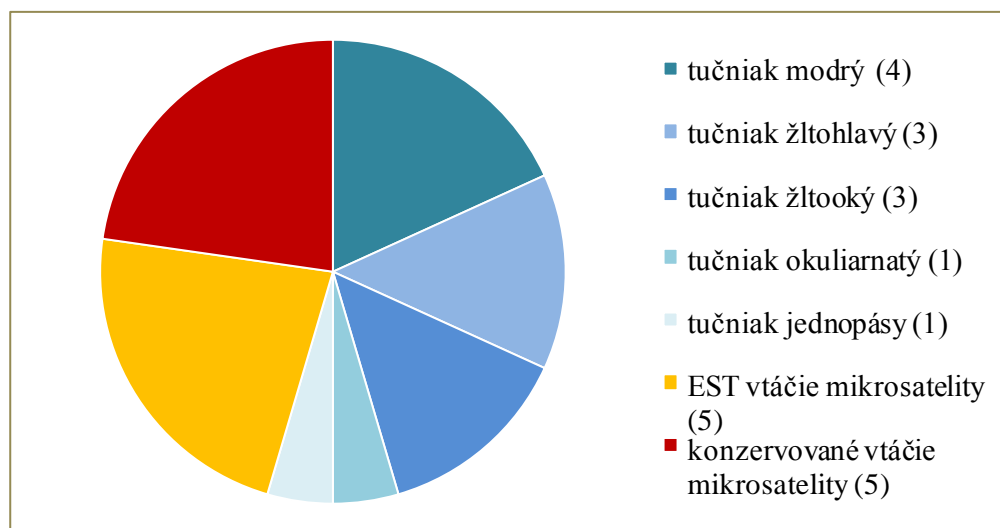
Názov lokusu (Accession No.)	Zdroj	Sekvencia primerov (5' → 3')	Jednotka repetície	Počet alel	T _a [°C]	ELFO [min]	HW	Nulové alely
CAM-03 (neuveďeno)	konzervované vtáčie mikrosatelity	F: TTAGCATAGCTCAGCATTGCC R: CGAGCATTCAAMCCTGTCATC	TG	2	62	90	ND	-0,04
CAM-07 (neuveďeno)		F: AAATGATGAGRTCTGGGTGAG R: CCATTTCCAAGWGATTTC	CT	3	56	180	NS	-0,08
CAM-11 (neuveďeno)		F: TGGTACAGGGACAGCAAACC R: AGATGCTGAGAGCGGATG	GT	2	54	90	NS	0,29
CAM-19 (neuveďeno)		F: TCTTGGAGGCAGATARGAAGTG R: GAGCAAGCAAAGATCACAAGC	GT	2	66	90	ND	0,44
CAM-24 (neuveďeno)		F: CCCACTTCAGTCTTCAGAGC R: TGGAGTATTTGGGATTGGAG	CA	7	51 ^x	105	NS	-0,03

Legenda:

^x Znížená koncentrácia MgCl₂ v PCR zmesi o 1/4 (z 1,42 mmol/l na 1,07 mmol/l).

U plameniaka ružového bolo na DNA 6 nepríbuzných jedincov otestovaných 173 párov primerov, z ktorých bolo 113 pôvodne izolovaných pre druhy z radu tučniaky a 60 párov primerov, ktoré boli navrhnuté pre amplifikáciu vtáčích univerzálnych primerov. Zo 113 párov primerov amplifikovalo polymorfny produkt u plameniaka ružového 12 mikrosatelitových párov primerov. Konkrétne išlo o 3 páry primerov odvodených od tučniaka žltohlavého, ďalšie 3 páry primerov od tučniaka žltookého, 4 páry primerov od tučniaka modrého a po 1 pári primerov od tučniaka okuliarnateho a tučniaka jednopáseho. Zo 60 univerzálnych vtáčích lokusov bolo desať mikrosatelitov polymorfnych.

Celková úspešnosť *cross-species* PCR amplifikácie mikrosatelitových primerových párov odvodených od tučniakov amplifikovaných u 22 jedincov plameniaka ružového je 10,6 %. Z univerzálnych primerových párov odvodených od DNA zebričky austrálskej a kury červenej amplifikovalo 10 párov primerov polymorfny PCR produkt. Celkovo išlo o 16,7% úspešnosť *cross-species* PCR amplifikácie. V grafe č. 1 sú uvedené polymorfne mikrosatelity rozdelené na základe druhov, od ktorých boli pôvodne izolované.

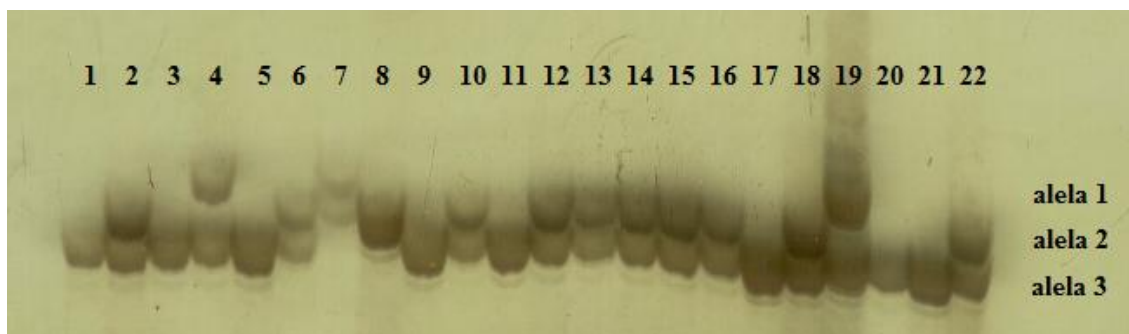


Graf č. 1: Rozdelenie polymorfnych mikrosatelitových primerových párov u plameniaka ružového na základe druhov, pre ktoré boli mikrosatelity pôvodne izolované. Počet polymorfnych mikrosatelitov u daných druhov znázorňujú čísla v zátvorkach.

V ďalšej časti mojej praktickej práce bola prevedená analýza 23 polymorfných *cross-species* mikrosatelitov u plameniaka ružového a to prostredníctvom programu Cervus 3.0.6 (Kalinowski *et al.*, 2007). Počet alel na lokus bol priemerne stanovený na 3,217 s priemerne očakávanou heterozygotnosťou 0,4318. Tento program tiež vyhodnotil pravdepodobnosť chýb pri identifikácii paternitných vzťahov s týmito 23 mikrosatelitmi. Pri určovaní prvého rodiča k mláďatu je pravdepodobnosť chyby $3,6877 \cdot 10^{-2}$. Pokiaľ je už jeden rodič známy a priraduje sa druhý rodič, je pravdepodobnosť nesprávneho priradenia $1,5646 \cdot 10^{-3}$. Celkovo pri priradení celého rodičovského páru je možnosť chyby $1,8740 \cdot 10^{-5}$. Pravdepodobnosť, že by mali 2 náhodní a nepríbuzní jedinci rovnakú alelovú konštitúciu pre všetky testované lokusy je $5,2 \cdot 10^{-11}$. Pravdepodobnosť výskytu dvoch mláďat so zhodnou konštitúciou alel je $2,023 \cdot 10^{-5}$. Program ďalej zhodnotil pravdepodobnosť výskytu nulových alel, ktorá je v ideálnom prípade 0. V prípade analýz paternity je tolerované rozmedzie 0–15 %. U šiestich lokusov bolo výrazne vysoké percento výskytu nulových alel, konkrétne u Emm5, Man27, Man47, TG02-120, CAM-11 a CAM-19. U lokusu Emm5 sa na hladine pravdepodobnosti 5 % vyskytovala odchýlka od Hardy-Weinbergovej rovnováhy. U ôsmich lokusov bola veľmi nízka hladina pravdepodobnosti výskytu nulových alel a zároveň boli tieto lokusy v súlade s Hardy-Weinbergovým zákonom. Testovanie nebolo možné vykonať u 10 lokusov. Zároveň bola programom Genepop 4.1 (Rousset, 2008) analyzovaná závislosť medzi všetkými *cross-species* mikrosatelitovými lokusmi u plameniaka ružového, avšak nebola nájdená žiadna väzba. V prílohe č. 1 je uvedený výstup z programu Cervus 3.0.6 (Kalinowski *et al.*, 2007).

Ďalej, okrem štatistických údajov je dôležitý aj dobre separovaný a rozlíšiteľný PCR produkt s jednotlivými alelmi. Preto uvádzam na ukážku obrázok elektroforetogramu rozdeleného PCR produktu amplifikovaného primerovým párom CAM-07, ktorý u plameniaka ružového poskytol 3 alely.

Obrázok č. 2: Elektroforetogram mikrosatelitového lokusu CAM-07 amplifikovaného pri T_a 56 °C u 22 nepríbuzných jedincov plameniaka ružového, s 3 detegovanými alelami. Čísla predstavujú jednotlivých jedincov.



5.2 Pelikán kučeravý

Ďalšie testovanie prebehlo na DNA 41 jedincov pelikána kučeravého, ktorého polymorfne lokusy som určila ako polymorfne na 6 jedincov tohto druhu v praktickej časti mojej bakalárskej práci (Verešová, 2018). Jednotlivých 12 lokusov bolo odvodených od rúrkonoscov, konkrétne 5 mikrosatelitových lokusov bolo pôvodne navrhnutých pre vtáky patriace do čeľade albatrosovitá, 3 mikrosatelitové lokusy pre vtáky z čeľade víchrovníčkovité, 3 lokusy pre víchrovníkovité a 1 mikrosatelitový lokus pre kulíka morského, zaradovaný do radu bahniaky, avšak tento mikrosatelit vykazoval polymorfny produkt pri *cross-species* PCR amplifikácii u rúrkonoscov.

Následne bola prevedená amplifikácia a genotypizácia polymorfnych mikrosatelitových lokusov pomocou annealingovej teploty stanovenej v experimente mojej bakalárskej práce (Verešová, 2018). Najnižšia teplota annealingu predstavovala 54 °C a najvyššia 65 °C. Separačný čas PCR produktov bol upravený podľa potreby, v rozmedzí 90 až 180 minút.

U pelikána kučeravého poskytlo polymorfny PCR produkt 11 párov primerov, u ktorých som detegovala 2 až 3 alely. Jeden mikrosatelitový lokus Dc19 poskytol monomorfny PCR produkt. Prehľad všetkých polymorfnych mikrosatelitových lokusov pelikána kučeravého je uvedený v tabuľke č. 5.

Tabuľka č. 5: Charakteristika 11 polymorfných mikrosatelitových lokusov testovaných na 41 nepříbuzných jedincov pelikána ružového. V tabuľke je uvedený názov mikrosatelitového lokusu spolu s kódom nachádzajúcim sa v databáze GenBank (Accession Number), zdrojový druh, sekvencia primerov, jednotka repetície, počet alel, annealingová teplota (T_a), čas elektroforetickej separácie (ELFO), súlad s Hardy-Weinbergovou rovnováhou (HW) (NS - v súlade s HW rovnováhou, ND - testovanie nie je možné, *** - signifikantná odchýlka na hladine 0,1 %) a pravdepodobnosť výskytu nulových alel.

Názov lokusu (Accession No.)	Zdrojový druh	Sekvencia primerov (5' → 3')	Jednotka repetície	Počet alel	T_a [°C]	ELFO [min]	HW	Nulové alely
Bb21 (HM171897)	víchrovník holubí (<i>Bulweria bulwerii</i>)	F: CTGATGTTCCAGGCCCTAAT R: CCTCTGAGCCAGCTAATTCC	TG	2	54	150	NS	-0,12
BFAL4 (neuvedené)	albatros čiernonohý (<i>Thalassarche melanophris</i>)	F: TGGGTCAGTTTACCTCTCAGC R: GTTTGCCATTTTAAACTGTCATTGGC	TC	2	58	90	***	0,99
BFAL14 (neuvedené)		F: CAAGAAGCTATTATTAAGCTATTTGTTCC R: GGGTGTGAAATCGTTTCTGC	ATTT	2	55	90	NS	-0,04
Cd1 (EU029083)	víchrovník plavý (<i>Calonectris diomedea</i>)	F: CAAGCAGTCAGAACTCTGTG R: TGAGTTTGCCCTACATGAAC	TG/TC	2	55	90	NS	0,05
Dc31 (AF096810)	albatros sivohlavý (<i>Thalassarche</i>)	F: CTGACTCTCTGGGATGAGCC R: GTACCCCTGGAAAGCCAGAC	CA/GC	2	58	90	NS	-0,13
LAAL7 (neuvedené)	albatros nemenlivý (<i>Phoebastria immutabilis</i>)	F: CAGCATGACCAAATCCATCC R: GTTTGGACACAAATGCCGTTCTTG	AGC	2	65	120	NS	-0,11
Ole03 (FR696379)	víchrovníček severský (<i>Oceanodroma leucorhoa</i>)	F: TCCTTCACCACCTCTTGCTGCC R: ACGCATCTGTAGCTCACAAATCCCAG	GAAA	2	63	150	ND	-0,04
Ole25 (FR696401)		F: CCTCTCATCGTAGGGACTG R: TTAAAGGCAGCGATTCTGTTC	AGAT/ GAAA	3	62	150	NS	0,21

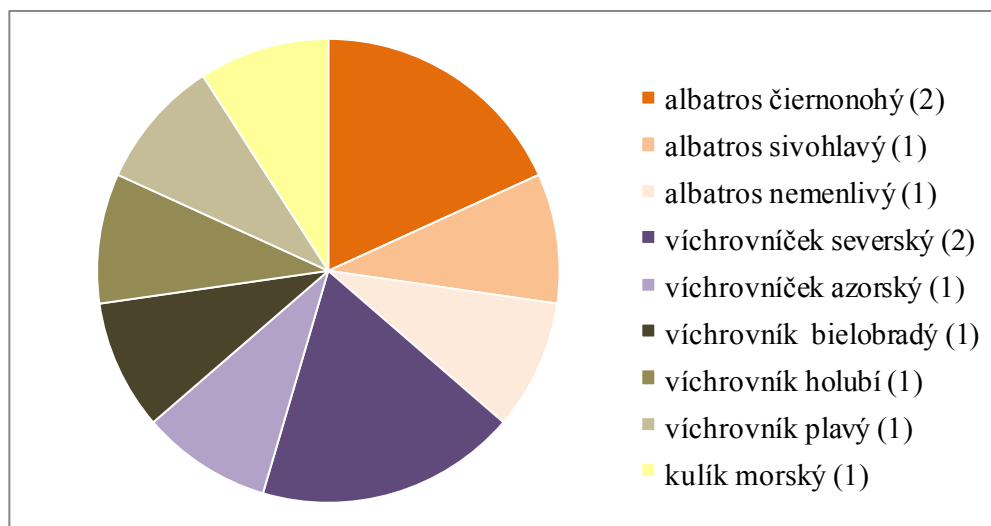
Tabuľka č. 5: Pokračovanie.

Názov lokusu (Accession No.)	Zdrojový druh	Sekvencia primerov (5' → 3')	Jednotka repetície	Počet alel	T _a [°C]	ELFO [min]	HW	Nulové alely
Omn6 (JQ303230)	víchrovníček azorský (<i>O. monteiroi</i>)	F: AGCCTACACCAGCAGAAGGA R: CCATACAGGCAACAATCACG	CA	3	55	150	NS	0,03
Paequ2 (AY371070)	víchrovník bielobradý (<i>O. castro</i>)	F: GCCTACTCCATCTTAATTGTG R: GGTTCATACAGTTTCCTAGGTC	CA/TT	2	56	150	NS	-0,07
Calex-01 (AM072446)	kulík morský (<i>Charadrius alexandrius</i>)	F: CTTCTCCATTGTTGTCACCTCCAGT R: CTTGACTTGGCCTGAGGTTTAGGTT	GT/GA/GC	3	64	90	NS	-0,10

Celkovo bolo na DNA 6 nepríbuzných jedincov pelikána kučeravého testovaných 207 párov primerov, ktoré boli navrhnuté pre rúrkonosce. Z 207 párov primerov ampifikovalo 12 párov primerov polymorfny PCR produkt. Na 41 jedincov bolo však detegovaných 11 polymorfnych PCR produktov, nakoľko bol jeden lokus určený ako monomorfny. Z čeľade albatrosovité vykazovali polymorfny PCR produkt 4 mikrosatelitové lokusy, 2 z nich od albatrosa čiernonohého, 1 od albatrosa sivohlavého a 1 lokus od albatrosa nemenlivého. Ďalšie 3 polymorfne produkty vykazovali mikrosatelity odvodené od víchrovníka holubieho, víchrovníka plavého a víchrovníka bielobradého. Od víchrovníčka severského boli odvodené 2 mikrosatelity a 1 mikrosatelit bol odvodený pre víchrovníčka azorského. Celková úspešnosť *cross-species* PCR amplifikácie pre vtáky patriace do radu rúrkonosce je 5,3 %.

Rovnako ako v experimentálnej časti mojej bakalárskej práce (Verešová, 2018), bol tiež testovaný mikrosatelitový lokus Calex-01 odvodený od kulíka morského, ktorý patrí do radu bahniaky. Tento mikrosatelit vykazoval taktiež polymorfny PCR produkt na DNA všetkých jedincov pelikána kučeravého.

Polymorfne mikrosatelity rozčlenené na základe druhov, od ktorých sú odvodené, sú uvedené v grafe č. 2.



Graf č. 2: Rozdelenie polymorfnych mikrosatelitových lokusov u pelikána kučeravého na základe druhov, pre ktoré boli mikrosatelity pôvodne izolované. Počet polymorfnych mikrosatelitov u daných druhov znázorňujú čísla v zátvorkách.

Možné väzby medzi jednotlivými lokusmi boli analyzované programom Genepop 4.7.5 (Rousset, 2008). Testované lokusy nevykazovali žiadnu väzbu, a dohromady bolo teda detegovaných 11 polymorfných nezávislých mikrosatelitov.

Program Cervus 3.0.6 (Kalinowski *et al.*, 2007) previedol analýzu 11 nezávislých polymorfných *cross-species* mikrosatelitov u pelikána kučeravého. Počet alel na lokus sa rovnal 2,273 s priemernou heterozygotnosťou 0,4441. Pravdepodobnosť chyby pri priradovaní mláďata k rodičovi, pričom obaja rodičia sú neznámi je 0,3017. V prípade, kedy je jeden rodič už známy, je chyba pri priradení druhého rodiča 0,0989. Pokiaľ sa priradzuje celý rodičovský pár je možnosť chyby 0,0223. Hodnota $3,8 \cdot 10^{-5}$ zasa znamená, s akou veľkou pravdepodobnosťou by mali 2 náhodní jedinci rovnakú variantu alel. Pravdepodobnosti genotypov 11 mikrosatelitov zhodných u dvoch mláďat odpovedá hodnota $6,02 \cdot 10^{-3}$. Vyššia pravdepodobnosť výskytu nulových alel bola pozorovaná u lokusu Ole25 a lokusu BFAL4, kde dosiahla pravdepodobnosť 21, resp. až 99 %. U lokusu BFAL4 bola tiež pozorovaná odchýlka od Hardy-Weinbergovej rovnováhy na hladine pravdepodobnosti 0,1 %. U zvyšných lokusov bola pozorovaná nízka pravdepodobnosť nulových alel, ktoré boli v súlade s Hardy-Weinbergovým zákonom. Výnimku tvorí lokus Ole03, u ktorého nebolo možné vykonať analýzu. Aj napriek tomu, že dané lokusy mali vhodné vlastnosti k využitiu k paternitným štúdiám, nie je možné ich použiť, pretože ich variabilita v rámci druhu bola nízka a vykazovala len 2 či 3 alely. Možnosť ich využitia môže byť v iných populačno-genetických analýzach. Výstup z programu Cervus 3.0.6 (Kalinowski *et al.*, 2007) u pelikána kučeravého je uvedený v prílohe č. 2.

Na niektorých elektroforetoqramoch nebolo možné rozlíšiť naraz všetky PCR produkty, nakoľko bola optimalizácia prevedená až na 41 jedincoch. Bolo preto nutné niektoré pokusy zopakovať, aby došlo k správne mu určeníu počtu alel u jednotlivých jedincov.

6 Diskusia

V rámci tejto diplomovej práce som charakterizovala 23 polymorfných mikrosatelitov na DNA 22 nepríbuzných jedincov plameniaka ružového a 11 polymorfných mikrosatelitov na DNA 41 jedincov pelikána kučeravého. Celá diskusia bude opäť rozdelená na dve samostatné časti rovnako ako predchádzajúce výsledky.

6.1 Univerzálne vtáčie mikrosatelity a mikrosatelity odvodené pre tučniaky amplifikované u plameniaka ružového

V prvej časti bolo pomocou *cross-species PCR* amplifikácie zanalyzovaných celkom 24 polymorfných mikrosatelitov na DNA 22 jedincov plameniaka ružového. Z toho 12 mikrosatelitov bolo pôvodne navrhnutých pre vtáky z radu tučniaky a zvyšných 10 tvorili univerzálne vtáčie mikrosatelity.

Tieto mikrosatelity najskôr testovala Klaclová (2018) na DNA 6 nepríbuzných jedincov plameniaka ružového. Po mojom testovaní som z 24 polymorfných mikrosatelitov dva z nich, konkrétne RM6 a CAM-20, označila za monomorfné a tým vylúčila z ďalšej analýzy.

Ahmed *et al.* (2009) charakterizovali u tučniaka žltohlavého pri annealingovej teplote 60 °C 25 polymorfných mikrosatelitových lokusov. V mojom prípade som u tohto tučniaka našla celkovo 3 polymorfné mikrosatelity na 22 jedincov plameniaka ružového. U lokusu Ech11 pri annealingovej teplote 44 °C som našla dve alely, zatiaľ čo autori našli u 27 jedincov alel 8. Ďalej, na 28 jedincoch autori u lokusu Ech024 pozorovali 5 alel, zatiaľčo ja som pozorovala pri annealingovej teplote 63 °C opäť 2 alely. Autori na 28 jedincoch identifikovali 11 alel, kým ja som u lokusu Ech030 pri teplote annealingu 55 °C detegovala 6 alel. Autori potom všetkých 25 polymorfných mikrosatelitových lokusov testovali na ďalších 4 druhoch tučniakov, a to na tučniakovi okatom (*Pygoscelis adeliae*, česky tučňák kroužkový), tučniakovi čiapočkatom (*Chinstrap penguin*, česky tučňák uzdičkový), tučniakovi bieloškvornom (*Gentoo penguin*, česky tučňák oslí) a tučniakovi veľkom (*King penguin*, tučňák patagonský), avšak konkrétne počty pre tieto druhy neuvádzajú. Mikrosatelit Ech011 u tučniaka veľkého vykazoval 5 alel a u tučniaka okatého mal 2 alely. Tri alely vykazoval lokus Ech024 u tučniaka okatého. Polymorfný PCR produkt poskytol mikrosatelit Ech030 a to u troch druhov, tučniaka čiapočkového a tučniaka bieloškvorného, kde mali po 5 alel a u tučniaka veľkého, kde boli pozorované 3 alely.

Pre tučniaka modrého bolo charakterizovaných 28 mikrosatelitov. Z tohto počtu som ja našla 4 mikrosatelity, ktoré poskytli polymorfný PCR produkt. Celkovo z práce Billing *et al.* (2007), ktorí charakterizovali 8 mikrosatelitov, som ja našla pri T_a 54 °C jediný polymorfný mikrosatelitový lokus Emm5 s 5 alelami. Je však nutné zmieniť, že tento lokus bol veľmi zle hodnotiteľný, a to aj po rôznych spôsoboch optimalizácie. Daný lokus autori testovali na dvoch rôznych populáciách. Z Filipovho ostrova na 28 jedincov, kde tento lokus vykazoval 11 alel a z Troubrigerovho ostrova bolo popísaných 8 alel u 15 jedincov. Annealingová teplota bola rovnaká pre obe testovanie a to 58 °C.

Z 20 polymorfných lokusov, ktoré charakterizovali Grosser *et Waters* (2015) u tučniaka modrého pri T_a 60 °C, som identifikovala 3 polymorfné lokusy. Lokus Em2 v mojom experimente vykazuje 2 alely pri T_a 59 °C, zatiaľčo v štúdiách autorov je uvedených 17 alel. Desať alel má podľa autorov lokus Em8. Ja som u tohto lokusu identifikovala 5 alel pri annealingovej teplote 50 °C. Posledný lokus Em23 je zároveň lokus, ktorý zo všetkých amplifikovaných lokusov u plameniaka ružového poskytol najvyšší počet alel a to 7. Amplifikáciu som vykonala pri T_a 58 °C. Autori u tohto lokusu našli 9 alel. Počet jedincov, na ktorých bol experiment vykonaný, autori vo svojich článkoch však neuvádzajú.

Na 43 jedincoch bolo popísaných Boessenkool *et al.* (2008) 12 mikrosatelitov pre tučniaka žltookého. Z tohto počtu som detegovala 3 polymorfné mikrosatelity. Prvým z nich je Man27, u ktorého som pri T_a 52 °C pozorovala 6 alel. Autori pri T_a 48 °C identifikovali len 2 alely. Toto bol jediný prípad, kedy som ja v rámci mojej experimentálnej práce našla výrazne väčší počet alel ako samotní autori. U lokusu Man47 boli mnou detegované 2 alely pri T_a 50 °C, zatiaľčo autori uvádzajú 4 alely pri T_a 48 °C. Počet alel u lokusu Man55 opäť pri 48 °C autori našli 2, rovnako ako aj ja v mojom experimenti avšak pri T_a 58 °C

Osem mikrosatelitných lokusov pre tučniaka okuliarnatého navrhli Labuschagne *et al.* (2013). Tieto lokusy potom testovali na 25 jedincoch, pri annealingovej teplote v rozsahu 50–60 °C. Z týchto mikrosatelitov, len jeden mikrosatelit PNN08, amplifikoval polymorfný PCR produkt v mojej experimentálnej práci. PNN08 nasadal na dva rôzne lokusy a tým aplifikoval PCR produkt s dvoma polymorfnými oblasťami. Pri teplote annealingu T_a 55 °C bolo celkovo v jeho PCR produktoch detegovaných 2–5 alel. V práci autorov tento lokus vykazoval len 4 alely.

Schlosser *et al.* (2003) identifikovali 7 mikrosatelitov pre tučniaka jednopáseho. Amplifikáciu vykonali na 24 jedincov. Polymorfizmus pri T_a 60 °C vykazoval lokus

Sh1Ca12, u ktorého autori identifikovali 11 alel. V mojom experimente som u tohto lokusu identifikovala 2 alely pri T_a 55 °C. Tento mikrosatelit potom autori testovali u ďalších druhov tučniakov, a to u tučniaka dvojpáseho (*Spheniscus magellanicus*, česky tučňák magellanský), tučniaka okuliarnateho, tučniaka bieloškvrného, tučniaka skalného (*Eudyptes chrysocome*, česky tučňák skalní), tučniaka modrého a u tučniaka veľkého, u ktorých tiež detegovali polymorfne PCR produkty.

Čo sa týka univerzálnych vtáčích mikrosatelitov, celkovo bolo Klaclovou (2018) otestovaných 60 mikrosatelitov, z ktorých označila 11 ako polymorfnych. Po mojom testovaní som jeden mikrosatelit označila za monomorfný a u zvyšných desiatich mikrosatelitov som potvrdila detegovaný polymorfizmus.

V práci Dawsona *et al.* (2010) bolo navrhnutých celkom 36 párov primerov, ktoré amplifikujú 35 EST vtáčích mikrosatelitov. Analýzu autori previedli na 4 jedincov zebričky austrálskej, 4 jedincov kury červenej a 1 jedincovi kury domácej. U lokusu TG01-148 som pri T_a 44 °C našla 2 alely, rovnako ako aj autori u zebričky austrálskej s použitím T_a 56 °C. U kury červenej a kury domácej (*Gallus gallus domesticus*) bol detegovaný monomorfný produkt. Amplifikáciou lokusu TG02-120 u zebričky austrálskej a kury domácej bol detegovaný monomorfný produkt. U kury červenej však boli detegované 3 alely, zatiaľčo ja som u plameniaka ružového detegovala 2 alely pri T_a 55 °C. Dve alely som identifikovala vďaka lokusu TG03-035 pri T_a 60 °C. Autori však pri všetkých druhoch charakterizovali lokus s monomorfným PCR produktom. Pri T_a 49 °C som našla 2 alely u lokusu TG04-041, rovnako ako aj autori u zebričky austrálskej a kury červenej. U kury domácej bol detegovaný monomorfizmus. Lokus TG05-30 vyhodnotili autori ako monomorfný u všetkých druhov, kým ja som objavila 3 alely pri T_a 60 °C.

Ďalších 24 konzervovaných vtáčích mikrosatelitov popísali Dawson *et al.* (2013) v inej práci. Testovanie prebiehalo na jedincov zebričky austrálskej a kury červenej, pričom pre amplifikáciu lokusov bola použitá annealingová teplota 56 °C. Z celkového počtu som ja identifikovala 5 polymorfnych lokusov na jedincov plameniaka ružového. Týchto vybratých 5 mikrosatelitov (mnou označených ako polymorfne), autori charakterizovali na 12 jedincov zebričky austrálskej a 4 jedincov kury červenej (resp. 3 jedincov kury červenej u lokusu CAM-07). U lokusu CAM-03 bolo autormi nájdených 11 alel u zebričky austrálskej a 2 alely u kury červenej. Pri T_a 62 °C som ja u plameniaka ružového našla 2 alely. Šesť alel lokusu CAM-07 bolo nájdených pre zebričku austrálsku a len 1 alela bola objavená u kury červenej. V mojom experimente

som našla 3 alely pre tento lokus pri teplote annealingu 56 °C. V zvyšných 3 lokusov (CAM-11, CAM-19 a CAM-24) bolo autormi nájdených vždy po 6 alel u zebričky austrálskej, zatiaľčo lokus u kury červenej určili ako monomorfný. Pre plameniaka ružového, som ja u lokusu CAM-11 našla 2 alely pri T_a 54 °C, u lokusu CAM-19 opäť 2 alely ale pri T_a 66 °C, a pre lokus CAM-24 pri 51 °C som objavila až 6 alel.

Cross-species PCR amplifikáciou sa zaoberá najmä Laboratórium populačnej genetiky na Katedre bunčnej biologie a genetiky PĚF UPOL. Univerzálne vtáacie mikrosatelity a mikrosatelity navrhnuté pre tučniakov boli tiež testované u rôzne príbuzných vodných druhov vtákov v rámci skupiny Aequorlitorornithes (Prum *et al.*, 2015). Pechová (2014) previedla testovanie u myktérie lysohlavej, Janušová (2017) u potápky chochlatej, Šuláková (2017) u pelikána sivého a plameniaka červeného (2019), Zlochová (2017) u plameniaka červeného, Klaclová (2018) u plameniaka ružového a Kopečná (2020) u pelikána červenakavého. Prehľad jednotlivých lokusov s nájdeným počtom alel je uvedený v tabuľke č. 6.

Tabuľka č. 6: Prehľad polymorfných mikrosatelitov pôvodne navrhnutých pre vtákov z radu tučniaky a univerzálne vtáacie primery testovaných u rôznych druhov vodných vtákov v rámci testovania v Laboratóriu populačnej genetiky na Katedre bunčnej biologie a genetiky PĚF UPOL. V zátvorke je uvedený počet jedincov, na ktorom prebehlo testovanie, jednotlivé čísla uvádzajú počet detegovaných alel. Písmeno M označuje monomorfný PCR produkt, nt uvádza, že daný lokus nebol testovaný.

Názov lokusu	Počet alel u rôznych druhov					
	plameniak ružový (41)	plameniak červený (30)	potápka chochlatá (13)	myktéria lysohlavá (6)	pelikán sivý (6)	pelikán červenakavý (12)
Ech011	2	2	nt	M	M	M
Ech024	2	2	nt	M	M	M
Ech030	6	5	nt	M	M	M
Em2	2	2	nt	M	M	M
Em8	5	M	nt	M	3	5
Em23	7	7	nt	M	M	M
Emm5	5	3	3	M	2	3
Man27	6	3	nt	2	M	M
Man47	2	2	nt	M	M	M

Tabuľka č. 6: Pokračovanie.

Názov lokusu	Počet alel u rôznych druhov					
	plameniak ružový (41)	plameniak červený (30)	potápka chochlatá (13)	myktéria lysohlavá (6)	pelikán sivý (6)	pelikán červenavý (12)
Man55	2	3	nt	M	M	M
PNN08	2 + 5	5	nt	M	M	M
Sh1Ca12	2	M	nt	M	M	M
TG01-148	2	M	nt	M	M	M
TG02-120	2	M	nt	M	M	M
TG03-035	2	M	nt	M	M	M
TG04-041	2	M	nt	M	M	2
TG05-30	2	M	nt	M	M	M
CAM-03	2	M	nt	4	M	M
CAM-07	3	M	nt	M	M	2
CAM-11	2	3	5	5	2	M
CAM-19	2	M	3	M	M	M
CAM-24	6	4	5	M	2	3

Z tabuľky č. 6 je možné zhrnúť, že medzi najúspešnejšie polymorfné mikrosatelity od tučniakov a univerzálnych vtáčích mikrosatelitov patria lokusy Emm5, CAM-11 a CAM-24, ktoré amplifikovali polymorfný PCR produkt u 5 druhov z testovaných 6 druhov. Najviac polymorfných PCR produktov, z tých, ktorých som ja detegovala u plameniaka ružovéhoho vykazuje plameniak červený a síce 12, čo sa dá očakávať, nakoľko sú to druhy v rámci jedného rodu. Zvyšné lokusy u ďalších druhov vykazovali polymorfizmus zriedkavo.

V Laboratóriu populačnej genetiky na Katedre bunčnej biológie a genetiky PĚF UPOL bolo doteraz identifikovaných a charakterizovaných celkom 150 polymorfných nezávislých mikrosatelitových lokusov u 22 nepříbuzných jedincov plameniaka ružovéhoho. Testované *cross-species* mikrosatelity boli odvodené od druhov z radov rúrkonosce, brodivce, bahniaky, veslonožce, tučniaky a od univerzálnych vtáčích mikrosatelitov.

Od zástupcov kladu *Aequorlitorornithes* vykazovalo množstvo mikrosatelitov polymorfizmus. Avšak nie všetky mikrosatelity sú vhodné pre paternitné či genetické štúdie. Dôvodom je vysoký výskyt nulových alel, väzby medzi lokusmi či zle hodnotiteľné produkty. Preto je vhodné pokračovať v ďalšom testovaní mikrosatelitov

príbuzenských skupín vodných vtákov pomocou *cross-species* a novo navrhnutých mikrosatelitov od už testovaných zástupcov.

6. 2 Mikrosatelity odvodené pre rúrkonosce amplifikované u pelikána kučeravého

V ďalšej časti som analyzovala 12 vybraných polymorfných mikrosatelitov na DNA 41 jedincov pelikána kučeravého, ktoré som pred tým označila za polymorfné na DNA 6 jedincov pelikána kučeravého (Verešová, 2018). Mikrosatelity boli pôvodne navrhnuté pre vtákov z radu rúrkonosce a bahniaky. Z celkového počtu 12 mikrosatelitov som vylúčila lokus Dc19, ktorý poskytol monomorfný PCR produkt.

Celkovo bolo Burg (1999) nájdených 26 mikrosatelitov pre albatrosa sťahovavého a albatrosa sivohlavého. Amplifikácia lokusov prebiehala pri dvoch rôznych annealingových teplotách a to T_{a1} 48 °C a T_{a2} 52 °C. U lokusu Dc19 boli u albatrosa sivohlavého nájdené 3 alely, kým ja som pri rôznych optimalizačných teplotách annealingu určila tento lokus ako monomorfný. U lokusu Dc31, Burg (1999) polymorfizmus nepozorovala, v mojom prípade som pri T_a 58 °C objavila 2 alely.

Hernandez *et al.* (2014) charakterizovali 15 polymorfných mikrosatelitov pre albatrosa čiernonohého, nemenlivého a bielochrbtého (*Phoebastria albatrus*). Ako teplotu annealingu autori použili 60 °C. Lokus BFAL4 poskytol podľa autorov až 8 alel, mnou nájdený počet alel pri T_a 58 °C boli 2. Pre lokus BFAL14, 4 alely boli detegované u albatrosa čiernonohého a po 3 alely u zvyšných dvoch druhov albatrosa. Ja som pri T_a 55 °C detegovala 2 alely. U lokusu LAAL7 boli nájdené 4 alely u albatrosa čiernonohého a albatrosa nemenlivého. Dve alely poskytol PCR produkt od albatrosa bielochrbtého. U pelikána kučeravého boli pre tento lokus nájdené 2 alely pri T_a 65 °C.

Pre víchrovníka bielobradého bolo v práci Techow *et al.* (2004) charakterizovaných 6 mikrosatelitových lokusov. Pri T_a 54 °C u Paequ2 našli autori 4 alely. Ja som pri T_a 56 °C pozorovala 2 alely.

Jedenásť polymorfných mikrosatelitov objavil Bried *et al.* (2008) pre víchrovníka plavého. Z toho u lokusu Cd1 som ja detegovala polymorfný produkt pri T_a 55 °C s 2 alelami, kým vedci našli až 6 alel.

Ďalších 11 mikrosatelitov charakterizoval Andris *et al.* (2010) od víchrovníka holubieho. U lokusu Bb21 pri T_a 58 °C objavil 3 alely, ja som však našla len 2 alely a to pri T_a 54 °C.

Bicknell *et al.* (2011) popísali celkom 26 mikrosatelitov pre víchrovníčka severského. Lokus Ole03 amplifikovaný pri T_a 60 °C poskytol 12 alel a lokus Ole25 zasa 7 alel. Pri T_a 63 °C u Ole03 som detegovala len 2 alely, kým u Ole25 pri T_a 62 °C som našla 3 alely.

Pre víchrovníčka azorského bolo nájdených 18 mikrosatelitov, ktoré popísali Bried *et al.* (2012). Z tohto počtu jeden mikrosatelit poskytol polymorfný PCR produkt u pelikána kučeravého a to Omn6, u ktorého som objavila 3 alely pri T_a 55 °C. Autori však našli až 9 alel.

Navyše bol do testovania zahrnutý lokus Calex-01, ktorý bol označený ako polymorfný u pelikána kučeravého na 6 jedincov. Mikrosatelit bol pôvodne navrhnutý pre kulíka morského (Küpper *et al.*, 2007). Autorom poskytol polymorfizmus s pozorovanými 10 alelami pri T_a 62 °C. Ja som detegovala 3 alely pri annealingovej teplote 64 °C.

Mikrosatelity odvodené od zástupcov radu rúrkonosce boli tiež testované u ďalších vodných vtákov a to u myktérie lysohlavej (Nedvědová, 2015), potápky chochlatej (Janušová, 2017), plameniaka červeného (Strejčková, 2016) plameniaka ružového (Kůrová, 2017, Zlochová, 2017) a u pelikána červenkavého (Kopečná, 2018). Prehľad jednotlivých lokusov s nájdeným počtom alel je uvedený v tabuľke č. 7.

Tabuľka č. 7: Prehľad polymorfných mikrosatelitov pôvodne navrhnutých pre vtákov z radu rúrkonosce, resp. bahniaky, testovaných u rôznych druhov vodných vtákov v rámci testovania v Laboratóriu populačnej genetiky na Katedre bunčnej biologie a genetiky PŘF UPOL. V zátvorke je uvedený počet jedincov, na ktorom prebehlo testovanie, jednotlivé čísla uvádzajú počet detegovaných alel. Písmeno M označuje monomorfný PCR produkt.

Názov lokusu	Počet alel u rôznych druhov					
	pelikán kučeravý (41)	pelikán červenkavý (6)	plameniak červený (30)	plameniak ružový (6)	potápka chochlatá (6)	myktéria lysohlavá (6)
Bb21	2	M	2	M	7	M
BFAL4	2	2	2	M	M	2
BFAL14	2	M	4	M	M	M
Cd1	2	M	M	M	M	4
Dc31	2	M	4	2	M	M

Tabuľka č. 7: Pokračovanie.

Názov lokusu	Počet alel u rôznych druhov					
	pelikán kučeravý (41)	pelikán červenavý (6)	plameniák červený (30)	plameniák ružový (6)	potápka chochlatá (6)	myktéria lysohlavá (6)
LAAL7	2	2	6	4	M	M
Ole03	2	M	M	M	M	M
Ole25	3	M	M	M	M	3
Omn6	3	M	M	M	M	M
Paequ2	2	4	M	M	M	M
Calex-01	3	M	M	2	M	2

Z mikrosatelitov odvodených pôvodne pre vtáky z radu rúrkonosce, boli najúspešnejšie lokusy BFAL4 a LAAL7, ktoré vykazovali polymorfizmus u 4 druhov. Naopak, medzi najmenej úspešné lokusy patria Ole03 a Omn6, ktoré boli označené za polymorfne iba u pelikána kučeravého a u ďalších druhov poskytli monomorfný produkt.

Dohromady bolo v Laboratóriu populačnej genetiky na Katedre bunčnej biologie a genetiky PřF UPOL detegovaných 34 nezávislých polymorfných lokusov charakterizovaných na 41 jedincov pelikána kučeravého. Išlo o 23 lokusov v diplomovej práci Chmelařovej (2012) a zvyšných 11 lokusov bola popísaných v rámci tejto práce. Charakterizované lokusy boli odvodené pôvodne pre druhy z radov veslonožce, brodivce a plameniaky.

V rámci čeľade pelikánovitá je podľa Chmelařovej (2012), najúspešnejšia *cross-species* amplifikácia u pelikána ružového a najmenej u pelikána kučeravého. Podľa výsledkov jej analýz sa preto domnieva, že pelikán kučeravý sa ako prvý odpojil z vývojovej vetvy pelikánov.

Pre ďalšie fylogenetické a populačné štúdie je vhodné pokračovať v *cross-species* testovaní ďalších *de novo* mikrosatelitov odvodených od zástupcov z radov veslonožce, ako je napríklad kormorán ušatý (*Phalacrocorax auritus*) (Mercer *et al.*, 2010), sula červenonohá (*Sula sula*, česky terej červenonohý) (Morris-Pocock *et al.*, 2010), či od ďalších mikrosatelitov izolovaných pre plameniaky, nakoľko Chmelařová (2012) vo svojich výsledkoch vďaka *cross-species* naznačila určitú príbuznosť medzi pelikánmi a plameniakmi.

7 Záver

V tejto diplomovej práci som analyzovala a charakterizovala polymorfné mikrosatelity u dvoch druhov vodných vtákov. Išlo o 13 mikrosatelitov pôvodne odvodených pre tučniaky (Sphenisciformes) a 11 univerzálnych vtáčích mikrosatelitov amplifikovaných na 22 jedincov plameniaka ružového (*Phoenicopterus roseus*) a 11 mikrosatelitov izolovaných pre rúrkonosce (Procellariiformes) a 1 mikrosatelit od kulíka morského (*Charadrius alexandrius*) z radu bahniaky (Charadriiformes) na 41 jedincov pelikána kučeravého (*Pelecanus crispus*).

Praktická časť tejto práce bola rozdelená na dva experimenty. V prvom z nich, z celkových 24 mikrosatelitov som potvrdila polymorfizmus u 22 lokusov s rozsahmi alel 2 až 7. V ďalšej časti bolo celkovo 11 mikrosatelitov polymorfných z pôvodných 12 s 2–3 alelami. Polymorfné lokusy boli potom podrobené populačno-genetickej analýze a charakterizované programom Cervus 3.0.6. Program Genepop 4.1 hľadal možné väzby medzi jednotlivými lokusmi.

V Laboratóriu populačnej genetiky na Katedre bunčnej biológie a genetiky PŘF UPOL bolo doteraz identifikovaných 150 polymorfných nezávislých lokusov pre plameniaka ružového a 34 polymorfných nezávislých lokusov pre pelikána kučeravého.

8 Použitá literatura

Adámková, V. (2019): *Cross-species* amplifikace mikrosatelitů z řádu tučňáci a konzervovaných ptačích mikrosatelitů u pelikána afrického (*Pelecanus rufescens*). Bakalářská práce. Depon in: Knihnice biologických oborů PřF UPOL, Olomouc.

Ahmed, S., Hart, T., Dawson, D. A., Horsburgh, G. J., Trathan, P. N., 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.

Aishwarya, V., Grover, A., Sharma, P. C. (2007): EuMicroSatdb: a database for microsatellites in the sequenced genomes of eukaryotes. *BMC Genomics*, 8, 225.

Andris, M., Dubois, M.-P., Jarne, P., Bonadonna, F., Bried, J. (2010): Eleven polymorphic microsatellite markers in Bulwer's petrel, *Bulweria bulwerii*, and cross-species amplification in three other Procellariiformes. *Molecular Ecology Resources*, 4, 122.

Angers, B., Bernatchez, L. (1997): Complex evolution of a salmonid microsatellite locus and its consequences in inferring allelic divergence from size information. *Molecular Biology and Evolution*, 14, 230–238.

Anmarkrud, J. A., Kleven, O., Bachmann, L., Lifjeld, J. T. (2008): Microsatellite evolution: Mutations, sequence variation, and homoplasy in the hypervariable avian microsatellite locus HrU10. *BMC Evolutionary Biology*, 8, 138.

Amat, J. A., Rendón, M. A., Garrido-Fernández, J., Garrido, A., Rendón-Martos, M., Pérez-Gálvez, A. (2011): Greater flamingos *Phoenicopterus roseus* use uropygial secretions as make-up. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 65, 665–673.

Bauer, A. (2007): Isolation of polymorphic microsatellites in *Phoenicopterus ruber* / *P. roseus*. Diplomová práce. Institute of Pharmacy and Molecular Biotechnology, Heidelberg University, Heidelberg, Germany.

Bicknell, A. W. J., Dawson, D. A., Horsburgh, G. J., Knight, M. E., Bilton, D. T., Votier, S. C. (2011): Characterisation and predicted genome locations of Leach's storm-petrel (*Oceanodroma leucorhoa*) microsatellite loci (Procellariidae, Aves). *Conservation Genetics Resources*, 3, 711–716.

Billing, T. M., Guay, P. J., Peucker, A. J., 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.

Boessenkool, S., King, T. M., Seddon, P. J., Waters, J. M. (2008): Isolation and characterization of microsatellite loci from the yellow-eyed penguin (*Megadyptes antipodes*). *Molecular Ecology Resources*, 8, 1043–1045.

Bried, J., Dubois, M.-P., Jouventin, P., Santos, R. S. (2008): Eleven polymorphic microsatellite markers in Cory's shearwater, *Calonectris diomedea*, and *cross-species* amplification on threatened Procellariiformes. *Molecular Ecology Resources*, 8, 602–604.

Bried, J., Andris, M., Dubois, M.-P., Jarne, P. (2012): Eighteen polymorphic microsatellite markers in Monteiro's storm-petrel, *Oceanodroma monteiroi*, and *cross-species* amplification in three other Procellariiformes. *Molecular Ecology Resources*, 9, 913–915.

Brinkmann, B., Klintschar, M., Neuhuber, F., Hühne, J., Rolf, B. (1998): Mutation rate in human microsatellites: influence of the structure and length of the tandem repeat. *American Journal of Human Genetics*, 62, 1408–1415.

Brown, R. M., Jordan, W. C. (2009): Characterization of polymorphic microsatellite loci from Round Island Petrels (*Pterodroma arminjoniana*) and their utility in other seabird species. *Journal of Ornithology*, 150, 925–929.

Bruford, M. W., Wayne, R. K. (1993): Microsatellites and their application to population genetic studies. *Current Opinion in Genetics and Development*, 3, 939–943.

Brusatte, S. L., O'Connor, J. K., Jarvis, E. D. (2015): The origin and diversification of birds. *Current Biology*, 25, 888–898.

Burg, T. M. (1999): Isolation and characterization of microsatellites in albatrosses. *Molecular Ecology*, 8, 338–341.

Cracraft, J., Clarke, J. (2001): The basal clades of modern birds. In: Gauthier, J., Gall, L. F., (Eds.): *New perspectives on the origin and early evolution of birds*. New Haven: Peabody Museum of Natural History, Yale University, 143–156.

Cracraft, J., Barker, F. K., Braun, M., *et al.* (13 co-authors). (2004): Phylogenetic relationships among modern birds (Neornithes). In: Cracraft, J., Donoghue, M. J., (Eds.): *Assembling the Tree of Life*. New York, Oxford University Press, 468–489.

Dakin, E. E., Avise, J. C. (2004): Microsatellite null alleles in parentage analysis. *Heredity*, 93, 504–509.

Daniels, J., Holmans, P., Williams, N., Turic, D., McGuffin, P., Plomin, R., Owen, M.J. (1998): A simple method for analyzing microsatellite allele image patterns generated from DNA pools and its application to allelic association studies. *The American Journal of Human Genetics*, 62, 1189–1197.

Dawson, D. A., Horsburgh, G. J., Küpper, C., Stewart, I. R. K., Ball, A. D., Durrant, K. L., Hansson, B., Bacon, I., Bird, S., Klein, Á., Krupa, A. P., Lee, J. W., Martín-Gálvez, D., Simeoni, M., Smith, G., Spurgin, L. G., Burke, T. (2010): New methods to identify conserved microsatellite loci and develop primer sets of high cross-species utility – as demonstrated for birds. *Molecular Ecology Resources*, 10, 475–494.

Dawson, D. A., Ball, A. D., Spurgin, L. G., Martín-Gálvez, D., Stewart, I. R. K., Horsburgh, G. J., Potter, J., Molina-Morales, M., Bicknell, A. W. J., Preston, S. A. J., Ekblom, R., Slate, J., Burke, T. (2013): High-utility conserved avian microsatellite markers enable parentage and population studies across a wide range of species. *BMC Genomics*, 14, 176.

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

Eckert, K. A., Yan, G., Hile, S. E. (2002): Mutation rate and specificity analysis of tetranucleotide microsatellite DNA alleles in somatic human cells. *Molecular Carcinogenesis*, 34, 140–150.

Ericson, P. G. P., Anderson, C. L., Britton, T., Elzanowski, A., Johansson, U. S., Källersjö, M., Ohlson, J. I., Parsons, T. J., Zuccon, D., Mayr, G. (2006): Diversification of Neoaves: integration of molecular sequence data and fossils. *Biology Letters*, 2, 543.

Estoup, A., Jarne, P., Cornuet, J.-M. (2002): Homoplasy and mutation model at microsatellite loci and their consequences for population genetics analysis. *Molecular Ecology*, 11, 1591–1604.

Feduccia, A. (1999): *The origin and evolution of birds*. Yale University Press.

Frias-Soler, R., Tindle, E., Lopez, G. E., Blomberg, S., Studer-Thiersch, A., Wink, M., Tindle, R. (2014): Genetic and phenotypic evidence supports evolutionary divergence of the American flamingo (*Phoenicopterus ruber*) population in the Galapagos Islands. *Waterbirds*, 37, 349–468.

Gagneux, P., Boesch, C., Woodruff, D. S. (1997): Microsatellite scoring errors associated with noninvasive genotyping based on nuclear DNA amplified from shed hair. *Molecular Ecology*, 6, 861–868.

García-Moreno, J., Mindell, D. P. (2000): Using homologous genes on opposite sex chromosomes (gametologs) in phylogenetic analysis: a case study with avian CHD. *Molecular Biology and Evolution*, 17, 1826–1832.

Geraci, J., Gaillard, M., Bechet, A., Cezilly, F., Wattier, R. A. (2010): Isolation and characterization of 37 microsatellite loci from the Greater flamingo (*Phoenicopterus roseus*). *Molecular Ecology Resources*, Preprint.

Grosser, S., Waters, J. M. (2015): Development and characterisation of 20 novel microsatellite markers for the little blue penguin (*Eudyptula minor*) using nextgeneration sequencing. *Conservation Genetics Resources*, 7, 143–145.

Gupta, P. K., Varshney, R. K. (2000): The development and use of microsatellite markers for genetic analysis and plant breeding with emphasis on bread wheat. *Euphytica*, 113, 163–185.

Hackett, S. J., Kimball, R. T., Reddy, S., Bowie, R. C. K., Braun, E. L., Braun, M. J., Chojnowski, J. L., Cox, W. A., Han, K.-L., Harshman, J., Huddleston, C. J., Marks, B. D., Miglia, K. J., Moore, W. S., Sheldon, F. H., Steadman, D. W., Witt, C. C., Yuri, T (2008): A phylogenomic study of birds reveals their evolutionary history. *Science*, 320, 1763–1768.

Hancock, J. M. (1999): Microsatellites and other simple sequences: genomic context and mutational mechanisms. In: Goldstein, D. B., Schlötterer, C., (Eds.): *Microsatellites: Evolution and Applications*. Oxford University Press. New York, 1–9.

Harrison, G. L., McLenachan, P. A., Phillips, M. J., Slack, K. E., Cooper, A., Penny, D. (2004): Four new avian mitochondrial genomes help get to basic evolutionary questions in the late Cretaceous. *Molecular Biology and Evolution*, 21, 974–983.

Hedges, S. B., Sibley, C. G. (1994): Molecules vs. morphology in avian evolution: the case of the "pelecaniform" birds. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 91, 9861–9865.

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

Hickman, C. R., Peters, M. B., Crawford, N. G., Hagen, C., Glenn, T. C., Somers, C. M. (2008): Development and characterization of microsatellite loci in the American white pelican (*Pelecanus erythrorhynchos*). *Molecular Ecology Resources*, 8, 1439–1441.

Hodel, R. G., Segovia-Salcedo, M. C., Landis, J. B., Crowl, A. A., Sun, M., Liu, X., Gitzendanner, M. A., Douglas, N. A., Germain-Aubrey, C. C., Chen, S., Soltis, D. E., Soltis, P. S. (2016): The report of my death was an exaggeration: A review for researchers using microsatellites in the 21st century. *Applications in Plant Sciences*, 4, apps.1600025.

de Ponte Machado, M., Feldheim, K. A., Sellas, A. B., Bowie, R. C. K. (2009): Development and characterization of microsatellite loci from the Great White Pelican (*Pelecanus onocrotalus*) and widespread application to other members of the Pelecanidae. *Conservation Genetics*, 10, 1033–1036.

del Hoyo, J. (1992): Family Phoenicopteridae (flamingos). In: del Hoyo, J., Elliot, A., Sargatal, J., eds. *Handbook of the birds of the world*, Vol. 1. Lynx Edicions, Barcelona, 508–526.

Huang, T., Wang, Y., Zhou, L., Xu, Z. (2019): Complete mitochondrial genome of *Pelecanus crispus* and its phylogeny. *Mitochondrial DNA Part B*, Vol. 4, No. 2, 3075–3076.

Chmelařová, A. (2010): Analýza polymorfních *cross-species* mikrosatelitů pro determinaci paternity u pelikána kadeřavého (*Pelecanus crispus*). Bakalářská práce. Depon in: Knižnica biologických oborov PřF UPOL v Olomouci.

Chmelařová, A. (2012): Charakteristika polymorfních *cross-species* mikrosatelitů u pelikána afrického (*Pelecanus rufescens*) a pelikána kadeřavého (*Pelecanus crispus*). Diplomová práce. Depon in: Knižnica biologických oborov PřF UPOL v Olomouci.

Chojnowski, J. L., Kimball, R. T., Braun, E. L. (2008): *Gene*, 410, 89.

Janušová, D. (2017): Charakteristika vybraných polymorfních *cross-species* mikrosatelitů z kladu Aequorlitorornithes u potápky roháče (*Podiceps cristatus*). Diplomová práce. Depon in: Knižnica biologických oborov PřF UPOL 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., Zhang, G. (2014): Whole-genome analyses resolve early branches in the tree of life of modern birds. *Science*, 346, 1320–1331.

Jenkin, P. M. (1957): The filter-feeding and food of flamingos (Phoenicopteriformes). *Biology Science*, 240, 401–493.

Kalinowski, S. T., Taper, M. L., Marshall, T. C. (2007): Revising how the computer program *cervus* accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. *Molecular Ecology*, 16, 1099–1106.

Kapil, R. (2005): Microsatellite-based genetic profiling for the management of wild and captive flamingo populations: Dizertačná práca. University of North Texas, Denton.

Kashi, Y., King, D., Soller, M. (1997): Simple sequence repeats as a source of quantitative genetic variation. *Trends in Genetics*, 13, 74–78.

Kashi, Y., King, D. G. (2006): Simple sequence repeats as advantageous mutators in evolution. *Trends in Genetics*, 22, 253–259.

Katti, M. V., Sami-Subbu, R., Ranjekar, P. K., Gupta, V. S. (2000): Amino acid repeat patterns in protein sequences: Their diversity and structural-functional implications. *Protein Science*, 9, 1203–1209.

Klaclová, M. (2018): *Cross-species* amplifikace mikrosatelitů z řádu tučňáci a konzervovaných ptačích mikrosatelitů u plameňáka růžového (*Phoenicopterus roseus*). Bakalářská práce. Depon in: Knížnica biologických oborov PřF UPOL v Olomouci.

Kopečná, K. (2018): *Cross-species* amplifikace mikrosatelitů z řádu trubkonosí u pelikána afrického (*Pelecanus rufescens*). Bakalářská práce. Depon in: Knížnica biologických oborov PřF UPOL v Olomouci.

Kůrová, V. (2017): *Cross-species* amplifikace mikrosatelitů z řádu trubkonosí u plameňáka růžového (*Phoenicopterus roseus*). Bakalářská práce. Depon in: Knížnica biologických oborov PřF UPOL v Olomouci.

Koshti, A. J., Bony, L. S. (2016): Ethology of greater flamingo in captivity. Ahmedabad, India.

Krienitz, L. (2018): Lesser Flamingos: Descendants of Phoenix. Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2018.

Küpper, C., Horburgh, G. J., Dawson, D. A., French-Constant, R., Szekely, T., 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., van Wyk, A. M., Kotzé, A., Grobler, P., Dalton, D. L. (2013): Isolation and characterization of species-specific microsatellite loci in African penguin (*Spheniscus demersus*). *Conservation Genetics Resources*, 5, 169–171.

Li, Y. C., Korol, A. B., Fahima, T., Beiles, A., Nevo, E. (2002): Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutational mechanisms: a review. *Molecular Ecology*, 11, 2453–2465.

Li, Y. C., Korol, A. B., Fahima, T., Nevo, E. (2004): Microsatellites within genes: structure, function, and evolution. *Molecular Biology and Evolution*, 21, 991–1007.

Lemmon, A. R., Emme, S. A., Lemmon, E. M. (2012): Anchored hybrid enrichment for massively high-throughput phylogenomics. *Systematic Biology*, 61, 727–744.

Manišová (2011): Analýza vybraných polymorfních *cross-species* mikrosatelitů pro determinaci paternity u plameňáka růžového (*Phoenicopterus roseus*). Bakalářská práce. Depon in: Knižnica biologických oborov PřF UPOL v Olomouci.

Málková (2013): Analýza a charakteristika polymorfních *cross-species* mikrosatelitů u plameňáka růžového (*Phoenicopterus roseus*). Diplomová práce. Depon in: Knižnica biologických oborov PřF UPOL v Olomouci.

Marshall, T. C., Slate, J., Kruuk, L. E. B., Pemberton, J. M. (1998): Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. *Molecular Ecology*, 7, 639–655.

Mayr, G. (2004): Morphological evidence for sister group relationship between flamingos (Aves: Phoenicopteridae) and grebes (Podicipedidae). *Zoological Journal of the Linnean Society*, 140, 157–169.

Meglec, E., Petenian, F., Danchin, E., Coeur d'Acier, A., Rasplus, J. Y., Faure, E. (2004): High similarity between flanking regions of different microsatellites detected within each of two species of lepidoptera: *Parnassius apollo* and *Euphydryas aurinia*. *Molecular Ecology*, 13, 1693–1700.

Mercer, D. M., Haig, S. M., Mullins, T. D. (2010): Isolation and characterization of eight novel microsatellite loci in the double-crested cormorant (*Phalacrocorax auritus*). *Conservation Genetics Resources*.

Mikulová, V. (2010): Mikrosatelitové lokusy pro determinaci paternity u vybraných druhů pelikánů (*Pelecanus* spp.). Diplomová práce. Depon in: Knížnica biologických oborov PřF UPOL v Olomouci.

Mindell, D. P., Brown, J. W. (2008): Neornithes: Modern birds. University of Arizona, Tucson.

Mitas, M. (1997): Trinucleotide repeats associated with human disease, 25, 2245–2254.

Moore, S. S., Sargeant, L. L., King, T. J., Mattick, J. S., Georges, M., Hetzel, D. J. (1991): The conservation of dinucleotide microsatellites among mammalian genomes allows the use of heterologous PCR primer pairs in closely related species. *Genomics*, 10, 654–660.

Morris-Pocock, J. A., Taylor, S. A., Sun, Z., Friesen, V. L. (2010): Isolation and characterization of fifteen polymorphic microsatellite loci for red-footed boobies (*Sula sula*). *Molecular Ecology Resources*.

Murray, V., Monchawin, C., England, P. R. (1993): The determination of the sequences present in the shadow bands of a dinucleotide repeat PCR. *Nucleic Acids Research*, 21, 2395–2398.

Nedvědová, M. (2015): *Cross-species* amplifikace mikrosatelitů z řádu trubkonosí u nesyta indomalajského (*Mycteria leucocephala*). Diplomová práce. Depon in: Knížnica biologických oborov PřF UPOL v Olomouci.

Nevo, E. (2001): Evolution of genome-phenome diversity under environmental stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 98, 6233–6240.

Olson, S., Feduccia, A. (1980): Relationships and evolution of flamingos (Aves, Phoenicopteridae).

Pechová, A. (2014): *Cross-species* amplifikace mikrosatelitů z řádu tučňáci a konzervovaných ptačích mikrosatelitů u nesyta indomalajského (*Mycteria*

leucocephala). Bakalářská práce. Depon in: Knížnice biologických oborů PŘF UPOL, Olomouc.

Pratt, R. C., Gibb, G. C., Morgan-Richards, M., Phillips, M. J., Hendy, M. D., Penny, D. (2008): Toward Resolving Deep Neoaves Phylogeny: Data, Signal Enhancement, and Priors. *Molecular Biology and Evolution*, 26, 313–326.

Preston, E. L. (2005): Isolation and Characterization of Polymorphic Loci from the Caribbean Flamingo (*Phoenicopterus ruber ruber*): New Tools for Wildlife Management: Dizertační práce. University of North Texas, Denton.

Primmer, C. R., Møller, A. P., Ellegren, H. (1995): Resolving genetic relationships with microsatellite markers: a parentage testing system for the swallow *Hirundo rustica*. *Molecular Ecology*, 4, 493–498.

Primmer, C. R., Saino, N., Møller, A. P., Ellegren, H. (1996): Directional evolution in germline microsatellite mutations. *Nature Genetics*. 13, 391–393.

Prum, R. O., Berv, J. S., Dornburg, A., Field, D. J., Townsend, J. P., Lemmon, E. M., Lemmon, A. R. (2015): A comprehensive phylogeny of birds (Aves) using targeted next-generation DNA sequencing. *Nature*, 526, 569–573.

Queller, D. C., Strassmann, J. E., Hughes, C. R. (1993): Microsatellites and kinship. *Trends in Ecology and Evolution*, 8, 285–288.

Ranochová, A. (2008): Analýza mikrosatelitových lokusů pro determinaci paternity u vybraných druhů pelikánů. Diplomová práce. Depon in: Knížnice biologických oborů PŘF UPOL v Olomouci.

Raymond, M., Rousset, F. (1995): GenePop (Ver. 1.2): Population genetics software for exact test and ecumenicism. *Journal of Heredity*. 86, 248–249.

Reddy, S., Kimball, R. T., Pandey, A., Hosner, P., Braun, M. J., Hackett, S. J., Han, K.-L., Harshman, J., Huddleston, C., Kingston, S., Marks, B. D., Miglia, K. J., Moore, W.

S., Sheldon, F. H., Witt, C. C., Yuri, T., Braun, E. L. (2017): Why do phylogenomic data sets yield conflicting trees? Data type influences the avian tree of life more than taxon sampling. *Systematic Biology*, 66, 857–879.

Richard, G. F., Kerrest, A., Dujon, B. (2008): Comparative genomics and molecular dynamics of DNA repeats in eukaryotes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 72, 686–727.

Roeder, A. D., Marshall, R. K., Mitchelson, A. J., Visagathilagar, T., Ritchie, P. A., Love, D. R., Pakal, T. J., McPartlan, H. C., Murray, N. D., Robinson, N. A., Kerry, K. R., 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.

Saeed, A. F., Wang, R., Wang, S. (2016): Microsatellites in pursuit of microbial genome evolution. *Microbiology*, 6, 1462.

Schlosser, J. A., Garner, T. W. J., Dubach, J. M., McElligott, A. G. (2003): Characterization of microsatellite loci in Humboldt penguin (*Spheniscus humboldti*) and cross-amplification in other penguin species. *Molecular Ecology Notes*, 3, 62–64.

Schlötterer, C., Tautz, D. (1992): Slippage synthesis of simple sequence DNA. *Nucleic Acids Research*. 20, 211–215.

Sibley, C. G., Ahlquist, J. E. (1990): *Phylogeny and classification of birds: A study in molecular evolution*. Yale University Press, New Haven.

Strejčková, B. (2016): *Cross-species amplifikace mikrosatelitů z řádu trubkonosí u plameňáka karibského (Phoenicopterus ruber)*. Bakalářská práce. Depon in: Knižnica biologických oborů PřF UPOL v Olomouci.

Šuláková, M. (2017): *Cross-species* amplifikace mikrosatelitů z řádu tučňáci a konzervovaných ptačích mikrosatelitů u pelikána skvrnozobého (*Pelecanus philippensis*). Bakalářská práce. Depon in: Knihovna biologických oborů PřF UPOL, Olomouc.

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. Depon in: Knihovna biologických oborů PřF UPOL, Olomouc.

Tautz, D. (1989): Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucleic Acids Research*, 17, 6463–6471.

Techow, N. M. S. M., O’Ryan, C. (2004): Characterization of microsatellite loci in White-chinned Petrel (*Procellaria aequinoctialis*) and cross-amplification in six other procellariiform species. *Molecular Ecology Notes*, 4, 33–35.

Thomas, G. H. (2015): An avian explosion. *Evolution*, 526, 516–517.

Torres, C. R., Ogawa, L. M., Gillingham, M. A. F., Ferrari, B., van Tuinen, M. (2014): A multi-locus inference of the evolutionary diversification of extant flamingos (Phoenicopteridae). *BMC Evolutionary Biology*, 14.

Toth, G., Gaspari, Z., Jurka, J. (2000): Microsatellites in different eukaryotic genomes: survey and analysis. *Genome Research*, 10, 967–981.

Townsend, J. P., Lopez-Giraldez, F. (2010): Optimal selection of gene and ingroup taxon sampling for resolving phylogenetic relationships. *Systematic Biology*, 59, 446–457.

Trivedi, S. (2004): Microsatellites (SSRs): Puzzles within puzzle. *Indian Journal of Biotechnology*, 3, 331–347.

van Tuinen, M., Butvill, D. B., Kirsch, J. A. W., Hedges, S. B. (2001): Convergence and divergence in the evolution of aquatic birds. *Proceedings of the Royal Society of London*, 268, 1345–1350.

van Tuinen, M. (2009): Birds (Aves). In: Hedges, S. B., Kumar, S.: *The timetree of life*. Oxford University Press, 409–411.

Verešová, D. (2018): *Cross-species* amplifikace mikrosatelitů z řádu trubkonosí u pelikána kadeřavého (*Pelecanus crispus*). Bakalářská práce. Depon in: Knižnica biologických oborů PřF UPOL v Olomouci.

Vieira, M. L., Santini, L., Diniz, A. L., Munhoz, C. F. (2016): Microsatellite markers: what they mean and why they are so useful. *Genetics and Molecular Biology*, 39, 12 – 328.

Walsh, P.S., Fildes, N.J., Reynolds, R. (1996): Sequence analysis and characterization of stutter products at the tetranucleotide repeat locus vWA. *Nucleic Acids Research*, 24, 2807–2812.

Zaccara, S., Crosa, G., Vanetti, I., Binelli, G., Childress, B., McCulloch, G., 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*, 82, 95–100.

Zhang, L., Yuan, D., Yu, S., Li, Z., Cao, Y., Miao, Z., Qian, H., Tang, K. (2004): Preference of simple sequence repeats in coding and non-coding regions of *Arabidopsis thaliana*. *Bioinformatics*, 20, 1081–1086.

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

Zlochová, A. (2019): Amplifikace vybraných polymorfních mikrosatelitů z řádu trubkonosí u plameňáka růžového (*Phoenicopterus roseus*). Diplomová práce. Depon in: Knižnica biologických oborov PřF UPOL v Olomouci.

Zweers, G. A., De Jong, F., Berkhoudt, H., Vandenberge, J. C. (1994): Filter-feeding in flamingos (*Phoenicopterus ruber ruber*). Condor 97, 297–324.

9 Prílohy

Príloha č. 1: Výstup výsledkov z programu Cervus 3.0.6 vykonaných pomocou 23 polymorfných mikrosatelitových lokusov testovaných na 22 jedincov plameniaka ružového. Pre každý lokus sú uvedené jednotlivé vlastnosti popísané anglickými skratkami predstavujúce: počet alel (k), počet testovaných jedincov (N), pozorovaná heterozygotnosť (HObs), očakávaná heterozygotnosť (HExp), obsah polymorfnej informácie (PIC), pravdepodobnosť chyby, pri priradení jedného z rodičov mláďatu v prípade, keď nie je známy ani jeden rodič (NE-1P), pravdepodobnosť chyby, pri priradení druhého rodiča mláďatu v prípade, kedy je už jeden rodič známy (NE-2P), pravdepodobnosť chyby, pri priradení celého rodičovského páru k mláďatu (NE-PP), pravdepodobnosť rovnakej alelovej konštitúcie pre všetky charakterizované lokusy u dvoch náhodne vybratých nepríbuzných jedincov (NE-I), pravdepodobnosť rovnakej alelovej konštitúcie pre všetky charakterizované lokusy u dvoch súrodencov (NE-SI), súlad s Hardy-Weinbergovou rovnováhou (HW) (NS - v súlade s HW rovnováhou, ND - testovanie nie je možné, * - signifikantná odchýlka na hladine 5 %), a pravdepodobná frekvencia výskytu nulových alel (F(Null)).

Locus	k	N	HObs	HExp	PIC	NE-1P	NE-2P	NE-PP	NE-I	NE-SI	HW	F(Null)
Ech011	2	22	0.409	0.502	0.370	0.880	0.815	0.722	0.380	0.600	NS	0.0907
Ech024	2	22	0.091	0.089	0.083	0.996	0.958	0.922	0.838	0.916	ND	-0.0141
Ech030	6	22	0.773	0.722	0.661	0.700	0.526	0.336	0.131	0.430	NS	-0.0433
Em2	2	22	0.136	0.130	0.119	0.992	0.941	0.892	0.770	0.879	ND	-0.0267
Em8	5	22	0.773	0.716	0.648	0.718	0.549	0.369	0.142	0.436	NS	-0.0626
Em23	6	22	0.773	0.743	0.685	0.678	0.500	0.312	0.116	0.416	NS	-0.0371
Emm5	5	22	1.000	0.632	0.541	0.798	0.660	0.502	0.223	0.497	*	-0.2547
Man27	6	22	0.409	0.678	0.625	0.739	0.560	0.364	0.152	0.457	NS	0.2330

Locus	k	N	HObs	HExp	PIC	NE-1P	NE-2P	NE-PP	NE-I	NE-SI	HW	F(Null)
Man47	2	22	0.045	0.333	0.272	0.947	0.864	0.781	0.508	0.714	ND	0.7509
Man55	2	22	0.273	0.241	0.208	0.972	0.896	0.824	0.612	0.785	ND	-0.0692
PNN08-I	2	22	0.500	0.502	0.370	0.880	0.815	0.722	0.380	0.600	NS	-0.0094
PNN08-II	5	22	0.455	0.667	0.598	0.766	0.601	0.425	0.175	0.468	NS	0.1706
Sh1Ca12	2	22	0.455	0.495	0.367	0.883	0.817	0.724	0.384	0.604	NS	0.0308
TG01-148	2	22	0.182	0.241	0.208	0.972	0.896	0.824	0.612	0.785	ND	0.1287
TG02-120	2	22	0.182	0.406	0.318	0.921	0.841	0.753	0.443	0.662	NS	0.3714
TG03-035	2	22	0.136	0.130	0.119	0.992	0.941	0.892	0.770	0.879	ND	-0.0267
TG04-041	2	22	0.318	0.274	0.232	0.964	0.884	0.808	0.572	0.759	ND	-0.0836
TG05-30	3	22	0.182	0.210	0.192	0.979	0.899	0.820	0.645	0.808	ND	0.1339
CAM-03	2	22	0.182	0.169	0.152	0.986	0.924	0.865	0.710	0.845	ND	-0.0405
CAM-07	3	22	0.591	0.515	0.428	0.873	0.757	0.627	0.322	0.579	NS	-0.0818
CAM-11	2	22	0.273	0.512	0.375	0.875	0.813	0.719	0.375	0.594	NS	0.2941
CAM-19	2	22	0.091	0.241	0.208	0.972	0.896	0.824	0.612	0.785	ND	0.4401
CAM-24	7	22	0.818	0.784	0.730	0.627	0.449	0.266	0.091	0.390	NS	-0.0331

Number of individuals: 22
Number of loci: 23
Mean number of alleles per locus: 3.217

Mean proportion of loci typed:	1.0000
Mean expected heterozygosity:	0.4318
Mean polymorphic information content (PIC):	0.3699
Combined non-exclusion probability (first parent):	0.03687654
Combined non-exclusion probability (second parent):	0.00156463
Combined non-exclusion probability (parent pair):	0.00001874
Combined non-exclusion probability (identity):	5.207E-0011
Combined non-exclusion probability (sib identity):	0.00002023

Príloha č. 2: Výstup výsledkov z programu Cervus 3.0.6 vykonaných pomocou 11 polymorfných mikrosatelitových lokusov testovaných na 41 jedincov pelikána kučeravého. Pre každý lokus sú uvedené jednotlivé vlastnosti popísané anglickými skratkami predstavujúce: počet alel (k), počet testovaných jedincov (N), pozorovaná heterozygotnosť (HObs), očakávaná heterozygotnosť (HExp), obsah polymorfnej informácie (PIC), pravdepodobnosť chyby, pri priradení jedného z rodičov mláďatu v prípade, keď nie je známy ani jeden rodič (NE-1P), pravdepodobnosť chyby, pri priradení druhého rodiča mláďatu v prípade, kedy je už jeden rodič známy (NE-2P), pravdepodobnosť chyby, pri priradení celého rodičovského páru k mláďatu (NE-PP), pravdepodobnosť rovnakej alelovej konštitúcie pre všetky charakterizované lokusy u dvoch náhodne vybratých nepříbuzných jedincov (NE-I), pravdepodobnosť rovnakej alelovej konštitúcie pre všetky charakterizované lokusy u dvoch súrodencov (NE-SI), súlad s Hardy-Weinbergovou rovnováhou (HW) (NS - v súlade s HW rovnováhou, ND - testovanie nie je možné, *** - signifikantná odchýlka na hladine 0,1 %) a pravdepodobná frekvencia výskytu nulových alel (F(Null)).

Locus	k	N	HObs	HExp	PIC	NE-1P	NE-2P	NE-PP	NE-I	NE-SI	HW	F(Null)
Bb21	2	41	0.512	0.409	0.322	0.919	0.839	0.751	0.437	0.657	NS	-0.1185
BFAL4	2	41	0.000	0.491	0.368	0.882	0.816	0.723	0.383	0.603	***	0.9993
BFAL14	2	41	0.537	0.499	0.371	0.879	0.814	0.721	0.379	0.598	NS	-0.0428
Cd1	2	41	0.415	0.463	0.353	0.895	0.824	0.732	0.399	0.621	NS	0.0488
Dc31	2	41	0.585	0.455	0.349	0.899	0.826	0.735	0.404	0.626	NS	-0.1310
LAAL7	2	41	0.488	0.397	0.316	0.923	0.842	0.755	0.446	0.665	NS	-0.1081
Ole03	2	41	0.195	0.178	0.161	0.984	0.920	0.859	0.694	0.836	ND	-0.0446
Omn6	3	41	0.561	0.596	0.507	0.827	0.698	0.555	0.251	0.518	NS	0.0328
Ole25	3	41	0.366	0.571	0.497	0.841	0.702	0.554	0.257	0.532	NS	0.2136
Paequ2	2	41	0.561	0.495	0.370	0.880	0.815	0.722	0.381	0.600	NS	-0.0683
Calex-01	3	41	0.390	0.330	0.291	0.947	0.843	0.737	0.489	0.709	NS	-0.1025

Number of individuals:	41
Number of loci:	11
Mean number of alleles per locus:	2.273
Mean proportion of loci typed:	1.0000
Mean expected heterozygosity:	0.4441
Mean polymorphic information content (PIC):	0.3548
Combined non-exclusion probability (first parent):	0.30176215
Combined non-exclusion probability (second parent):	0.09890507
Combined non-exclusion probability (parent pair):	0.02234549
Combined non-exclusion probability (identity):	0.00003800
Combined non-exclusion probability (sib identity):	0.00602697