

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



**Amplifikace vybraných polymorfních
mikrosatelitů z řádu trubkonosí u plameňáka
růžového (*Phoenicopterus roseus*)**

Diplomová práce

Bc. Alžběta Zlochová

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma: prezenční

Olomouc 2019

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

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala po dobu magisterského studia samostatně pod vedením RNDr. Petra Nádvorníka, Ph.D. a použila uvedené literární zdroje.

V Olomouci dne 6. 5. 2019

.....

Souhrn

Tato diplomová práce se zabývá *cross-species* PCR amplifikací polymorfních mikrosatelitových lokusů z řádu trubkonosí (Procellariiformes) a několika lokusů z řádu dlouhokřídlí (Charadriiformes) a jejich následnou charakterizací u plameňáka růžového (*Phoenicopterus roseus*).

Teoretická část této práce je zaměřena na charakteristiku řádu plameňáci (Phoenicopteriformes), konkrétně pak plameňáka růžového, a dále se zabývá problematikou zařazení řádu plameňáci do systému. Další část je věnována základní charakterizaci mikrosatelitů, jejich výskytu a klasifikaci. V poslední části jsou popsány polymorfní *de novo* i *cross-species* mikrosatelity u plameňáka růžového a také polymorfní mikrosatelity z řádu trubkonosí.

Experimentální část byla zaměřena na *cross-species* PCR amplifikaci 48 mikrosatelitových lokusů, které byly určeny jako polymorfní u 6 nepříbuzných jedinců plameňáka růžového (Kůrová, 2017). Amplifikace byla provedena na genomické DNA 22 nepříbuzných jedinců plameňáka růžového a polymorfní lokusy byly genotypizovány a charakterizovány. Ze 48 mikrosatelitů bylo původně navrženo 46 pro 16 druhů z řádu trubkonosí a zbylé 2 mikrosatelity pro 2 druhy z řádu dlouhokřídlí. Bylo nalezeno 40 párů primerů, které amplifikovaly 41 polymorfních oblastí (pár primerů pro lokus Pc D3 poskytl 2 polymorfní oblasti). Dále bylo retestováno 16 párů primerů pro mikrosatelity z řádu trubkonosí, které byly polymorfní u 30 nepříbuzných jedinců plameňáka karibského (*Phoenicopterus ruber*) (Strejčková, 2018). Tyto páry primerů sice u plameňáka růžového amplifikovaly monomorfní produkt (Kůrová, 2017), ale kvůli blízké příbuznosti těchto druhů je zde možnost jejich chybného vyloučení z analýzy. Z těchto 16 párů primerů nakonec amplifikovaly polymorfní produkt 3.

Celkem 44 nalezených polymorfních lokusů bylo analyzováno na vazbu programem Genepop 4.1, který prokázal, že lokusy RBG29 a Parm01 jsou shodné. Výsledně bylo nalezeno 42 párů primerů, které amplifikují 43 nezávislých polymorfních oblastí. Těchto 43 nezávislých lokusů bylo statisticky charakterizováno programem Cervus 3.0.6. Nakonec byly porovnány všechny dosud nalezené polymorfní mikrosatelity u plameňáka růžového a byla zjištěna vazba lokusu BFAL4 s lokusy Sn2A-36 a Eru03, které jsou vázané na pohlaví (leží na chromozomu Z), proto i lokus BFAL4 pravděpodobně leží na tomto chromozomu.

Summary

This master thesis deal with the cross-species PCR amplification of polymorphic microsatellite loci from the order Procellariiformes and several microsatellites loci from the order Charadriiformes and their subsequent characterisation within the species *Phoenicopterus roseus*.

Theoretical part of this thesis focused on the description of the order Phoenicopteriformes, specifically the species *Phoenicopterus roseus*. Furthermore, biological classification of the order Phoenicopteriformes is laid down. Additionally, microsatellites, their occurrence and classification were another topic of the theoretical part. My thesis also described polymorphic *de novo* and cross-species microsatellites of *Phoenicopterus roseus* and also polymorphic microsatellites of the order Procellariiformes.

Experimental part covered cross-species PCR amplification of 48 microsatellite loci, which were identified as polymorphic in 6 unrelated individuals of the *Phoenicopterus roseus* (Kůrová, 2017). Polymorphic loci were genotyped and characterised in the DNA isolated from 22 unrelated individuals of *Phoenicopterus roseus*. Out of 48 microsatellites, 46 were originally proposed to be a part of the 16 species from the order Procellariiformes and 2 were originally proposed to be a part of the 2 species from the order Charadriiformes. In total, 40 primer pairs were found that were used to amplify 41 polymorphic regions (one pair of primers intended for the locus Pc D3 amplified 2 polymorphic regions). Moreover 16 primer pairs for microsatellites from the order Procellariiformes were tested. These were polymorphic in 30 unrelated individuals of *Phoenicopterus ruber* (Strejčková, 2018). Although these primer pairs amplified a monomorphic product in DNA isolated from *Phoenicopterus roseus*, this could be due to the fact that these two species are closely phylogenetically related. Out of these 16 primer pairs, 3 amplified a polymorphic product.

In total, 44 of identified polymorphic loci were analysed for linkage using the software Genepop 4.1. The results of this analysis proved that the loci RBG29 and Parm01 were identical. To sum up, 42 primer pairs were found, which were used to amplify 43 independent polymorphic regions and these were statistically evaluated using the software Cervus 3.0.6. Also was discovered that locus BFAL4 was in linkage to the loci Sn2A-36 and loci Eru03, which lie on the sex chromosome Z.

Ráda bych poděkovala RNDr. Petru Nádvorníkovi, Ph.D. za jeho ochotu věnovat mi čas při konzultacích výsledků provedených v rámci experimentální části i během vypracování celé této diplomové práce. Také děkuji za jeho přátelský přístup, cenné rady a za velkou trpělivost.

Obsah

1	Úvod	1
2	Cíle práce.....	2
3	Literární přehled	3
3.1	Plameňáci	3
3.1.1	Zařazení řádu plameňáci do systému	5
3.1.2	Plameňák růžový	7
3.2	Mikrosatelity	8
3.2.1	Klasifikace mikrosatelitů.....	9
3.2.2	Původ a mutace mikrosatelitů	10
3.2.3	Polymorfní mikrosatelity u plameňáka růžového	10
3.2.4	Vybrané polymorfní mikrosatelity z řádu trubkonosí	16
4	Materiál a metody.....	18
4.1	Biologický materiál.....	18
4.2	Chemikálie	18
4.3	Roztoky	19
4.4	Laboratorní přístroje a pomůcky.....	20
4.5	Analyzované mikrosatelitové lokusy	21
4.6	PCR amplifikace	25
4.7	Elektroforetická separace PCR produktů	26
4.8	Statistické hodnocení výsledných PCR produktů	28
5	Výsledky.....	29
6	Diskuse	42
7	Závěr.....	58
8	Literatura	59
9	Přílohy	69

Seznam obrázků

- Obrázek 1:** Výřez kladogramu dle Prum et al. (2015) zobrazující klad Aequorlornithes. 6
- Obrázek 2:** Výřez kladogramu Neoaves podle Reddy et al. (2017). Zeleným pruhem (vpravo) jsou znázorněny řády, které spadají do kladu Aequorlornithes dle řazení Prum et al. (2015). 7
- Obrázek 3:** Elektroforetogram mikrosatelitového lokusu Omn8 polymorfního u 22 nepříbuzných jedinců plameňáka růžového. Bylo detekováno 8 alel, T_a byla 60 °C, délka elektroforetické separace byla 90 min. V každé dráze se vyskytuje DNA jiného jedince. 41
- Obrázek 4:** Elektroforetogram mikrosatelitového lokusu LAAL10 polymorfního u 22 nepříbuzných jedinců plameňáka růžového. Bylo detekováno 7 alel, T_a byla 62 °C a délka elektroforetické separace byla 90 min. V každé dráze se vyskytuje DNA jiného jedince. 41

Seznam grafů

- Graf 1:** Rozdělení 43 mikrosatelitů polymorfních u 22 nepříbuzných jedinců plameňáka růžového podle zdrojové čeledi (modrá albatrosovití, červená buňňáčkovití, zelená buňňákovití) a druhu (jednotlivé odstíny daných barev), od kterých byly mikrosatelity odvozeny. Žluté dílky přesahující okraje grafu znázorňují mikrosatelity odvozené od zástupců z řádu dlouhokřídlí, ostatní barvy znázorňují mikrosatelity odvozené z řádu trubkonosí. V závorkách jsou uvedeny počty polymorfních lokusů od daného zdrojového druhu. 38
- Graf 2:** Rozdělení podle počtu alel 43 nezávislých polymorfních lokusů, které byly amplifikovány pomocí 42 párů primerů odvozených od zástupců z řádů trubkonosí a dlouhokřídlí a byly polymorfní u 22 nepříbuzných jedinců plameňáka růžového. V závorce je uveden počet mikrosatelitů, které měly daný počet alel. 40
- Graf 3:** Rozdělení 151 nezávislých polymorfních mikrosatelitových lokusů testovaných u plameňáka růžového pomocí cross-species PCR amplifikace. Jedná se o mikrosatelity od zástupců příbuzných řádů z kladu Aequorlornithes a univerzální ptačí mikrosatelity. V závorkách jsou uvedeny počty nalezených polymorfních lokusů od daného řádu. 56

Seznam tabulek

Tabulka 1: Přehled 781 testovaných mikrosatelitových lokusů u plameňáka růžového (<i>Phoenicopterus roseus</i>) analyzovaných v Laboratoři populační genetiky na Katedře buněčné biologie a genetiky PřF UPOL.	15
Tabulka 2: Přehled 46 cross-species mikrosatelitů (polymorfních dle Kůrové (2017)) z řádu trubkonosí, amplifikovaných u 22 nepříbuzných jedinců plameňáka růžového..	22
Tabulka 3: Přehled 16 cross-species mikrosatelitů, odvozených z řádu trubkonosí, které byly retestovány u 22 nepříbuzných jedinců plameňáka růžového dle výsledků Strejčkové (2018).....	24
Tabulka 4: Složení PCR reakční směsi pro 22 vzorků.....	25
Tabulka 5: Charakteristika 44 polymorfních mikrosatelitových lokusů amplifikovaných pomocí 43 párů primerů u 22 nepříbuzných jedinců plameňáka růžového. V tabulce jsou uvedeny názvy lokusů společně s kódem uvedeným v databázi GenBank (Accession no.), dále sekvence primerů, jednotky repetice, zdrojový druh daného mikrosatelitového lokusu, teplota annealingu (T_a), délka elektroforetické separace (ELFO), počet nalezených alel, signifikance odchylky od Hardy-Weinbergovy rovnováhy (HW) (NS - není signifikantní, ND - netestováno, ** - odchylka se signifikancí 1 %) a pravděpodobnost výskytu nulových alel.....	32
Tabulka 6: Přehled polymorfních mikrosatelitů izolovaných od zástupců z řádu trubkonosí, které pomocí cross-species PCR amplifikace byly polymorfní u 22 nepříbuzných jedinců plameňáka růžového (PIR) (tato práce) a současně u 30 nepříbuzných jedinců plameňáka karibského (PIK) (Strejčková, 2018), 13 nepříbuzných jedinců potápky roháče (PoR) (Janušová, 2017), 6 nepříbuzných jedinců nesyta indomalajského (NeI) (Nedvědová, 2015), 6 nepříbuzných jedinců pelikána afrického (PeA) (Kopečná, 2018) nebo 6 nepříbuzných jedinců pelikána kadeřavého (PeK) (Verešová, 2018). V tabulce jsou uvedeny počty nalezených alel (A) u jednotlivých lokusů amplifikovaných u konkrétního druhu, popř. je lokus monomorfní (M).	52

1 Úvod

Mikrosatelity jsou charakterizovány jako krátké tandemové repetice, jejichž jednotka repetice se opakuje bezprostředně za sebou. Obvykle je délka repetice do 10 bp a délka celého mikrosatelitu by neměla přesáhnout 1 kb. Mikrosatelity v prokaryotním i eukaryotním genomu většinou neleží v kódujících oblastech, ale v některých případech se mohou vyskytovat v těchto oblastech a mutace v rámci mikrosatelitu mohou mít fatální následky jako změnu funkce proteinu nebo dokonce vznik onemocnění.

V molekulární biologii jsou mikrosatelity využívány jako molekulární markery, které jsou studovány pomocí PCR amplifikace. Jako markery jsou snadno reprodukovatelné a také je možné je využít *cross-species*. Často se využívají pro paternitní studie a studium variability populací, kde právě *cross-species* využití je vhodné, jelikož se nemusí navrhovat nové páry primerů pro studovaný druh.

U plameňáka růžového (*Phoenicopterus roseus*) bylo dosud v Laboratoři populační genetiky na Katedře buněčné biologie a genetiky PřF UP v Olomouci testováno 781 pár primerů pro mikrosatelitové lokusy odvozené od zástupců 9 řádů z kladu Aequorlitorניתhes, několik párů primerů pro mikrosatelity od vrubozobých a také páry primerů pro univerzální ptačí mikrosatelity. Dosud bylo v Laboratoři populační genetiky PřF UPOl nalezeno 156 polymorfních mikrosatelitů, z nichž bylo doposud 82 plně charakterizováno u 22 nepříbuzných jedinců plameňáka růžového (45 *de novo* mikrosatelitů a 39 *cross-species* mikrosatelitů z řádu brodiví, dlouhokřídlí a veslonozí) a 72 polymorfních mikrosatelitů (odvozených z řádu trubkonosí (46), dlouhokřídlí (2), tučňáci (13) a univerzální ptačí mikrosatelity (11)) bylo ve 2 pracích označeno jako polymorfní u 6 nepříbuzných jedinců plameňáka růžového. V rámci této práce se budu zabývat charakterizací 46 mikrosatelitů z řádu trubkonosí a 2 mikrosatelitů z řádu dlouhokřídlí u 22 nepříbuzných jedinců plameňáka růžového, které Kůrová (2017) označila jako polymorfní.

2 Cíle práce

1. Vypracování rešerše na téma diplomové práce.
2. Shromáždění dostupných literárních zdrojů.
3. PCR amplifikace DNA 22 nepříbuzných jedinců plameňáka růžového s využitím *cross-species* primerů pro vybrané polymorfní mikrosatelity z řádu trubkonosí, které byly popsány v bakalářské práci Kůrová (2017).

3 Literární přehled

3.1 Plameňáci

Plameňáci (Phoenicopteriformes) jsou řád zahrnující vodní ptáky nezaměnitelného vzhledu s charakteristicky růžovou až karmínovou barvou peří. Plameňáci jsou vysocí od 80 do 165 cm (dle druhu), tělo je oválné, nohy i krk jsou v poměru s tělem dlouhé a typický v polovině dolů zahnutý zobák je v porovnání s hlavou velký (Cramp *et* Simmons, 1977; del Hoyo *et al.*, 1992).

Vyskytují se v okolí mělkých a extrémně slaných či alkalických vod (jezera, laguny a zátoky), které mohou dosahovat až dvojnásobku slanosti moře (del Hoyo *et al.*, 1992). Málokdy jsou k vidění na březích sladkých vod, jelikož nejsou pro jejich přežití vhodné (Howard *et* Moore, 1994). Drsné podmínky slaných vod a leckdy i extrémních teplot jsou neslučitelné se životem většiny obratlovců, ale pro plameňáky jsou tato stanoviště ideální. Nejen že se zde nevyskytují druhy, které by byly potravní konkurencí, ale také je zde minimální predace (del Hoyo *et al.*, 1992; Winkler *et al.*, 2015). Plameňáci jsou velmi společenský řád ptáků a téměř vždy se nacházejí v koloniích o 100 a více jedincích, málokdy jsou v koloniích čítajících tisíce jedinců. Osamocení jedinci jsou většinou nemocní nebo umírající (Howard *et* Moore, 1994).

Plameňáci přijímají potravu typickým filtračním způsobem, a právě k tomuto účelu mají přizpůsobený zobák. Okraje a vnitřní části obou čelistí jsou pokryty rohovitými lamelami s chloupkům se podobajícími útvary na svém povrchu, které mají schopnost se napřímit nebo ohnout zpět k lamele. Právě toho je využíváno během filtrace potravy (del Hoyo *et al.*, 1992). Během krmení mají hlavu u dna a přecházejí z místa na místo (Howard *et* Moore, 1994). Do zobáku průběžně nasávají a poté z něj vypouštějí vodu společně s bahnem a drobnými organismy. Během nasátí se struktury na lamelách ohnou k lamele a při vypuštění vody se opět napřímí. Tím se vytvoří filtr a v zobáku zůstane jen potrava. Nasátí a následné vypuštění vody ze zobáku provede plameňák asi 5x za sekundu a celý proces je prováděn jazykem, který se pohybuje dopředu a dozadu, a funguje tedy jako píst (del Hoyo *et al.*, 1992; Howard *et* Moore, 1994; Winkler *et al.*, 1994). Potravou plameňáků jsou malí vodní bezobratlí živočichové (korýši, měkkýši a hmyz), dále semena rostlin a ojediněle i malé ryby. Právě díky této potravě, která je

bohatá na karotenoidní pigmenty, mají plameňáci svou charakteristickou barvu, která u nich hraje velkou roli ve výběru partnera (del Hoyo *et al.*, 1992; Winkler *et al.*, 2015).

Plameňáci jsou monogamní ptáci a hnízdí v extrémně velkých skupinách. Na jeden metr čtvereční připadá někdy až 5 hnízd. Na stavbě hnízda se podílejí oba rodiče a pro stavbu používají bláto, kamení a zbytky rostlin. Tvar hnízda je úzký komolý kužel. Samice snáší obvykle 1 vejce, o které se starají oba rodiče. Inkubace trvá 27–31 dní (del Hoyo *et al.*, 1992; Winkler *et al.*, 2015).

V uspořádání v rámci řádu plameňáci se většina autorů shoduje na tom, že zde patří pouze jedna čeleď, konkrétně plameňákovití (Phoenicopteridae) (Cramp *et Simmons*, 1977; del Hoyo *et al.*, 1992; Šťastný *et al.*, 1998; Veselovský, 2001). Co se týká počtu rodů a druhů a jejich vzájemného uspořádání, tak zde mají různí autoři rozdílný názor. Del Hoyo *et al.* (1992) i Winkler *et al.* (2015) rozdělují tento řád do 3 rodů: *Phoenicopterus*, *Phoeniconaias* a *Phoenicoparrus*. Do rodu *Phoenicopterus* řadí dva druhy - plameňáka růžového (*P. ruber*) a plameňáka chilského (*P. chilensis*). Dále uvádějí, že plameňák růžový (*P. ruber*) má dva poddruhy (či rasy, jak uvádějí del Hoyo *et al.* (1992)), plameňáka růžového (*P. ruber roseus*) a plameňáka karibského (*P. ruber ruber*). Do rodu *Phoeniconaias* řadí plameňáka malého (*P. minor*), a do rodu *Phoenicoparrus* řadí plameňáka andského (*P. andinus*) a plameňáka Jamesova (*P. jamesi*). Celkem tedy rozdělují plameňáky na 5 druhů, z nichž 1 dále dělí na 2 poddruhy. Torres *et al.* (2014) publikovali nový systém zařazení druhů plameňáků v rámci řádu plameňáci. Provedli studii založenou na sekvencích DNA s užitím mitochondriálních markerů a jaderných markerů. Na rozdíl od předešlých předpokladů určili, že v řádu plameňáci se nacházejí pouze 2 rody, a to *Phoenicopterus* a *Phoenicoparrus*. Do rodu *Phoenicopterus* řadí plameňáka chilského a k němu sesterský klad se dvěma druhy – plameňákem růžovým (*P. roseus*) a plameňákem karibským (*P. ruber*). Do rodu *Phoenicoparrus* řadí zbylé 3 druhy plameňáků – plameňáka malého, plameňáka andského a plameňáka Jamesova. Torres *et al.* (2014) rozdělili plameňáky do 6 druhů, jelikož berou plameňáka růžového a plameňáka karibského jako 2 samostatné druhy (ne jako poddruhy plameňáka růžového (*P. ruber*) dle del Hoyo *et al.* (1992)). Stejně tak i já beru tyto dva plameňáky v této diplomové práci za 2 samostatné druhy.

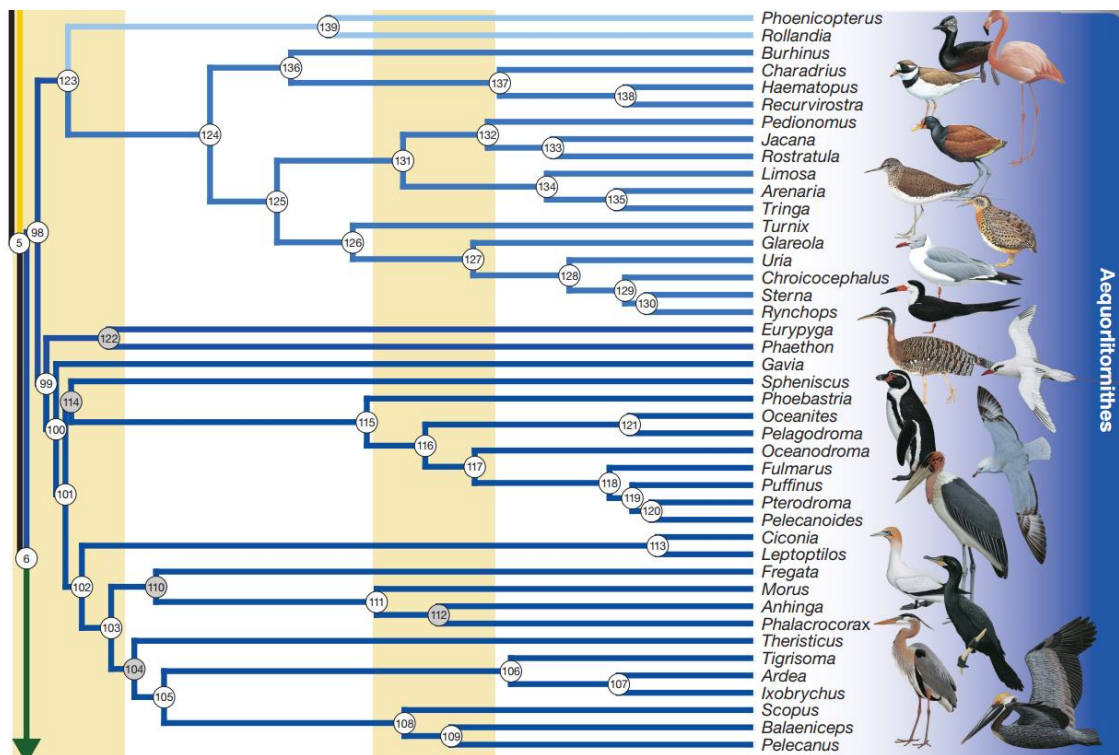
3.1.1 Zařazení řádu plameňáci do systému

Del Hoyo *et al.* (1992) uvádějí, že podle anatomických podobností pánve a žeber, a také na základě proteinů ve vaječném bílku, byli plameňáci zařazeni jako podřád brodivých (Ciconiiformes). Dále také uvádějí, že se vyskytují další aspekty, jako péče o mláďata, hlas, plovací blány na nohou a peří přizpůsobené k pobytu ve vodě, které plameňáky více spojuje s vrubozobými (Anseriformes). Na základě toho del Hoyo *et al.* (1992) předpověděli vytvoření samostatného řádu plameňáci (Phoenicopteriformes), který by měl být umístěn mezi brodivými a vrubozobými.

Van Tuinen *et al.* (2001) ve svém článku o konvergenci a divergenci evoluce vodních ptáků zkoumali fylogenetické umístění především plameňáků, kladivouše a člunozobce. Provedli analýzu sekvencí jaderné a mitochondriální DNA a následně DNA-DNA hybridizaci. Na základě vyhodnocení 4 mitochondriálních a 2 jaderných genů poprvé určili jako sesterský klad plameňáků potápky.

Tuto příbuznost také potvrdili Hackett *et al.* (2008) ve své fylogenomické studii ptáků a jejich evoluční historie. Sesbírali DNA sekvence pocházející od 171 druhů, z nichž 2 druhy byly použity jako outgroup (krokodýli) a zbylých 169 druhů pocházelo ze všech hlavních kladů pěvců a také z jiných ptačích řádů. Sekvence dlouhé ~32 kb reprezentovaly 19 jaderných lokusů, které byly lokalizovány na 15 různých chromozomech u kura domácího, a obsahovaly 74 % intronů, 23 % exonů a 3 % UTRs (untranslated regions). Hackett *et al.* (2008) dále uvádějí, že moderní ptáci obsazují různé niky, a proto navrhují strukturovat ptáky na vodní, pobřežní a pevninské. I přesto řadí plameňáky, na rozdíl od Van Tuinen *et al.* (2001), mimo klad vodních ptáků, jelikož adaptace na vodní prostředí dle něj vznikla u ptáků několikrát. Stejně tak Jarvis *et al.* (2014), kteří provedli celogenomovou analýzu 48 ptačích druhů zastupujících všechny řády Neoaves, řadí plameňáky a potápky jako sesterské klady a také je nezařazují do vodních ptáků. Podle výsledků jejich analýzy rozdělili klad Neoaves na dva monofyletické sesterské klady – Passerea a Columbea, kde klad Columbea rozdělili na pevninské ptáky (Columbimorphae) a vodní ptáky (Phoenicopterimorphae), kam právě zařadili pouze plameňáky a potápky. Pro vodní ptáky jako jsou pelikáni, volavky, ibisi, kormoráni, buňáci, tučňáci a potáplice vytvořili samostatný klad v Passerea, který označili jako Aequornithia (Jarvis *et al.*, 2014).

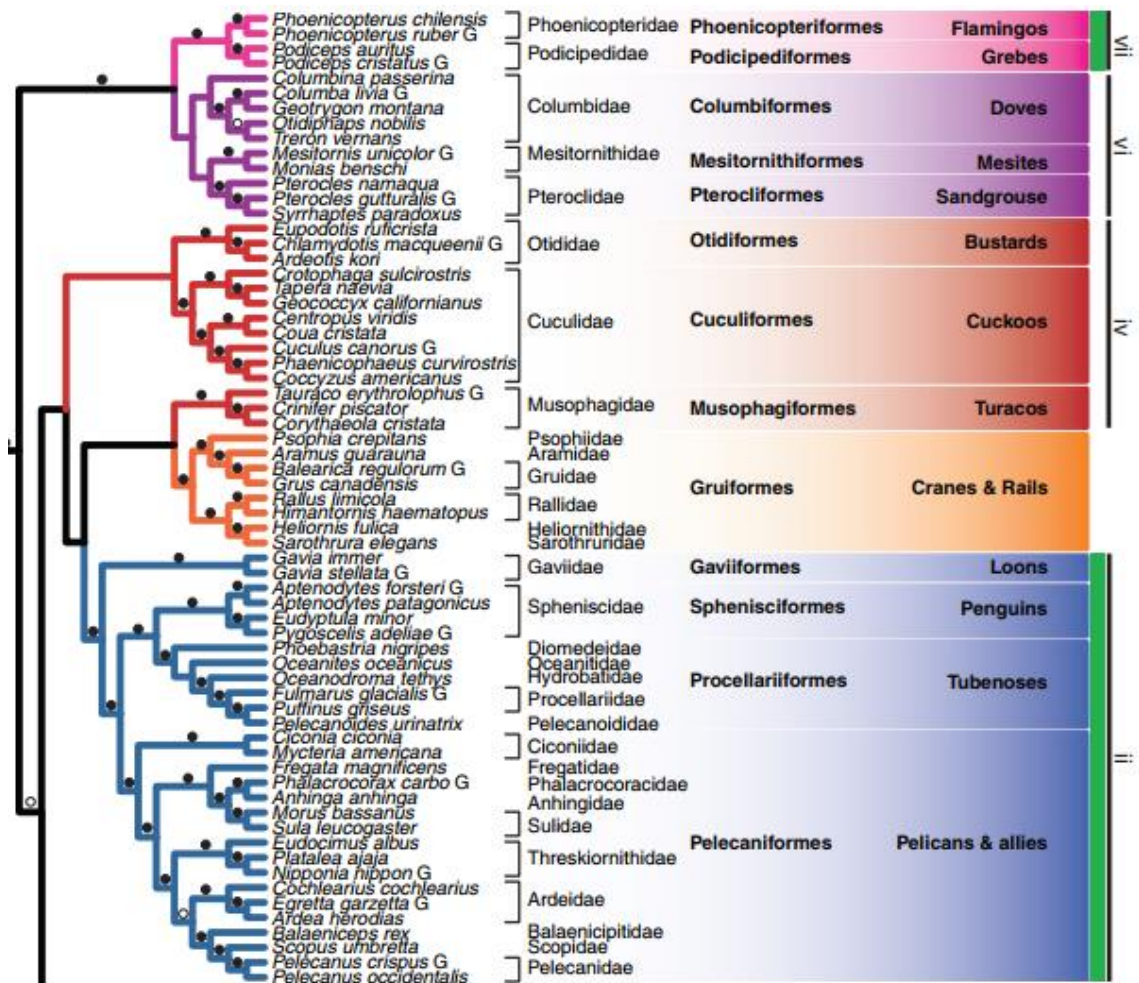
Prum *et al.* (2015) pro tvorbu fylogenetického stromu ptáků použili sekvenování nové generace. Zaměřili se na 394 lokusů nacházejících se v konzervovaných oblastech genomu pocházejících od 198 druhů ptáků ze 122 čeledí ze 40 v současnosti existujících ptačích řádů (14 čeledí pěvců a 108 ostatních ptačích čeledí). Pro klad Neoaves bylo sestaveno 5 hlavních sesterských kladů – Strisores, Columbaves, Gruiformes, Aequorlornithes a Inopinaves. Jimi nově vytvořený klad Aequorlornithes zahrnuje všechny vodní ptáky s výjimkou vrubozobých (Anseriformes), kteří s nimi nejsou příbuzní. Plameňáci jsou v rámci kladu Aequorlornithes řazeni jako sesterský klad potápek (stejně jako ve studiích Hackett *et al.* (2008); Jarvis *et al.* (2014); Van Tuinen *et al.* (2001)) a společně jsou sesterským kladem k dlouhokřídlým (viz obrázek 1).



Obrázek 1: Výřez kladogramu dle Prum *et al.* (2015) zobrazující klad Aequorlornithes.

Další publikací, která se zabývá fylogenomickým zařazením v rámci kladu Neoaves, je Reddy *et al.* (2017). Ve své studii autoři použili data celkem 54 lokusů pocházejících od 258 jedinců z 235 druhů všech řádů ptáků, které byly kombinací nově získaných sekvencí a sekvencí již popsaných v předešlých studiích (Hackett *et al.*, 2008; Braun *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2012; Kimball *et al.*, 2013; Smith *et al.*, 2013). Získaná data následně porovnali s daty od Jarvis *et al.* (2014) a Prum *et al.* (2015). Na základě vyhodnocení dat Reddy *et al.* (2017) řadí plameňáky, společně s potápkami, jako

sesterský klad k měkkozobým (Columbiformes), mesitovitým (Mesitornithiformes) a stepokurovitým (Pterocliiformes) (viz obrázek 2).



Obrázek 2: Výřez kladogramu Neaves podle Reddy *et al.* (2017). Zeleným pruhem (vpravo) jsou znázorněny řády, které spadají do kladu Aequirornithes dle řazení Prum *et al.* (2015).

3.1.2 Plameňák růžový

Plameňák růžový je spolu s plameňákem karibským největším žijícím plameňákem na Zemi (del Hoyo *et al.*, 1992). Tyto dva druhy plameňáků mají hodně společných znaků, např. výšku 120–145 cm, hmotnost do 4,1 kg a rozpětí křídel, které dosahuje u největších jedinců až 165 cm (del Hoyo *et al.*, 1992; Svensson *et al.*, 2009). Nápadným a lehce pozorovatelným rozdílem těchto dvou druhů je barva. Plameňák růžový, na rozdíl od karmínově zbarveného plameňáka karibského, má bílé peří s růžovým nádechem a za letu jsou dominující červené křídlní krovky s černými letkami (Gosler, 1994). Dále se liší i barvou nohou, které má plameňák růžový celé růžové, na

rozdíl od plameňáka karibského, který má nohy béžovošedé s růžovým kolenním kloubem (Svensson *et al.*, 2009).

Posledním rozdílem plameňáka růžového a karibského je jejich výskyt. Zatímco plameňák karibský, jak jeho název napovídá, se vyskytuje ve Střední Americe, plameňák růžový se vyskytuje především v Evropě (Šťastný *et al.*, 1998; Svensson *et al.* 2009). Tento evropský druh plameňáka má velmi široký areál výskytu. Je různě rozšířený po jižní Evropě (Španělsko, Francie, Itálie a Řecko), dále od severní po západní Afriku, také od východní Afriky až po Jihoafrickou republiku, v Saudské Arábii, a nakonec přes Írák, Pákistán a Indii až po Srí Lanku (Del Hoyo *et al.*, 1992; Anonymous, 2019).

Níže uvádím taxonomické zařazení plameňáka růžového do systému dle Myers *et al.* (2019):

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

3.2 Mikrosatelity

Mikrosatelity, jinak také označované jako SSRs (simple sequence repeats), STRs (short tandem repeats) nebo SSLPs (simple sequence length polymorphisms), jsou krátké tandemově se opakující sekvenční motivy DNA dlouhé 1–10 bp (Tóth *et al.*, 2000; Zima *et al.*, 2004; Abdurakhmonov, 2016; Vieira *et al.*, 2016). Celý soubor repetit je homogenní a je dlouhý do 1 kb (Abdurakhmonov, 2016). Mikrosatelity se vyskytují v kódujících i nekódujících oblastech genomu prokaryotických i eukaryotických organismů (Tóth *et al.*, 2000; Zima *et al.*, 2004). Mikrosatelity jsou většinou autory označovány jako nefunkční úseky DNA bez biologické funkce, ale je zjištěno několik mutací v mikrosatelitových repetitích, které mění funkci proteinů a mohou vést až ke vzniku neurodegenerativních onemocnění u lidí (Schlötterer, 2000; Oliveira *et al.*, 2006;

Abdurakhmonov, 2016). Nejznámějším onemocněním zapříčiněným mutací mikrosatelitů je Huntingtonova choroba, která je způsobena několikanásobným opakováním trinukleotidové repetice CAG (Oliveira *et al.*, 2006; Vieira *et al.*, 2016). Kromě negativních účinků mají také mikrosatelity v kódující a regulující oblasti i přínosné účinky, jako třeba adaptaci organismu na měnící se a potenciálně nebezpečné prostředí (Abdurakhmonov, 2016).

I když je v dnešní době velký nástup nových technik založených na SNP (single nucleotide polymorfism) markerech, jako NGS (next generation sequencing), mikrosatelity byly a stále jsou využívány jako genetické markery především díky jejich vysoké informační schopnosti a kodominanci (Abdurakhmonov, 2016). Také to jsou multialelové markery, při jejichž užití jsou výsledky snadno reprodukovatelné a hlavně jsou použitelné pro široké spektrum příbuzných druhů organismů (Vieira *et al.*, 2016). Mikrosatelity jsou využívány především pro analýzu paternity nebo určení zakladatele skupiny, pro odhad genetické diverzity, pro studium taxonomie a evoluce, pro charakterizaci fylogenetických příbuzností a pro mnohé další studie (Oliveira *et al.*, 2006; Abdurakhmonov, 2016)

3.2.1 Klasifikace mikrosatelitů

Jedna z možností dělení mikrosatelitů je na základě motivu repetice. Vznikají tak 4 skupiny mikrosatelitů a to dokonalé, nedokonalé, přerušené a složené. Dokonalé mikrosatelity jsou takové sekvence, kde není celá repetice narušena ani jednou bází, např. TATATATATATA. U nedokonalých mikrosatelitů je motiv repetice narušen párem bází, např. TATATACTATATA. Přerušené mikrosatelity mají přerušovaný motiv repetice krátkou několikanukleotidovou sekvencí, např. TATACGTGTTATATATA. Složené repetice obsahují dvě na sebe navazující repetice, kdy každá je tvořena jinou jednotkou, např. TATATAGTGTGTGT (Oliveira *et al.*, 2006; Abdurakhmonov, 2016; Vieira *et al.*, 2016).

Další možností dělení mikrosatelitů je délka repetitivní jednotky. Na základě toho několik autorů dělí mikrosatelity na mono, di, tri, tetra, penta a hexanukleotidové (Tautz *et al.*, 1986; Tóth *et al.*, 2000). Studie Tóth *et al.* (2000) se zabývala rozdílem výskytu různých typů mikrosatelitů na 1 Mbp DNA sekvence v různých částech eukaryotických genomů (intergenové oblasti, exony a introny) u 10 taxonomických skupin. Autoři zjistili, že mononukleotidové repetice poly(A/T) jsou u všech taxonů častější než poly(C/G)

a dvakrát více se objevují u primátů v intronech a intergenových oblastech než di- a tetranukleotidové repetice. Di-, tetra a pentanukleotidové repetice se u většiny zkoumaných taxonů vyskytují častěji v intergenových oblastech a intronech než ve zbytku genomu. V celogenomovém měřítku jsou trinukleotidové repetice u všech zkoumaných taxonů nejčastěji se vyskytujícími repeticemi, a i když jsou rozptýleny po celém genomu, nejvíce se objevují v exonech. Druhými nejčastěji se vyskytujícími repeticemi v rámci celého genomu jsou hexanukleotidové repetice, ale na rozdíl od trinukleotidových repetic jsou častější v intronech a intergenových oblastech (Tóth *et al.*, 2000). Tito autoři také zjistili, že ze všech porovnávaných taxonů se mikrosatelity nejčastěji vyskytují u hlodavců (nejčetnější jsou dinukleotidové repetice) a nejméně často u had'átka obecného (*Caenorhabditis elegans*).

3.2.2 Původ a mutace mikrosatelitů

Mikrosatelity mohou vznikat *de novo* v úsecích DNA, které nemají žádné repetice, na základě náhodných bodových mutací (inzerce/delece) (Trivedi, 2004; Abdurakhmonov, 2016). Dokonce je i jedna z možností vzniku mikrosatelitů inzerce repetitivních mobilních elementů (Nadir *et al.*, 1996; Trivedi, 2004). Mikrosatelity jsou charakteristické vyšší mutační rychlostí (10^{-2} – 10^{-6} nukleotidů na lokus za generaci), než je tomu ve zbytku genomu (Schlötterer, 2000; Oliveira *et al.*, 2006). Jedny z příčin vzniku mutací mikrosatelitů jsou chybná párování bazí během rekombinace a také opravy dsDNA zlomů, kdy je reparačním systémem repetitivní sekvence použita pro rychlou opravu zlomu (Tautz *et al.*, 1986; Strand *et al.*, 1993; Trivedi, 2004; Abdurakhmonov, 2016). Nejčastější příčinou vzniku mutací mikrosatelitů je ale sklouznutí DNA polymerázy během DNA replikace (tzv. DNA slippage), kde dochází k nedodržení počtu repetitivních jednotek při syntéze nového vlákna, které poté obsahuje méně nebo více repetitivních jednotek než vlákno templátové. Tímto způsobem dojde ke vzniku nové alely (Tautz *et al.*, 1986; Strand *et al.*, 1993; Oliveira *et al.*, 2006). Právě díky tomu jsou mikrosatelity využívány jako genetické markery převážně pro studium paternity a populací (Oliveira *et al.*, 2006).

3.2.3 Polymorfní mikrosatelity u plameňáka růžového

V Laboratoři populační genetiky na Katedře buněčné biologie a genetiky PŘF UPOL bylo u plameňáka růžového dosud testováno pomocí PCR amplifikace 781 párů

primerů pro mikrosatelitové lokusy, z nichž bylo 47 *de novo* mikrosatelitů navržených pro plameňáky a zbylých 734 párů primerů bylo pro *cross-species* mikrosatelity.

Hledání polymorfních lokusů probíhalo ve dvou krocích a každým tímto krokem se obvykle zabývala jiná práce. Prvním krokem vždy bylo testování vybraných párů primerů pro mikrosatelitové lokusy u 6 nepříbuzných jedinců plameňáka růžového. Cílem bylo nalézt polymorfní lokusy. Druhým krokem bylo tyto vybrané polymorfní lokusy genotypovat a charakterizovat u 22 nepříbuzných jedinců plameňáka růžového a následně pomocí programu Cervus 3.0.6 (Kalinowski *et al.*, 2007) provést populační charakterizaci a programem Genepop 4.1 (Rousset, 2008) zjistit nezávislost těchto lokusů.

3.2.3.1 *De novo* polymorfní mikrosatelity u plameňáka růžového

Pro 3 druhy z řádu plameňáci bylo dosud popsáno celkem 70 párů primerů pro mikrosatelitové lokusy, z nichž 65 je dosud určeno jako nezávislých (dále vysvětleno v textu).

Pro plameňáka karibského bylo popsáno celkem 27 párů primerů pro mikrosatelitové lokusy, z nichž 13 párů primerů (označeny Pru μ) bylo popsáno ve 2 disertačních pracích (Kapil, 2005; Preston, 2005) a zbylých 14 párů primerů (označených PhoeniE) popsal Bauer (2007). Devět ze 13 párů primerů (Pru μ) publikovali Kapil *et al.* (2010) (Abdoullaye *et al.*, 2010), kde všechny tyto lokusy testovali na vazbu a potvrdili je jako nezávislé. Práce Bauer (2007) je sice citovaná v práci Frias-Soler *et al.* (2014), kde z ní byly použity 3 z párů primerů pro mikrosatelity označeny jako PhoeniE, ale mně se ji nepodařilo sehnat. Podařilo se ale od autorů Frias-Soler *et al.* (2014) získat alespoň výsledkovou tabulku z práce Bauer (2007), kde autor uvádí, že ze 14 mikrosatelitových lokusů je 5 polymorfních, 6 je asi polymorfních a 3 jsou monomorfní. Těchto 14 párů primerů se ještě bude testovat na polymorfismus v Laboratoři populační genetiky PřF UPOL, aby byla získána vlastní data.

Pro plameňáka růžového bylo dosud nalezeno 37 párů primerů pro mikrosatelitové lokusy (Geraci *et al.*, 2010; An *et al.*, 2010), které již byly testovány na polymorfismus v Laboratoři populační genetiky.

Dalším druhem plameňáka, pro který byly navrženy páry primerů pro mikrosatelitové lokusy, je plameňák nejmenší (*Phoenicopterus minor*), u kterého bylo dosud nalezeno 6 párů primerů pro mikrosatelitové lokusy (Zaccara *et al.*, 2011). Tyto

páry primerů budou v rámci Laboratoře populační genetiky PřF UPOL teprve testovány na polymorfismus u plameňáka růžového a karibského.

V Laboratoři populační genetiky na Katedře buněčné biologie PřF UPOL bylo dosud u plameňáka růžového testováno všech 37 párů primerů pro mikrosatelity, které byly popsány u plameňáka růžového, a také páry primerů pro mikrosatelity od plameňáka karibského, které byly označeny Pr μ .

Drobek (2010) byl první, kdo v Laboratoři populační genetiky PřF UPOL testoval páry primerů navržené pro mikrosatelity z řádu plameňáci. Autor během své diplomové práce prováděl charakterizaci vybraných polymorfních mikrosatelitů (dle Drobek (2008)) u 22 nepříbuzných jedinců plameňáka růžového a dále také amplifikoval 10 párů primerů pro mikrosatelity izolované od plameňáka karibského (dle Kapil (2005); Preston (2005)), aby následně otestoval jejich nezávislost. Drobek (2010) zjistil, že lokusy Pr μ od plameňáka karibského jsou polymorfní u plameňáka růžového, ale také přišel na to, že lokusy Pr μ 7, 8 a 9 jsou tentýž lokus jen s jinak navrženými primery. Autor ve své práci také provedl *in silico* porovnání sekvencí Pr μ mikrosatelitů a zjistil, že lokusy Pr μ 10, 11 a 12 jsou totožné. Dále Drobek (2010) také uvedl, že je to tentýž lokus, jako tomu je u párů primerů pro lokusy Pr μ 7, 8 a 9. Dle těchto poznatků všech 6 párů primerů pro lokusy Pr μ 7–Pr μ 12 amplifikuje jeden a tentýž lokus, jen s jinak navrženými primery. Drobek (2010) na základě svých výsledků vybral 8 nezávislých mikrosatelitových lokusů polymorfních u plameňáka růžového, které byly původně navrženy pro plameňáka karibského.

Amplifikací mikrosatelitových lokusů navržených pro plameňáka růžového se zabývala ve své bakalářské práci Manišová (2011). Provedla PCR amplifikaci 37 párů primerů u 6 nepříbuzných jedinců plameňáka růžového a označila z nich 1 jako monomorfní (PrC 12). Stejně páry primerů retestovala a charakterizovala Málková (2013) u 22 nepříbuzných jedinců plameňáka růžového a potvrdila přítomnost polymorfismu u všech 37 mikrosatelitů. V práci Manišové (2011) s největší pravděpodobností došlo k chybnému označení lokusu PrC 12 jako monomorfního kvůli malému počtu testovaných jedinců, kteří nejspíš nebyli pro tento lokus polymorfní, jelikož pozorovaná heterozygotnost (H_{OBS}) tohoto lokusu byla pouze 0,13 (Málková, 2013).

3.2.3.2 *Cross-species* polymorfní mikrosatelity u plameňáka růžového

V Laboratoři populační genetiky na Katedře buněčné biologie a genetiky PřF UPOL bylo pomocí *cross-species* PCR amplifikace u plameňáka růžového dosud amplifikováno 734 párů primerů pro mikrosatelitové lokusy, které byly v době vypracování prací, jež se jimi zabývaly, známy. Z řádu brodiví (Ciconiiformes) bylo u plameňáka růžového amplifikováno 168 mikrosatelitů, z řádu potápky (Podicipediformes) 7 mikrosatelitů, z řádu potáplice (Gaviiformes) 7 mikrosatelitů, z řádu trubkonosí (Procellariiformes) 207 mikrosatelitů, z řádu tučňáci (Sphenisciformes) 113 mikrosatelitů, z řádu veslonozí (Pelecaniformes) 152 mikrosatelitů, také bylo amplifikováno 7 mikrosatelitů z řádu dlouhokřídlí (Charadriiformes), dále 59 univerzálních ptačích mikrosatelitů, 13 mikrosatelitů z řádu vrubozobí (Anseriformes) a pouze 1 mikrosatelit z řádu pěvci (Passeriformes). Z těchto mikrosatelitů byly nejprve vybrány ty, které poskytovaly polymorfní produkty, poté u nich byla provedena genotypizace odečtením z polyakryamidového gelu a charakterizace pomocí programů Cervus 3.0.6 (Kalinowski *et al.*, 2007) a Genepop 4.1 (Rousset, 2008).

Drobek (2008) byl první, kdo se zabýval v Laboratoři populační genetiky PřF UPOL *cross-species* PCR amplifikací mikrosatelitů u plameňáka růžového. Ve své bakalářské práci testoval vybrané mikrosatelity izolované od příbuzných druhů u 6 nepříbuzných jedinců plameňáka růžového. Amplifikoval celkem 70 párů primerů od druhů z řádů brodiví, veslonozí a potápky. Nalezl celkem 7 polymorfních mikrosatelitů, z nichž 3 pocházely od zástupců z řádu brodiví a 4 od zástupců z řádu veslonozí. Drobek (2010) těchto 7 nalezených polymorfních *cross-species* mikrosatelitů charakterizoval u 22 nepříbuzných jedinců plameňáka růžového. Poté provedl jejich charakterizaci programy Cervus 3.0.6 (Kalinowski *et al.*, 2007) a Genepop 4.1 (Rousset, 2008). Drobek (2010) dále v rámci své práce (kromě mikrosatelitů odvozených od plameňáka karibského, které jsou popsány v kapitole: *De novo* polymorfní mikrosatelity u plameňáka růžového) testoval u 6 jedinců plameňáka růžového v tu dobu nově nalezených 214 mikrosatelitových lokusů z řádů brodiví, veslonozí a potáplice a také několik mikrosatelitových lokusů z řádů vrubozobí, dlouhokřídlí (2 mikrosatelity) a tučňáci (1 mikrosatelit). Následně nalezené polymorfní lokusy charakterizoval u 22 nepříbuzných jedinců plameňáka růžového. Drobek (2010) určil u plameňáka růžového celkem 29 polymorfních *cross-species* mikrosatelitů, z nichž 12 bylo z řádů brodiví, 16 z řádu veslonozí a 1 pocházel z řádu dlouhokřídlí.

Manišová (2011) byla další, kdo se zabýval *cross-species* PCR amplifikací mikrosatelitů u plameňáka růžového. Kromě mikrosatelitů odvozených od plameňáka růžového (zmiňovaných v kapitole *De novo* polymorfni mikrosatelity u plameňáka růžového) testovala amplifikaci 47 *cross-species* mikrosatelitů izolovaných od veslonohých a brodivých. U 6 nepříbuzných jedinců plameňáka růžového detekovala 5 polymorfni mikrosatelitů, z nichž 3 pocházely od zástupců z řádu veslonoží a 2 od zástupců z řádu brodiví. Těchto 5 polymorfni mikrosatelitových lokusů dále charakterizovala u 22 nepříbuzných jedinců plameňáka růžového Málková (2013), která potvrdila polymorfismus u 4 z nich (3 z řádu veslonoží a 1 z řádu brodiví). Málková (2013) také v rámci své diplomové práce prováděla charakterizaci mikrosatelitů navržených pro plameňáka růžového (viz kapitola *De novo* polymorfni mikrosatelity u plameňáka růžového) a také testovala a charakterizovala 19 v tu dobu nově navržených mikrosatelitů pro zástupce z řádu brodiví, ze kterých určila pouze 2 jako polymorfni u 22 nepříbuzných jedinců plameňáka růžového. Poslední částí její práce bylo znovu otestovat 9 mikrosatelitových lokusů, které Drobek (2008) určil jako monomorfni u plameňáka růžového, ale zároveň je určil jako polymorfni u plameňáka karibského (Drobek, 2008; 2010). V závislosti na tom, jak jsou oba druhy příbuzné, byl předpoklad, že jako monomorfni mohly být mikrosatelitové lokusy označeny omylem, a proto je Málková (2013) retestovala na větším počtu jedinců. Toto retestování bylo úspěšné, jelikož autorka z 9 lokusů určila 4 jako polymorfni (3 byly z řádu brodiví a 1 z řádu veslonoží).

Kůrová (2017) testovala 213 párů primerů pro *cross-species* mikrosatelity u 6 nepříbuzných jedinců plameňáka růžového, z nichž bylo 207 párů primerů navrženo pro mikrosatelity izolované z řádu trubkonosí, 5 z řádů dlouhokřídli a 1 z řádu pěvci. Z tohoto počtu mikrosatelitů určila Kůrová (2017) 48 polymorfni, z nichž 46 bylo odvozeno z řádu trubkonosí, konkrétně 8 mikrosatelitů bylo od 5 druhů z čeledi albatrosovití, 12 mikrosatelitů bylo od 4 druhů z čeledi buňňákovití, 26 mikrosatelitů bylo od 9 druhů z čeledi buňňákovití, a 2 mikrosatelity byly z řádu dlouhokřídli, konkrétně 1 od kulíka mořského a 1 od racka novozélandského. Charakterizaci 48 polymorfni mikrosatelitů nalezených Kůrovou (2017) se budu zabývat v rámci této diplomové práce.

Dosud poslední prací, která se zabývala *cross-species* PCR amplifikací mikrosatelitů u 6 nepříbuzných jedinců plameňáka růžového, byla Klaclová (2018). Testovala mikrosatelity z řádu tučňáci a univerzální ptačí mikrosatelity. Celkem použila

173 párů primerů, z nichž 113 bylo navrženo pro mikrosatelity od zástupců z řádu tučňáci a 60 párů primerů bylo pro univerzální ptačí mikrosatelity (24 párů primerů pro konzervované ptačí mikrosatelity a 36 párů primerů pro EST mikrosatelity). Jako polymorfni určila 24 mikrosatelitů, ze kterých bylo 13 navrženo pro zástupce z řádu tučňáci a 11 bylo univerzálních ptačích mikrosatelitů (6 konzervovaných a 5 EST mikrosatelitů). Těchto 24 polymorfni mikrosatelitů je v rámci Laboratoře populační genetiky zpracováváno a do roka by měly být výsledky uveřejněny formou diplomové práce.

V tabulce 1 uvádím přehled všech mikrosatelitových lokusů, které byly v době vypracování mé práce nalezeny a poté v Laboratoři populační genetiky na Katedře buněčné biologie a genetiky PřF UPOL testovány pomocí *cross-species* PCR amplifikace u plameňáka růžového.

Tabulka 1: Přehled 781 testovaných mikrosatelitových lokusů u plameňáka růžového (*Phoenicopterus roseus*) analyzovaných v Laboratoři populační genetiky na Katedře buněčné biologie a genetiky PřF UPOL.

Původ lokusu	Počet testovaných lokusů	Počet charakterizovaných polymorfni lokusů	Zdrojová práce
Brodiví	168	18	Drobek, 2010; Málková, 2013
Dlouhokřídli	7	1	Drobek, 2010
Plameňák karibský	10	10 (respektive 8 kvůli triplicitě lokusu)	Drobek, 2010
Plameňák růžový	37	37	Málková, 2013
Pěvci	1	-	Kůrová, 2017
Potápky	7	-	Drobek, 2008
Potáplice	7	-	Drobek, 2010
Trubkonosí	207	bude charakterizováno v rámci této práce	
Tučňáci	113	charakterizace probíhá	
Univerzální ptačí	59	charakterizace probíhá	
Veslonozí	152	20	Drobek, 2010; Málková, 2013
Vrubozobí	13	-	Drobek, 2010

U plameňáka růžového bylo dosud testováno 781 párů primerů pro mikrosatelity, z nichž bylo 84 nezávislých polymorfni mikrosatelitů plně charakterizováno u 22

nepříbuzných jedinců plameňáka růžového. Z 84 nezávislých polymorfních mikrosatelitů je 39 *cross-species* mikrosatelitů a 45 je *de novo* mikrosatelitů. *De novo* mikrosatelitů bylo v rámci Laboratoře populační genetiky amplifikováno 47, ale u 3 z nich bylo zjištěno, že jsou totožné. Proto tyto lokusy neuvádím v celkovém počtu nezávislých polymorfních mikrosatelitových lokusů zvlášť, ale beru je jako 1 nezávislý lokus.

3.2.4 Vybrané polymorfní mikrosatelity z řádu trubkonosí

V rámci mé diplomové práce byly amplifikovány mikrosatelitové lokusy odvozené z řádu trubkonosí u 22 nepříbuzných jedinců plameňáka růžového. Z řádu trubkonosí bylo dosud nalezeno celkem 207 mikrosatelitových lokusů navržených pro zástupce z čeledi albatrosovití, buřňáčkovití a buřňákovití. Všechny tyto lokusy byly v Laboratoři populační genetiky na Katedře buněčné biologie a genetiky PřF UPOL testovány Kůrovou (2017) na polymorfismus u 6 nepříbuzných jedinců plameňáka růžového.

Od zástupců čeledi albatrosovití bylo dosud v 5 studiích popsáno celkem 53 mikrosatelitových lokusů, které pocházely od 6 druhů albatrosů. Burg (1999) popsala celkem 26 mikrosatelitů, z nichž 11 pocházelo od albatrosa stěhovavého a 11 od albatrosa šedohlavého. Kůrová (2017) z nich určila 1 mikrosatelit pocházející od albatrosa stěhovavého a 2 mikrosatelity od albatrosa šedohlavého, které jsou polymorfní u plameňáka růžového. Burg *et* Croxall (2001) popsali 1 mikrosatelitový lokus pocházející od albatrosa černobrvého a šedohlavého a dále Burg *et* Croxall (2004) popsali 1 mikrosatelit pocházející od albatrosa Gibsonova, jižního a stěhovavého. Oba tyto mikrosatelity určila Kůrová (2017) jako monomorfní u plameňáka růžového. Od albatrosa stěhovavého Dubois *et al.* (2005) charakterizovali 10 nových mikrosatelitů, ze kterých Kůrová (2017) určila 1 jako polymorfní. Hernandez *et al.* (2014) charakterizovali celkem 15 mikrosatelitů, ze kterých 5 pocházelo od albatrosa černonohého, 4 od albatrosa laysanského a 6 od albatrosa bělohřbetého. Kůrová (2017) pomocí *cross-species* PCR amplifikace u plameňáka růžového určila z těchto mikrosatelitů 3 polymorfní, které pocházely pouze od albatrosa laysanského.

Z čeledi buřňáčkovití bylo dosud popsáno 54 mikrosatelitových lokusů, které byly publikovány ve 3 studiích. Prvních 10 mikrosatelitových lokusů, z nichž 1 pocházel od buřňáčka dlouhokřídlého a 9 od buřňáčka madeirského, popsali Sun *et al.* (2009).

Kůrová (2017) z nich určila 4 jako polymorfni u plameňáka růžového. Dalších 26 mikrosatelitů charakterizovali Bicknell *et al.* (2011). Ty byly izolovány od zástupců buňňáčka dlouhokřídlého. Z těchto mikrosatelitů Kůrová (2017) určila 4 jako polymorfni u plameňáka růžového. Bried *et al.* (2012) popsali 18 mikrosatelitových lokusů pocházejících od buňňáčka Monteirova, ze kterých jsou 4 lokusy určeny jako polymorfni u plameňáka růžového (Kůrová, 2017).

Od zástupců z čeledi buňňákovití bylo celkem v 10 studiích popsáno 100 mikrosatelitových lokusů. Techow *et O’Ryan* (2004) popsali 7 mikrosatelitových lokusů, které izolovali od buňňáka bělobradého. U plameňáka růžového Kůrová (2017) určila 1 z nich jako polymorfni. Dalších 11 mikrosatelitů pocházejících od buňňáka šedého popsali Bried *et al.* (2008), ze kterých je 1 polymorfni u plameňáka růžového (Kůrová, 2017). Lawrence (2008) popsala 2 mikrosatelity od buňňáka taiko, Brown *et Jordan* (2009) publikovali 6 mikrosatelitů izolovaných od buňňáka trinidadského a 10 mikrosatelitů pocházejících od buňňáka baleárského popsali Gonzalez *et al.* (2009). Z mikrosatelitů popsaných v těchto 3 publikacích našla Kůrová (2017) u plameňáka růžového po 1 polymorfni mikrosatelitu. Od buňňáka Bulwerova bylo charakterizováno 11 mikrosatelitových lokusů (Andris *et al.*, 2010; 2012), ze kterých Kůrová (2017) určila 4 jako polymorfni u plameňáka růžového. Welch *et Fleischer* (2011) izolovali 10 mikrosatelitových lokusů od buňňáka havajského. Z těchto jsou u plameňáka růžového polymorfni 2 mikrosatelity (Kůrová, 2017). Od buňňáka světlenohého bylo popsáno 11 mikrosatelitů (Hardesty *et al.*, 2012), ze kterých jsou 3 určeny jako polymorfni u plameňáka růžového (Kůrová, 2017). U buňňáka útlozobého bylo dosud ve 2 pracích popsáno celkem 32 mikrosatelitových lokusů (Quillfeldt *et al.*, 2012; Moodley *et al.*, 2015), ze kterých Kůrová (2017) určila jako polymorfni 2 mikrosatelity ze 7 popsaných autory Quillfeldt *et al.* (2012) a 10 polymorfni mikrosatelitů z 25 popsaných autory Moodley *et al.* (2015).

4 Materiál a metody

4.1 Biologický materiál

Biologický materiál (krev), který byl použit pro účely analýzy v této diplomové práci, byl odebrán a poskytnut pracovníky Zoologické zahrady Dvůr Králové. Krev pocházela od 22 nepříbuzných jedinců plameňáka růžového (*Phoenicopterus roseus*). Genomická DNA byla z krve izolována vedoucím této diplomové práce pomocí fenol-chloroformové metody a byla rozpuštěna v TE pufru, kde konečná koncentrace naředěné genomické DNA byla 10–50 µg/ml.

4.2 Chemikálie

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

- Uhličitan sodný (Lachner)
- Xylenová modř (Xylenecyanol FF) (AppliChem)
- 3-methakryloxypropyltrimethoxysilan (Serva)

4.3 Roztoky

Akrylamid, 6% zásobní roztok

150 ml 40% zásobního roztoku akrylamidu : N,N'-methylenbisakrylamidu (19:1)
 420 g močoviny
 50 ml 10x TBE
 484 ml deionizované vody
 po rozpuštění zfiltrovat a uložit v chladničce v temné láhvi

Dusičnan stříbrný, 0,1% roztok

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

Fix/stop roztok

800 ml deionizované vody
 88 ml ledové kyseliny octové

Hydroxid sodný, 1 mol/l roztok

40 g hydroxidu sodného
 doplnit do 1 l deionizovanou vodou

Kyselina dusičná, 1% roztok

800 ml deionizované vody
 12 ml 65% kyseliny dusičné

Molekulární lepidlo

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

Nanášecí pufr pro elektroforézu

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

Peroxodisíran amonný, 10% roztok

1 g peroxodisíranu amonného
10 ml deionizované vody
rozpustit a uchovávat v chladničce

Polakrylamidový gel, 6% roztok

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

TBE pufr, 10x zásobní roztok

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

Vývojka

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

4.4 Laboratorní přístroje a pomůcky

- Automatické pipety FinnpiPETTE (ThermoLabsystem)
 - 0,3–3 µl, 1–10 µl, 10–100 µl, 100–1000 µl
 - 1–10µl osmikanálová pipeta
- Automatické pipety NichipET EX (Nichiryo)
 - 0,5–10 µl, 10–100 µl, 20–200 µl, 100–1000 µl
- Hybridizační pec HB-2D (Techne)

- Chladnička kombinovaná (Whirlpool)
- Laboratorní váhy MARK S622 (BEL Engineering)
- Magnetická míchačka MR Hei-Standard (Heidolph)
- Negatoskop NEGA1 (Maneko)
- Sekvenační elektroforetická komůrka S2 (Whatman Biometra)
- Stolní mikrocentrifuga PRISM™mini (Labnet)
- Sušárna (Contherm)
- Termocykler GenePro (Bioer)
- Termocykler PTC-100™ (MJ Research, Inc.)
- Termocykler XP (Bioer)
- Třepačka Orbit 1 900 (Labnet)
- Vortex mixer (Labnet)
- Výrobek deionizované a ultračisté vody (Aqua Osmotic)
- Výrobek ledu Icematic F100 Compact (Castel Mac)
- Zdroj vysokého napětí EV232 (Consort)

4.5 Analyzované mikrosatelitové lokusy

V mé diplomové práci jsem se celkem zabývala 64 mikrosatelitovými lokusy. Experimentální část je rozdělena na 2 následující úkoly:

1. Charakterizace vybraných polymorfních lokusů (dle Kůrová (2017))

Prvním úkolem je charakterizovat 48 *cross-species* mikrosatelitových lokusů, které Kůrová (2017) určila jako polymorfní u 6 nepříbuzných jedinců plameňáka růžového. PCR amplifikaci provést s genomickou DNA 22 jedinců plameňáka růžového, polymorfní lokusy genotypizovat a následně za pomoci programu Cervus 3.0.6 (Kalinowski *et al.*, 2007) provést populační charakterizaci a programem Genepop 4.1 (Rousset, 2008) zjistit, zda jsou polymorfní markery nezávislé.

2. Retestování vybraných lokusů (dle Strejčková (2018))

Druhým úkolem je otestovat pomocí *cross-species* PCR amplifikaci 16 mikrosatelitů u 22 nepříbuzných jedinců plameňáka růžového. Těchto 16 mikrosatelitových lokusů bylo Strejčkovou (2018) označeno jako polymorfní u 30 nepříbuzných jedinců plameňáka karibského, ale Kůrovou (2017) byly označeny jako monomorfní u 6 nepříbuzných jedinců plameňáka růžového. Jelikož jsou tyto dva druhy velmi příbuzné, je zde pravděpodobné, že byl některý z těchto 16 mikrosatelitů chybně

označen jako monomorfní, a proto je třeba provést retestování na větším počtu jedinců. Nalezené polymorfní mikrosatelity genotypovat na 22 nepříbuzných jedincích plameňáka růžového a následně statisticky hodnotit programem Cervus 3.0.6 (Kalinowski *et al.*, 2007) a analyzovat na vazbu pomocí programu Genepop 4.1 (Rousset, 2008).

Z celkového počtu 64 analyzovaných mikrosatelitových lokusů je celkem 62 odvozených od zástupců z řádu trubkonosí (viz tabulka 2 a 3). Zbylé 2 lokusy, které určila Kůrová (2017) jako polymorfní u 6 nepříbuzných jedinců plameňáka růžového, byly navrženy pro druhy ptáků z řádu dlouhokřídlí, konkrétně lokus **Calex-01** (Küpper *et al.*, 2007), který byl navržený pro kulíka mořského (*Charadrius alexandrius*) a lokus **RBG29** (Given *et al.*, 2002), který byl navržený pro racka novozélandského (*Larus novaehollandiae*). Tyto dva lokusy z řádu dlouhokřídlí byly zvoleny z důvodu výskytu polymorfismu při *cross-species* PCR amplifikaci u zástupců z řádu trubkonosí.

Tabulka 2: Přehled 46 *cross-species* mikrosatelitů (polymorfních dle Kůrové (2017)) z řádu trubkonosí, amplifikovaných u 22 nepříbuzných jedinců plameňáka růžového.

Čeď	Zdrojový druh	Název lokusu (Acc. No)	Literární zdroj
Albatrosovití (Diomedidae)	Albatros laysanský (<i>Phoebastria immutabilis</i>)	LAAL7 (neuveďeno)	Hernandez <i>et al.</i> , 2014
		LAAL10 (neuveďeno)	
		LAAL19 (neuveďeno)	
	Albatros stěhovavý (<i>Diomedea exulans</i>)	12H8 (AY945756)	Dubois <i>et al.</i> , 2005
		De25 (AF096805)	
	Albatros šedohlavý (<i>D. chrysostoma</i>)	Dc5 (AF096790)	Burg, 1999
Dc31 (AF096810)			
Albatros šedohlavý a stěhovavý	D29 (AF096808)		
Buňňáčkovití (Hydrobatidae)	Buňňáček dlouhokřídlý (<i>Oceanodroma leucorhoa</i>)	Ole02 (FR696378)	Bicknell <i>et al.</i> , 2011
		Ole09 (FR696385)	
		Ole17 (FR696393)	
		Ole21 (Fr696397)	
		O110-39 (FJ238106)	
	Buňňáček madeirský (<i>O. castro</i>)	Oc28B (FJ238097)	Sun <i>et al.</i> , 2009
		Oc49 (FJ238098)	
		Oc63 (FJ238100)	
	Buňňáček Monteirův (<i>O. monteiroi</i>)	Omn1 (JQ303226)	Bried <i>et al.</i> , 2012
		Omn8 (JQ303232)	
		Omn21 (JQ303238)	
		Omn25 (JQ303242)	

Tabulka 2: Pokračování.

Čeď	Zdrojový druh	Název lokusu (Acc. no)	Literární zdroj
Buňákovití (Procellariidae)	Buňák baleárský (<i>Puffinus mauretanicus</i>)	Puff G2F (EU158899)	Gonzalez <i>et al.</i> , 2009
	Buňák bělobradý (<i>Procellaria aequinoctialis</i>)	Paequ3 (AY371071)	Techow <i>et O’Ryan</i> , 2004
	Buňák Bulwerův (<i>Bulweria bulwerii</i>)	Bb20 (HM171896)	Andris <i>et al.</i> , 2010; 2012
		Bb21 (HM171897)	
		Bb22 (HM171898)	
		Bb25 (HM171901)	
	Buňák havajský (<i>Pterodroma sandwichensis</i>)	Ptero03 (HQ918220)	Welch <i>et Fleischer</i> , 2011
		Ptero05 (HQ918222)	
	Buňák světlenohý (<i>Puffinus carneipes</i>)	Pc B109 (JX435475)	Hardesty <i>et al.</i> , 2012
		Pc D3 (JX435478)	
		Pc D103 (JX435479)	
	Buňák šedý (<i>Calomectris diomedea</i>)	Cd5 (EU029087)	Bried <i>et al.</i> , 2008
	Buňák taiko (<i>Pterodroma magentae</i>)	Tch6 (nevedeno)	Lawrence, 2008
Buňák trinidadský (<i>P. arminjoniana</i>)	Parm01 (EU360817)	Brown <i>et Jordan</i> , 2009	
Buňák útlozobý (<i>Pachyptila belcheri</i>)	Pacbel_00386 (nevedeno)	Moodley <i>et al.</i> , 2015	
	Pacbel_07265 (nevedeno)		
	Pacbel_08867 (nevedeno)		
	Pacbel_08988 (nevedeno)		
	Pacbel_09021 (nevedeno)		
	Pacbel_09528 (nevedeno)		
	Pacbel_10033 (nevedeno)		
	Pacbel_15327 (nevedeno)		
	Pacbel_17944 (nevedeno)		
	Pacbel_17986 (nevedeno)		
Patbel3 (JF288777)	Quillfeldt <i>et al.</i> , 2012		
Patbel7 (JF288781)			

Tabulka 3: Přehled 16 *cross-species* mikrosatelitů, odvozených z řádu trubkonosí, které byly retestovány u 22 nepříbuzných jedinců plameňáka růžového dle výsledků Strejčkové (2018).

Čeď	Zdrojový druh	Název lokusu (Acc. No)	Literární zdroj
Albatrosovití (Diomedidae)	Albatros černonohý (<i>Phoebastria nigripes</i>)	BFAL4 (neuveďeno)	Hernandez <i>et al.</i> , 2014
		BFAL14 (neuveďeno)	
	Albatros stěhovavý (<i>Diomedea exulans</i>)	De3 (AF096789)	Burg, 1999
	Albatros šedohlavý (<i>D. chrysostoma</i>)	Dc22 (AF096803)	
Buňáčkovití (Hydrobatidae)	Buňáček dlouhokřídľý (<i>Oceanodroma leucorhoa</i>)	Ole13 (FR696389)	Bicknell <i>et al.</i> , 2011
	Buňáček madeirský (<i>O. castro</i>)	Oc79 (FJ238102)	Sun <i>et al.</i> , 2009
		Oc87B (FJ238104)	
Buňáček Monteiroův (<i>O. monteiroi</i>)	Omn3 (JQ303228)	Bried <i>et al.</i> , 2012	
Buňákovití (Procellariidae)	Buňák bělobradý (<i>Procellaria aequinoctialis</i>)	Paequ7 (AY371073)	Techow <i>et</i> O’Ryan, 2004
		Paequ8 (AY371074)	
	Buňák Bulwerův (<i>Bulweria bulwerii</i>)	Bb11 (HM171894)	Andris <i>et al.</i> , 2010; 2012
	Buňák světlenohý (<i>Puffinus carneipes</i>)	Pc A107 (JX435472)	Hardesty <i>et al.</i> , 2012
	Buňák útľozobý (<i>Pachyptila belcheri</i>)	Pacbel_03731 (neuveďeno)	Moodley <i>et al.</i> , 2015
		Pacbel_08509 (neuveďeno)	
		Patbel1 (JF288775)	Quillfeldt <i>et al.</i> , 2012
Patbel4 (JF288778)			

4.6 PCR amplifikace

Pro *cross-species* PCR amplifikaci genomické DNA 22 nepříbuzných jedinců plameňáka růžového bylo použito 64 párů primerů z řádu trubkonosí, které jsou uvedeny v tabulce 2 a v tabulce 3 a také 2 páry primerů pro mikrosatelitové lokusy z řádu dlouhokřídlí, konkrétně pro lokusy RBG29 a Calex-01.

Tabulka 4: Složení PCR reakční směsi pro 22 vzorků.

Složky PCR reakční směsi	Objem [μ l]
Deionizovaná voda	177,6
Reakční pufr 10x	26,8
Roztok $MgCl_2$ (25 mmol/l)	16,0
Roztok dNTPs (20 mmol/l)	2,8
Primer F (10 μ mol/l)	13,2
Primer R (10 μ mol/l)	13,2
<i>aTaq</i> DNA polymeráza (5 U/ μ l)	4,0

Pozn.: V některých případech byla snížena koncentrace hořčičnatých iontů snížením objemu roztoku $MgCl_2$. Deionizovaná voda byla doplněna tak, aby celkový objem reakční směsi zůstal nezměněn.

1. Jednotlivé složky PCR reakční směsi rozmrazit, zvortexovat a zcentrifugovat.
2. Pro 1 PCR reakci nachystat 22 0,2ml PCR zkumavek a jednu 1,5ml zkumavku.
3. Do 22 0,2ml PCR zkumavek napipetovat pomocí osmikanálové pipety po 1 μ l genomické DNA 22 nepříbuzných jedinců plameňáka růžového.
4. Do 1,5ml zkumavky napipetovat jednotlivé složky reakční směsi v pořadí dle tabulky 4. Vše zvortexovat a zcentrifugovat.
5. PCR reakční směs rozpipetovat po 9 μ l do PCR zkumavek ke genomické DNA a zcentrifugovat.
6. PCR zkumavky uzavřít, vložit do termocykleru a nastavit požadovaný časový a teplotní profil (viz schéma 1).

Schéma 1: Časový a teplotní profil PCR reakce

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

T_a označuje teplotu annealingu, která byla použita pro amplifikaci každého páru primerů dle výsledků Kůrové (2017). V některých případech byla provedena optimalizace teploty a výsledné T_a jsou uvedeny v tabulce 5 (viz kapitola Výsledky).

4.7 Elektroforetická separace PCR produktů

Elektroforetická separace probíhala za denaturujících podmínek a celý postup byl optimalizován pro použití sekvenační elektroforetické komůrky S2 Whatman Biometra s rozměry skel 330 x 390 mm a 330 x 420 mm a tloušťkou gelu 0,4 mm.

1. Příprava menšího skla (provádět v digestoři):
 - a. stříčkou nanést na plochu skla deionizovanou vodu a utřít papírovým ubrouskem dosucha, 2x,
 - b. na stejnou plochu skla stříčkou nanést 96% ethanol a utřít papírovým ubrouskem, 2x,
 - c. připravit molekulární lepidlo do 1,5ml zkumavky, protřepat překlopením, nanést na ošetřovanou plochu skla a pečlivě rozetřít papírovým ubrouskem,
 - d. po cca 3 min papírovým ubrouskem navlhčeným 96% ethanolem otřít plochu skla celkem 4x. Použít vždy nový ubrousek.
2. Příprava většího skla:
 - a. na plochu skla nanést stříčkou deionizovanou vodu a utřít papírovým ubrouskem dosucha, 2x,
 - b. na stejnou plochu skla nanést přípravek Rain off a pečlivě rozetřít papírovým ubrouskem,
 - c. po cca 3 min papírovým ubrouskem navlhčeným deionizovanou vodou otřít plochu skla celkem 2x. Použít vždy nový ubrousek.
3. Větší sklo položit ošetřenou plochou nahoru na polystyrenovou desku v digestoři.
4. Paralelně s delšími hranami skla umístit na ošetřenou plochu skla 0,4mm spacery gumami nahoru a přiložit menší sklo tak, aby ošetřené plochy skel byly u sebe. Menší sklo přitlačit ke gumám a po delších hranách skla k sobě připevnit klipsy.
5. V kádince připravit 6% roztok polyakrylamidového gelu, promíchat krouživými pohyby a roztok pomalu nalévat do prostoru mezi skla. Po vyplnění celého prostoru roztokem vložit (na stranu mezi gumy spacerů) hřebínek rovnou stranou mezi skla tak, aby byl vsunutý asi 5 mm. V místě hřebíčku skla připevnit pomocí klipsů a nechat polymerizovat alespoň 60 min v horizontální poloze.

6. Po polymerizaci odstranit klipsy a pomocí kartáčku a tekoucí vody pečlivě odstranit přebytky gelu v okolí hřebínku a také po stranách skel.
7. Menší sklo, které přijde do styku s hliníkovou deskou elektroforetické komůrce, dosucha utřít papírovými ubrousky a skla s gelem umístit do komůrky, hřebínkem nahoru. Skla s gelem připevnit v komůrce pomocí úchytek.
8. Do anodového a katodového prostoru nalít 0,5x TBE pufr, vytáhnout hřebínek a vzniklý prostor promýt proudem 0,5x TBE pufru.
9. Zavřít víka komůrky, připojit zdroj stejnosměrného elektrického proudu a nastavit hodnotu výkonu na 90 W. Zbylé hodnoty (elektrické napětí a proud) nechat nastaveny na maximální hodnotu, tedy 3000 V/150 mA. Gel nechat nahřívat 30 min.
10. Zatímco je gel nahříván, připravit PCR produkty přidáním 5 μ l nanášecího pufru do každé PCR zkumavky. Následně cca 2 min před koncem nahřívání vložit produkty do termocykleru vytemperovaného na 96 °C na dobu 3 min. Poté produkty umístit do ledové tříště.
11. Po 30 min nahřívání gelu odpojit zdroj stejnosměrného elektrického proudu a otevřít víko komůrky, pomocí proudu 0,5x TBE očistit mezeru mezi skly od případných zbytků gelu a močoviny. Do mezery mezi skly opatrně zasunout hřebínek zoubky dolů tak, aby byly zabořeny v gelu cca 1 mm.
12. Pomocí osmikanálové pipety nanést PCR produkty mezi zoubky hřebínku o objemu 1–2 μ l.
13. Zavřít víko komůrky, připojit zdroj stejnosměrného elektrického proudu, nastavit hodnotu výkonu na 70 W (hodnoty elektrického proudu a napětí nechat na maximální hodnoty 3000 V/150 mA) a nechat separovat po dobu 90–240 min.
14. Nachystat roztoky potřebné pro vyvolání – fix/stop, 1% roztok kyseliny dusičné a vývojku (prozatím bez formaldehydu). Vývojku umístit do chladničky.
15. Po uplynutí požadované doby separace odpojit zdroj stejnosměrného elektrického proudu, odpustit pufr, otevřít víka, otevřít úchytky a gel položit na fotomisku malým sklem nahoru. Z meziprostoru skel vytáhnout spacery a hřebínek. Pomocí čepele nože od sebe oddělit skla tak, aby gel zůstal na menším skle a toto sklo s gelem umístit na fotomisku na třepače, zalít fix/stop roztokem. Nechat působit alespoň 20 min.
16. Po 20 min roztok slít zpět do baňky (ponechat na zastavení vyvolávání) a sklo s gel promýt v deionizované vodě, 3x.

17. Fotomisku s gelem vrátit na třepačku a zalít 1% roztokem kyseliny dusičné. Nechat působit 5 min.
18. Po 5 min roztok vylít do odpadu a sklo s gelem opláchnout deionizovanou vodou, 4x.
19. Sklo s gelem umístit do čisté fotomisky, zalít roztokem AgNO₃, kam bylo bezprostředně před použitím přidáno 1,2 ml formaldehydu a nechat působit minimální 30 min.
20. Před dokončením 30 min nachystat čistou fotomisku s deionizovanou vodou a do vývojký přidat 1,2 ml formaldehydu a 160 µl Na₂S₂O₃.
21. Po 30 min slít roztok zpět do baňky, sklo s gelem na 10 s ponořit do přichystané deionizované vody a umístit do čisté fotomisky.
22. Ihned zalít gel přichystanou vývojkou. Nechat působit asi 2 min (dle intenzity bandů). Při dosažení požadované intenzity bandů gel zalít ponechaným fix/stop roztokem, nechat působit asi 2 min.
23. Roztok z fotomisky vylít do odpadu a sklo s gelem umístit do přichystané deionizované vody (2 min).
24. Sklo s gelem umístit do sušárny vyhřáté na 90 °C asi na 35–45 min.
25. Usušený gel hodnotit na negatoskopu.
26. Vyhodnocený a nepotřebný gel namočit na několik hodin do roztoku NaOH (1 mol/l). Gel se odlepi od skla a sklo je možné opět použít.

4.8 Statistické hodnocení výsledných PCR produktů

Získané genotypy všech mikrosatelitových lokusů polymorfních u 22 nepříbuzných jedinců plameňáka růžového byly z programu MS Office Excel 2016 z formátu .xlsx převedeny na formát .csv. Nejdříve byly mikrosatelity statisticky hodnoceny pomocí programu Cervus 3.0.6 (Kalinowski *et al.*, 2007), kde byly stanoveny pozorované a očekávané heterozygotnosti, obsah informace (PIC), informace potřebné pro příbuzenské studie, odchylky od Hardy-Weinbergovy rovnováhy a pravděpodobnost výskytu nulových alel. Mikrosatelitové lokusy byly také hodnoceny na vzájemnou nezávislost (vazbu lokusů) pomocí webové verze programu Genepop 4.1 (Rousset, 2008).

5 Výsledky

V této diplomové práci jsem se zabývala amplifikací *cross-species* mikrosatelitových lokusů u 22 nepříbuzných jedinců plameňáka růžového (*Phoenicopterus roseus*) a následně jejich charakterizací. Experimenty byly rozděleny do 2 částí, celkově jsem amplifikovala 64 mikrosatelitových lokusů.

V první části jsem provedla charakterizaci 48 mikrosatelitových lokusů, které byly určeny jako polymorfní při testování u 6 nepříbuzných jedinců plameňáka růžového (Kůrová, 2017). Mikrosatelity byly původně izolovány z řádu trubkonosí (Procellariiformes), konkrétně 8 mikrosatelitů z čeledi albatrosovití (Diomedea), 12 z čeledi buňňáčkovití (Hydrobatiae) a 26 z čeledi buňňákovití (Procellariidae). Další 2 mikrosatelity byly izolovány od zástupců z řádu dlouhokřídlí (Charadriiformes), jelikož byly polymorfní u zástupců z řádu trubkonosí. Konkrétně se jednalo o 1 mikrosatelit z čeledi kulíkovití (Charadriidae) a 1 z čeledi rackovití (Laridae). Provedla jsem *cross-species* PCR amplifikaci a genotypizaci 22 nepříbuzných jedinců plameňáka růžového, kde byla jako výchozí teplota annealingu (T_a) použita taková teplota, kterou uváděla Kůrová (2017) ve své bakalářské práci jako finální. V některých případech bylo potřeba tuto teplotu upravit, aby byl výsledný elektroforetogram dobře hodnotitelný a bylo možné odečíst genotypy všech jedinců. Výsledné T_a byly od 48 °C do 70 °C. Při amplifikaci páru primerů pro lokus Ole09 bylo potřeba upravit podmínky PCR reakční směsi změnou koncentrace hořečnatých iontů ($MgCl_2$) na polovinu (0,8 nmol/l). U zbylých párů primerů byla použita původní koncentrace hořečnatých iontů v PCR reakční směsi (1,6 nmol/l). Také bylo potřeba v některých případech prodloužit dobu elektroforetické separace z důvodu zřetelnějšího rozlišení jednotlivých alel. Tato doba se pohybovala od 90 do 240 minut dle mikrosatelitu.

Ve druhé části jsem použila 16 mikrosatelitových lokusů, které bylo potřeba retestovat na větším počtu jedinců plameňáka růžového. Tyto mikrosatelity byly Strejčkovou (2018) označeny jako polymorfní u 30 nepříbuzných jedinců plameňáka karibského, ale současně v práci Kůrové (2017) byly označeny jako monomorfní u 6 nepříbuzných jedinců plameňáka růžového. Jelikož jsou tyto dva druhy velmi příbuzné, je zde pravděpodobné, že byl některý z 16 mikrosatelitů označený jako monomorfní chybně. Testované mikrosatelitové lokusy byly izolovány od zástupců z řádu trubkonosí, konkrétně 4 z čeledi albatrosovití, 4 z čeledi buňňáčkovití a 8 z čeledi buňňákovití. Tyto

mikrosatelity jsem nejprve amplifikovala při T_a 50 °C, poté podle potřeby teplotu upravovala a dále pracovala pouze se 3 mikrosatelity, které poskytovaly polymorfni produkt. Výsledné T_a polymorfni lokusů byly od 50 °C do 62 °C. Ve dvou případech bylo potřeba upravit podmínky PCR reakční směsi, a to úpravou koncentrace hořčnatých iontů. Konkrétně u lokusu Pauqu7 byla použita dvoutřetinová koncentrace hořčnatých iontů v PCR reakční směsi (1,06 nmol/l) a u lokusu De3 byla použita třičtvrtinová koncentrace hořčnatých iontů v PCR reakční směsi (1,2 nmol/l). Také bylo potřeba prodloužit dobu elektroforetické separace pro zřetelnější rozlišení jednotlivých alel z původních 90 min na výsledných 120–210 min (dle mikrosatelitu).

U všech 64 mikrosatelitových lokusů testovaných u 22 nepříbuzných jedinců plameňáka růžového se mi podařilo získat PCR produkt. Polymorfni produkt poskytlo celkem 43 párů primerů pro mikrosatelitové lokusy. Pár primerů pro lokus Pc D3 produkoval 2 polymorfni oblasti, tudíž jsem celkem detekovala 44 polymorfni oblastí se 2–13 alelami.

Ze 48 párů primerů testovaných dle Kůrové (2017) jsem u 40 z nich detekovala polymorfni produkt (z celkového počtu 43 párů primerů s polymorfni produktem detekovaných v této diplomové práci). Pár primerů pro lokus Pc D3, jak již uváděla Kůrová (2017), poskytl 2 polymorfni oblasti, a proto jsem dle výsledků autorky celkem našla 41 polymorfni oblastí amplifikovaných 40 páry primerů pro mikrosatelity izolované z řádu trubkonosí.

Z 16 párů primerů retestovaných u plameňáka růžového dle Strejčkové (2018) jsem detekovala polymorfni produkt u 3 z nich. Konkrétně se jednalo o BFAL4 - izolovaný od albatrosa černonohého (*Pheobastria nigripes*) (Hernandez *et al.*, 2014) a De3 - od albatrosa stěhovavého (*Diomedea exulans*), oba z čeledi albatrosovití (Burg, 1999) a Paequ7 - od buňáka bělobradého (*Procellaria aequinoctialis*) z čeledi buňákovití (Techow *et O’Ryan*, 2004). V práci Kůrové (2017) byly tyto 3 mikrosatelity označeny jako monomorfni nejspíš z důvodu testování na malém počtu jedinců (6), kde je nižší pravděpodobnost detekce polymorfismu v případě lokusů, které mají malý počet alel a nízkou heterozygotnost. Kompletní přehled detekovaných polymorfni lokusů uvádím v tabulce 5.

Ze 64 amplifikovaných mikrosatelitů bylo 21 s monomorfni produktem, a tyto jsem vyloučila z další charakterizace. Konkrétně se jednalo o lokusy od Kůrové (2017),

kterých jsem testovala 48, z nichž 8 lokusů jsem označila za monomorfní, a tedy Kůrová (2017) je chybně určila jako polymorfní u 6 nepříbuzných jedinců plameňáka růžového. Pravděpodobně k chybě došlo z důvodu výskytu artefaktů po elektroforetické separaci PCR produktů a jejich vizualizaci v gelech. Jednalo se o lokusy De25 - od albatrosa stěhovavého z čeledi albatrosovití (Burg, 1999), Oc63 - od buňňáčka madeirského (Sun *et al.*, 2009) a Omn25 - od buňňáčka Monteirova (Bried *et al.*, 2012) z čeledi buňňákovití a Bb21 - od buňňáka Bulwerova (Andris *et al.*, 2010; 2012), Ptero03 - od buňňáka havajského (*Pterodroma sandwichensis*) (Welch *et al.*, 2011), Pacbel_08867, Pacbel_15327 a Patbel7 - od buňňáka útlozobého (Moodley *et al.*, 2015; Quillfeldt *et al.*, 2012) všech pět z čeledi buňňákovití. U většiny z 8 výše zmíněných mikrosatelitů Kůrová (2017) detekovala 2 alely, u lokusu Omn25 detekovala dvě polymorfní oblasti, každou po 2 alelách, a u lokusu Patbel7 detekovala dokonce 4 alely. Podle Strejčkové (2018) jsem retestovala u 22 nepříbuzných jedinců plameňáka růžového 16 párů primerů pro mikrosatelity kvůli jejich polymorfismu u příbuzného plameňáka karibského. Z 16 párů primerů jsem označila 13 s monomorfním produktem, a ty jsem již dále necharakterizovala. Konkrétně se jednalo o lokusy: BFAL14 - izolovaný od albatrosa černonohého (Hernandez *et al.*, 2014) a Dc22 - od albatrosa šedohlavého (*Diomedea chrysostoma*), oba z čeledi albatrosovití (Burg, 1999). Z čeledi buňňákovití mikrosatelity Ole13 - od buňňáčka dlouhokřídlého (*Oceanodroma leucorhoa*) (Bicknell *et al.*, 2011), Oc79 a Oc87B - od buňňáčka madeirského (*O. castro*) (Sun *et al.*, 2009) a Omn3 - od buňňáčka Monteirova (*O. monteiroi*) (Bried *et al.*, 2012). Z čeledi buňňákovití mikrosatelity Paequ8 - od buňňáka bělobradého (Techow *et al.*, 2004), Bb11 - od buňňáka Bulwerova (*Bulweria bulwerii*) (Andris *et al.*, 2010; 2012), Pc A107 - od buňňáka světlenohého (*Puffinus carneipes*) (Hardesty *et al.*, 2012) a Pacbel_03731, Pacbel_08509, Patbel1 a Patbel4 - od buňňáka útlozobého (*Pachyptila belcheri*) (Quillfeldt *et al.*, 2012; Moodley *et al.*, 2015).

Tabulka 5: Charakteristika 44 polymorfních mikrosatelitových lokusů amplifikovaných pomocí 43 párů primerů u 22 nepříbuzných jedinců plameňáka růžového. V tabulce jsou uvedeny názvy lokusů společně s kódem uvedeným v databázi GenBank (Accession no.), dále sekvence primerů, jednotky repetice, zdrojový druh daného mikrosatelitového lokusu, teplota annealingu (T_a), délka elektroforetické separace (ELFO), počet nalezených alel, signifikance odchylky od Hardy-Weinbergovy rovnováhy (HW) (NS - není signifikantní, ND - netestováno, ** - odchylka se signifikancí 1 %) a pravděpodobnost výskytu nulových alel.

Lokus (GenBank - Accession no.)	Sekvence primerů (5' → 3')	Jednotka repetice	Zdrojový druh	T_a [°C]	ELFO [min]	Počet alel	HW	Nulové alely
BFAL4 (neuvedeno)	F: TGGGTCAGTTTACCTCTCAGC R: GTTTGCCATTTTAAACTGTCATTGGC	TC	Albatros černonohý	62	150	2	NS	-0,10
LAAL7 (neuvedeno)	F: CAGCATGACCAAATCCATCC R: GTTTGGACACAAATGCCGTTCTTG	AGC	Albatros laysanský	64	90	4	NS	-0,07
LAAL10 (neuvedeno)	F: TCCCAGCAGTGAAGCCATAG R: GTTTGGCAGGTAAGGAGAACAGAGG	AGT		62	90	7	NS	-0,01
LAAL19 (neuvedeno)	F: ATGACCAGTGCCATCAACAG R: TGGCCAGATGTGATTTGAAG	ATCC		57	90	5	NS	0,03
12H8 (AY945756)	F: CATGCCTGAATGCACTTTGT R: CACAATGGGTATAAGATTTTGCTG	GT/AT	Albatros stěhovavý	63	90	2	ND	-0,00
De3 (AF096789)	F: CTGCCAAAAGAATTCCCTG R: CCAACAAGGACTAAGCCCAA	AC		50 ^{3/4}	120	3	NS	-0,07
Dc5 (AF096790)	F: AGGAGGGAACTTCTCCAG R: AGCAGGGAGTGACTTGAGGAG	CA/ CAC	Albatros šedohlavý	63	90	3	NS	-0,04
Dc31 (AF096810)	F: CTGACTCTCTGGGATGAGCC R: GTACCCCTGGAAAGCCAGAC	CA/GC/ AG		64	90	2	NS	0,04
D29 (AF096808)	F: TTTGGGGATAGATGGGTCAC R: GTTTTTCCCTTCTGTGCTGG	CT/ GACAC	Albatros šedohlavý a stěhovavý	56	90	2	NS	-0,04

Tabulka 5: Pokračování 1.

Lokus (GenBank - Accession no.)	Sekvence primerů (5' → 3')	Jednotka repetice	Zdrojový druh	T _a [°C]	ELFO [min]	Počet alel	HW	Nulové alely
Ole02 (FR696378)	F: GGGTTCCTGTTACCAAAGGGCAG R: CATAAGCACAAAGGTTCTAGCTCCCTC	GAAA	Buřňáček dlouhokřídlý	70	240	13	NS	0,02
Ole09 (FR696385)	F: GGCCTGGATTCTGCGTGTTGGG R: CAGCTACAGGCCACGGGTGC	CA		59 ^{1/2}	120	5	NS	-0,04
Ole17 (FR696393)	F: TGACATGACCACTTTCCATAGC R: TGACATGACCACTTTCCATAGC	GT		62	150	2	NS	-0,00
Ole21 (FR696397)	F: CCACGAGAAATGGACATAACAAC R: TGAAGAACTCCGAAATAACTGTG	GA/A/ GAAA		55	120	4	NS	-0,00
Oli10-39 (FJ238106)	F: TTAAGAACAGAGCCTGACTTG R: ACAAATCTCATGTCCTTGG	GT		60	120	3	NS	0,08
Oc28B (FJ238097)	F: GCGTTGACCAGCAAATAGTC R: GGAAGGCTACCACAATTTCA	TG	Buřňáček madeirský	56	90	4	NS	0,00
Oc49 (FJ238098)	F: TGCTTCTGGATTTGTTTTGC R: CAAACCGTGTGACCCAGATA	CA		61	140	6	NS	-0,07
Omn1 (JQ303226)	F: TTTTTGTTTTTGATTCTCACATTCTT R: TGGGAGTGACCTGCTTACCT	AC/TG	Buřňáček Monteirův	56	90	3	NS	-0,10
Omn8 (JQ303232)	F: TGCAACCTTAGCATTACCTAGC R: GGGGCGAGCATTACATTAAC	AC		60	90	8	NS	-0,03
Omn21 (JQ303238)	F: TTTTGTAGCTCTTTTGTAGCTAGCCTT R: TAACCCAGAAAAATGCAGCC	GTT		54	90	2	NS	-0,25
Puff G2F (EU158899)	F: GCTCTCCCAGTTTGCACG R: TCCCATGCTTTAACCCTG	GT	Buřňák baleárský	57	150	3	NS	-0,11

Tabulka 5: Pokračování 2.

Lokus (GenBank - Accession no.)	Sekvence primerů (5' → 3')	Jednotka repetice	Zdrojový druh	T _a [°C]	ELFO [min]	Počet alel	HW	Nulové alely
Paequ3 (AY371071)	F: TGTGGGTGCAGTAGAGCA R: CAATAAGAAGATCAGCAGAACAGAC	GA	Buřňák bělobradý	65	170	3	NS	0,08
Paequ7 (AY371073)	F: TGCAGACCTGACTTTCACAGCTC R: CCTCCAAACATCCAGCCATC	GT		59 ^{2/3}	210	4	NS	-0,10
Bb20 (HM171896)	F: TGGTGAACAGCAGACACTTTC R: GAGTGCAGAGCTGGTAGTCG	TG	Buřňák Bulwerův	50	90	2	NS	-0,12
Bb22 (HM171898)	F: TTCACAGCAGAATCACCTCAG R: GCTCAAAGGGTGGAAATTGTT	TG		58	90	2	NS	-0,12
Bb25 (HM171901)	F: GCATCCCTGGAACCTCTGATT R: GAATGAACCAGCCAGAAGGT	AC		58	90	4	NS	0,01
Ptero05 (HQ918222)	F: TGCTGTTCGGCTGGGTTAC R: CTGCCTGCCTTCCTGAAAC	AAG	Buřňák havajský	64	180	2	**	0,83
Pc B109 (JX435375)	F: CTCAGAGCGATCACACTGTACT R: AAAGCATTTCAGGATGTAGGTTTC	CAA	Buřňák světlenohý	64	120	3	ND	-0,08
Pc D3 (JX435478)	F: CCTCTGCTCAAGTCTGTCAC R: AAACCTCCTTTGGGATGA	GATA/ GAAA		48 ^Δ	90	2 2	NS ND	-0,09 -0,04
Pc D103 (JX435479)	F: GGAAAGATGTCATGCTGATGA R: GTGGGAGATTCATAGGCAAAG	GATA/ GATG		58	90	2	ND	-0,04
Cd5 (EU029087)	F: CTGCACAGACTGAGAGTATAAGATTC R: GGCTTAAAGGGTAAATACACATGG	GT/AT	Buřňák šedý	51	90	2	ND	0,12
Tch6 (neuveдено)	F: GTTTCTTGGTGGTGGCTGAAGGTGTATG R: GCCATTTGAGAATGTTTCAGC	GT	Buřňák taiko	54	140	4	NS	0,07

Tabulka 5: Pokračování 3.

Lokus (GenBank - Accession no.)	Sekvence primerů (5' → 3')	Jednotka repetice	Zdrojový druh	T _a [°C]	ELFO [min]	Počet alel	HW	Nulové alely
Pacbel_00386 (neuvedeno)	F: GCATGTCTACAAACAAGCACG R: TCACTGGAAACCAGAGTAGGC	AC	Buřňák útlozobý	53	90	3	NS	0,05
Pacbel_07265 (neuvedeno)	F: CGTCACTTTAATAGCGCTGGC R: ACCCTGATTTTCCCAGTCCG	GT		59	90	2	NS	0,29
Pacbel_08988 (neuvedeno)	F: CTGATCGGTTGTGCTCTGTG R: GCGGAAAGATCCTAACAAGCC	CT		67	120	3	NS	-0,12
Pacbel_09021 (neuvedeno)	F: ATCTGCGCATGCAGTGATAG R: CACAGCTAGCAGCATTGACC	GT		61	165	4	NS	-0,00
Pacbel_09528 (neuvedeno)	F: AACTGTTTGCTCCACACCAC R: ATGGCTTGGAAGTCTCCCTG	AC		58	110	4	NS	-0,04
Pacbel_10033 (neuvedeno)	F: CAACGCGCTTTTGGTTTTGC R: GGCCACTCACCACAATACAAG	TG		54	90	2	NS	-0,06
Pacbel_17944 (neuvedeno)	F: TACAACCGTTCTCCCTGTGG R: GGAGAAGCAGGCAGCAATAC	TG		62	165	6	NS	0,09
Pacbel_17986 (neuvedeno)	F: ATAACCCAGTGTGATGGTGC R: CACAGCTGCTTAGTGACAG	GT		63	120	3	NS	0,00
Patbel3 (JF288777)	F: CCTTCCCTAGAGCAATGGAG R: TGCACACACTGAAAGAGGACA	CTAT		55	90	2	ND	-0,02
Calex-01 (AM072445– AM072447)	F: CTTCTCCATTGTTGTACCTCCAGT R: CTTGACTTGGCCTGAGGTTTAGGTT	GT/ GTGC	Kulík mořský	68	90	2	ND	-0,01
RBG29 (AY091853)	F: CCTAGCTTTTTGGACTCAGT R: GTGGTGTGCAATAGGATTC	GT	Racek novozélandský	59	90	8	NS	-0,04

Tabulka 5: Pokračování 4.

Lokus (GenBank - Accession no.)	Sekvence primerů (5' → 3')	Jedotka repetice	Zdrojový druh	T _a [°C]	ELFO [min]	Počet alel	HW	Nulové alely
Parm01 (EU360817)	F: CTGGACTCAGTGCCCTCTTC R: CAGGGCAGAAGCTCGTCTAT	CA	Buňák trinidadský	67	170	8	NS	-0,04

Δ – mikrosatelit se dvěma polymorfními oblastmi

^{1/2} – v PCR reakční směsi je 1/2 koncentrace MgCl₂, tedy výsledná koncentrace hořečnatých iontů je 0,8 nmol/l

^{2/3} – v PCR reakční směsi je 2/3 koncentrace MgCl₂, tedy výsledná koncentrace hořečnatých iontů je 1,06 nmol/l

^{3/4} – v PRC reakční směsi je 3/4 koncentrace MgCl₂, tedy výsledná koncentrace hořečnatých iontů je 1,2 nmol/l

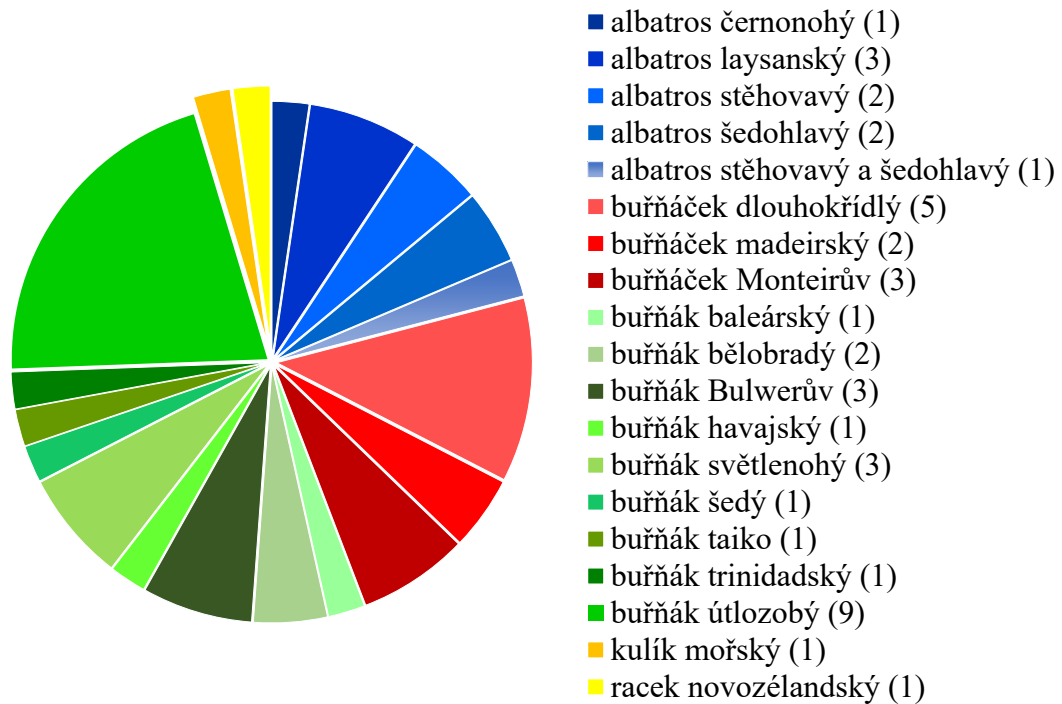
Šedě zvýrazněný lokus byl vyloučen z následné analýzy pomocí programu Cervus 3.0.6 (podrobnosti viz text).

V této diplomové práci jsem amplifikovala 64 párů primerů pro mikrosatelity, z nichž 62 pocházelo od zástupců z řádu trubkonosí a 2 od zástupců z řádu dlouhokřídlí. Z řádu trubkonosí bylo dosud navrženo celkem 207 párů primerů pro mikrosatelitové lokusy izolované od zástupců z čeledi albatrosovití, buňňáčkovití a buňňákovití. Všechny testovala Kůrová (2017) u 6 nepříbuzných jedinců plameňáka růžového na polymorfismus a detekovala 48 polymorfních mikrosatelitů. Tyto jsem charakterizovala v rámci této diplomové práce a určila jsem celkem 40 párů primerů s polymorfním produktem. Celková úspěšnost polymorfní amplifikace mikrosatelitů izolovaných z řádu trubkonosí u plameňáka růžového je 19,3 %. Úspěšnosti polymorfní amplifikace v rámci jednotlivých čeledí jsou následující. Z čeledi albatrosovití bylo dosud u plameňáka růžového amplifikováno 53 mikrosatelitových lokusů (Kůrová, 2017), z nichž jsem našla 9 polymorfních. Úspěšnost polymorfní amplifikace činí 16,9 %. Z čeledi buňňáčkovití bylo dosud u plameňáka růžového testováno 54 párů primerů pro mikrosatelity (Kůrová, 2017), z nichž 10 poskytlo polymorfní produkt (tato práce). Úspěšnost polymorfní amplifikace tedy činí 18,5 %. Z čeledi buňňákovití bylo u plameňáka růžového dosud testováno na polymorfismus 100 mikrosatelitových lokusů, z nichž 22 bylo polymorfních, a úspěšnost polymorfní amplifikace tedy je 22,0%. Největší počet detekovaných polymorfních *cross-species* lokusů u plameňáka růžového byl od buňňáčka útlozobého, a to 9 mikrosatelitových lokusů z 32 testovaných. Největší úspěšnost polymorfní amplifikace byla pomocí párů primerů pro mikrosatelity od albatrosa laysanského (*Phoebastria immutabilis*), kde ze 4 lokusů byly polymorfní 3, a tedy úspěšnost polymorfní amplifikace mikrosatelitových lokusů navržených pro tento ptačí druh byla u plameňáka růžového 75%. Otázkou ale zůstává, zda by tak vysoká úspěšnost polymorfní *cross-species* PCR amplifikace byla i v případě použití většího počtu mikrosatelitových lokusů izolovaných od albatrosa laysanského.

Dále jsem v rámci této diplomové práce amplifikovala 2 páry primerů pro mikrosatelity izolované od zástupců z řádu dlouhokřídlí, konkrétně lokus Calex-01 od kulíka mořského (*Charadrius alexandrius*) z čeledi kulíkovití (Küpper *et al.*, 2007) a lokus RBG29 od racka novozélandského (*Larus novaehollandiae scopulinus*) z čeledi rackovití (Given *et al.*, 2002). Oba tyto lokusy poskytly polymorfní produkt. U plameňáka růžového bylo zatím amplifikováno 7 *cross-species* mikrosatelitů z řádu dlouhokřídlí (Drobek, 2010; Kůrová, 2017), z nichž 3 jsou polymorfní. Úspěšnost polymorfní amplifikace činí 42,8 %. Jelikož byly vybrány jen ty páry primerů, u kterých již byl

zaznamenán polymorfismus u zástupců z řádu trubkonosí, bylo by vhodné provést testování polymorfismu s větším počtem párů primerů pro mikrosatelity z řádu dlouhokřídli.

Cross-species mikrosatelity, které byly polymorfní v této práci u 22 nepříbuzných jedinců plameňáka růžového, jsem rozdělila podle zdrojových řádů, čeledí a druhů a uvádím je v grafu 1.



Graf 1: Rozdělení 43 mikrosatelitů polymorfních u 22 nepříbuzných jedinců plameňáka růžového podle zdrojové čeledi (modrá albatrosovití, červená buřňáčkovití, zelená buřňákovití) a druhu (jednotlivé odstíny daných barev), od kterých byly mikrosatelity odvozeny. Žluté dílky přesahující okraje grafu znázorňují mikrosatelity odvozené od zástupců z řádu dlouhokřídli, ostatní barvy znázorňují mikrosatelity odvozené z řádu trubkonosí. V závorkách jsou uvedeny počty polymorfních lokusů od daného zdrojového druhu.

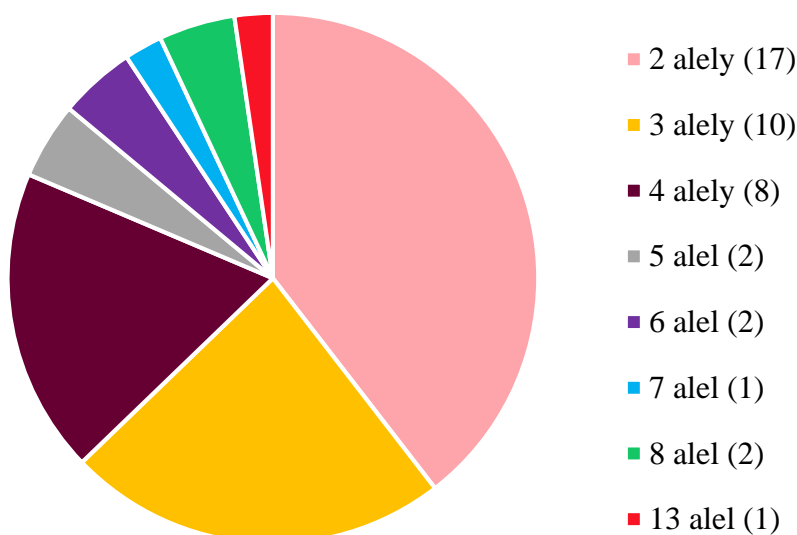
V této diplomové práci jsem popsala 44 polymorfních oblastí, které jsou amplifikovány pomocí 43 párů primerů. Pomocí programu Cervus 3.0.6 (Kalinowski *et al.*, 2007) jsem provedla statistické analýzy jednotlivých polymorfních lokusů. Hodnoty 2 lokusů (RBG29 a Parm01) byly totožné, což svědčí o tom, že se jedná o shodné lokusy. Jelikož Strejčková (2018) ve své práci již tyto lokusy označila za totožné pomocí programu BLASTN 2.8.0 (Altschul *et al.*, 1997), byla tato skutečnost očekávaná. To se poté potvrdilo i pomocí analýzy programem Genepop 4.1 (Rousset, 2008), kterým se zjišťuje přítomnost vazby lokusů. Bylo zjištěno, že lokusy Parm01 (od buřňáka

trinidatského) a RBG29 (od racka novozélandského) jsou totožné. Pro následnou analýzu pomocí programu Cervus 3.0.6 (Kalinowski *et al.*, 2007) a Genepop 4.1 (Rousset, 2008) jsem vybrala lokus RBG29, jelikož má nižší T_a , také kratší dobu elektroforetické separace a především je lépe hodnotitelný. Proto je vhodnější např. pro příbuzenské studie. Celkem jsem tedy získala 42 nezávislých párů primerů pro mikrosatelity, které poskytly 43 polymorfních oblastí. Nová statistická analýza nalezených 43 polymorfních lokusů, tedy již bez lokusu Parm01, byla opět provedena programem Cervus 3.0.6 (Kalinowski *et al.*, 2007), jejíž výstup uvádím v příloze 1. Průměrně bylo detekováno 3,581 alel na lokus s průměrnou očekávanou heterozygotností 0,5111. V případě použití těchto mikrosatelitových lokusů pro paternitní studie je pravděpodobnost chyby, kdy k mláděti přiřazuji 1 rodiče, $2,4 \cdot 10^{-4}$, v případě kdy přiřazuji druhého rodiče a jednoho už znám, je pravděpodobnost chyby $1,9 \cdot 10^{-7}$ a pravděpodobnost chyby při přiřazování rodičovského páru k mláděti je $5,423 \cdot 10^{-12}$. Dále pravděpodobnost, že by 2 náhodně vybraní jedinci v populaci měli na všech 43 lokusech stejnou alelovou konstituci, je $1,607 \cdot 10^{-24}$ a pravděpodobnost stejné alelové konstituce všech 43 lokusů u 2 sourozenců je $2,814 \cdot 10^{-11}$. Všechny 43 nalezených polymorfních mikrosatelitových lokusů nebylo charakterizováno pouze společně, ale také každý zvlášť. Pravděpodobnost výskytu nulových alel na lokus je v ideálním případě rovna nule, ale pro paternitní studie postačí pravděpodobnost 5–10%. Výrazná pravděpodobnost výskytu nulových lokusů se objevila ve 3 případech, a to 12% u lokusu Cd5 od buňáka šedého, 29% pravděpodobnost výskytu nulové alely byla u lokusu Pacbel_07265 od buňáka útlozobého a nejvyšší pravděpodobnost byla 83% u lokusu Ptero05 od buňáka havajského, kde se také jako u jediného lokusu ze všech 43 polymorfních mikrosatelitových lokusů vyskytovala odchylka od Hardy-Weinbergovy rovnováhy na hladině pravděpodobnosti 1%. Dalších 35 lokusů bylo v souladu s Hardy-Weinbergovou rovnováhou a u 7 lokusů nebylo možné soulad s Hardy-Weinbergovým zákonem spočítat.

Dále byly porovnávány na vazbu všechny polymorfní lokusy (127) ze všech prací, které byly dosud nalezeny a charakterizovány u plameňáka růžového v Laboratoři populační genetiky. Softwarem Genepop 4.1 (Rousset, 2008) byly nalezeny 3 lokusy ve vzájemné vazbě - konkrétně lokusy Sn2A-36 (Taylor *et al.*, 2010), Eru03 (Santos *et al.*, 2006) a BFAL4 (tato práce). U lokusů Eru03 a Sn2A-36 byla již dříve prokázána vazba na pohlaví (leží na chromozomu Z) (Chmelařová, 2012). Vzhledem k tomu, že jsou ve vazbě, musí na chromozomu Z ležet i lokus BFAL4. Lokusy, které sice leží pod hranicí

signifikance vazby lokusů, ale je u nich také možné, že leží na pohlavním chromozomu Z, jsou lokusy D29, OI10-39 a Pacbel_17986 (všechny viz tato práce). Proto by bylo potřeba provést s nimi další analýzy u většího počtu testovaných jedinců.

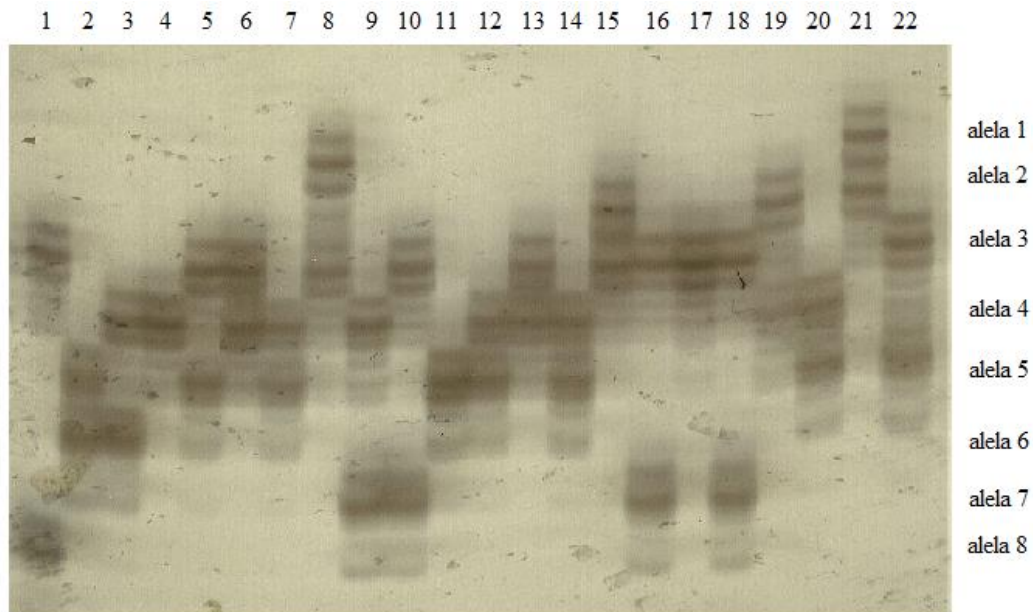
U 43 nezávislých polymorfních lokusů charakterizovaných u 22 nepříbuzných jedinců plameňáka růžového jsem detekovala od 2 do 13 alel. Nejčastěji se vyskytovaly 2 alely, a to u 17 lokusů. Dále jsem u 10 lokusů detekovala 3 alely, u 8 lokusů 4 alely, u 2 lokusů 5 alel, u dalších 2 lokusů jsem našla 6 alel, u 1 lokusu 7 alel, u 2 lokusů 8 alel a největší počet detekovaných alel, tj. 13 alel, se vyskytoval pouze u jednoho lokusu, a to u Ole02 od buňňáčka dlouhokřídlého. Jedním z kritérií vhodného mikrosatelitu pro paternitní studie je větší počet alel. Ze 43 mikrosatelitových lokusů, které jsem v této práci určila jako polymorfní, se vyskytuje 5 a více alel asi u 1/5 z nich. Všechny 43 nezávislých polymorfních mikrosatelitových lokusů jsem přehledně rozdělila podle počtu alel nalezených u 22 nepříbuzných jedinců plameňáka růžového (viz graf 2).



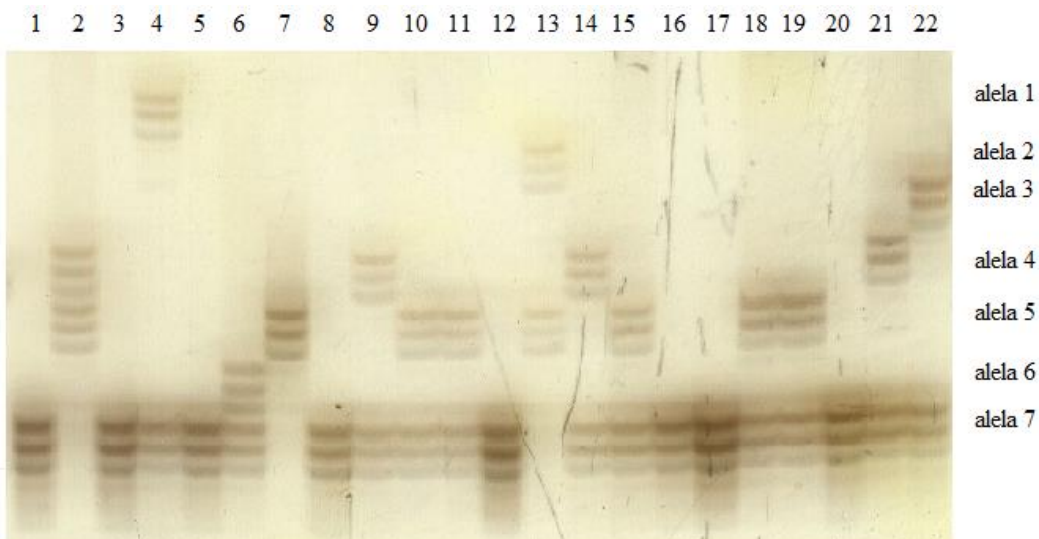
Graf 2: Rozdělení podle počtu alel 43 nezávislých polymorfních lokusů, které byly amplifikovány pomocí 42 párů primerů odvozených od zástupců z řádů trubkonosí a dlouhokřídlí a byly polymorfní u 22 nepříbuzných jedinců plameňáka růžového. V závorce je uveden počet mikrosatelitů, které měly daný počet alel.

Pro použitelnost mikrosatelitů pro populačně-genetické (a jiné) studie jsou důležité nejen parametry PCR amplifikace (T_a), ale také délka separace PCR produktů v gelu a rozlišitelnost jednotlivých alel po vyvolání gelu. Z tohoto důvodu uvádí na obrázcích 1 a 2 fotografie vybraných elektroforetogramů s dobře separovanými a kvalitně hodnotitelnými PCR produkty. Na obrázku 1 je polymorfní lokus Omn8, který byl původně navržen pro buňňáčka Monteirova a u 22 nepříbuzných jedinců plameňáka

růžového je přítomno 8 alel. Na obrázku 2 je polymorfní lokus LAAL10, který byl původně navržen pro albatrosa laysanského, a u tohoto mikrosatelitu jsem detekovala 7 alel u 22 nepříbuzných jedinců plameňáka růžového.



Obrázek 3: Elektroforetogram mikrosatelitového lokusu Omn8 polymorfního u 22 nepříbuzných jedinců plameňáka růžového. Bylo detekováno 8 alel, T_a byla 60 °C, délka elektroforetické separace byla 90 min. V každé dráze se vyskytuje DNA jiného jedince.



Obrázek 4: Elektroforetogram mikrosatelitového lokusu LAAL10 polymorfního u 22 nepříbuzných jedinců plameňáka růžového. Bylo detekováno 7 alel, T_a byla 62 °C a délka elektroforetické separace byla 90 min. V každé dráze se vyskytuje DNA jiného jedince.

Naopak mikrosatelity, které mají i po několikahodinové separaci špatně rozpoznatelné alely nebo dokonce musejí být jejich genotypy sestaveny ze 2 a více gelů (jako v případě lokusů Paequ7 a Ole02), tak ty nejsou úplně vhodné pro genetické studie.

6 Diskuse

V rámci této práce jsem se zabývala *cross-species* PCR amplifikací mikrosatelitů u 22 nepříbuzných jedinců plameňáka růžového (*Phoenicopterus roseus*) a následně jejich charakterizací. Experimentální část byla rozdělena na 2 úkoly a celkem jsem použila 64 párů primerů pro mikrosatelitové lokusy.

V prvním úkolu experimentální části jsem použila celkem 48 párů primerů, které Kůrová (2017) označila jako polymorfní u 6 nepříbuzných jedinců plameňáka růžového. Použila jsem 46 párů primerů pro mikrosatelity izolované od zástupců 3 čeledí z řádu trubkonosí a zbylé 2 páry primerů byly navrženy pro mikrosatelitové lokusy izolované od zástupců 2 čeledí z řádu dlouhokřídli. Polymorfismus jsem potvrdila u 40 párů primerů pro mikrosatelitové lokusy (ze 48 amplifikovaných), z nichž 38 bylo pro mikrosatelity z řádu trubkonosí a 2 pro mikrosatelity z řádu dlouhokřídli. Těchto 40 párů primerů poskytovalo celkem 41 polymorfních oblastí, jelikož jeden pár primerů, pro lokus Pc D3 (Hardesty *et al.*, 2012), poskytl 2 polymorfní oblasti. Pomocí programu Cervus 3.0.6 (Kalinowski *et al.*, 2007) jsem provedla statistickou charakterizaci polymorfních lokusů a zaznamenala stejné údaje u 2 lokusů, a to RBG29 (Given *et al.*, 2002) a Parm01 (Brown *et al.*, 2009). Následně jsem pomocí programu Genepop 4.1 (Rousset, 2008) hodnotila nezávislost markerů, kterou se potvrdilo, že lokusy RBG29 a Parm01 jsou shodné. Pro následující analýzy jsem ponechala lokus RBG29, jelikož měl nižší T_a , kratší dobu elektroforetické separace a byl lépe hodnotitelný. Celkem jsem našla v rámci této části 39 nezávislých *cross-species* mikrosatelitových markerů pro plameňáka růžového.

V rámci druhého úkolu experimentální části této práce jsem u 22 nepříbuzných jedinců plameňáka růžového retestovala 16 párů primerů pro mikrosatelitové lokusy izolované od 3 čeledí z řádu trubkonosí. Strejčková (2018) těchto 16 lokusů označila jako polymorfní u 30 nepříbuzných jedinců plameňáka karibského (*Phoenicopterus ruber*) a současně je Kůrová (2017) určila jako monomorfní u 6 nepříbuzných jedinců plameňáka růžového. Tyto dva druhy jsou blízce příbuzné, a je proto pravděpodobnost, že některý z 16 párů primerů Kůrová (2017) chybně označila jako monomorfní. Z 16 párů primerů pro mikrosatelity jsem určila 3 s polymorfním produktem u plameňáka růžového, konkrétně De3 (Burg, 1999), BFAL4 (Hernandez *et al.*, 2014) a Paequ7 (Techow *et al.*, 2004). Každý z těchto 3 polymorfních lokusů má pozorovanou heterozygotnost vyšší než 50 %, a proto je málo pravděpodobné, že při amplifikaci u 6

nepříbuzných jedinců (Kůrová, 2017) došlo k výběru pouze homozygotních jedinců pro daný lokus. Zpětně je nemožné dohledat, k jakému problému došlo, ale mohlo dojít k chybě při amplifikaci, k záměně párů primerů pro amplifikaci anebo k chybnému vyhodnocení.

Z celkem 64 testovaných párů primerů pro mikrosatelity jsem pomocí *cross-species* PCR amplifikace detekovala polymorfni lokus u 43 z nich. Těchto 43 párů primerů poskytovalo 44 polymorfni oblastí. U všech 44 polymorfni lokusů jsem sestavila genotyp u každého z 22 jedinců plameňáka růžového, provedla statistickou charakterizaci pomocí programu Cervus 3.0.6 (Kalinowski *et al.*, 2007) a programem Genepop 4.1 (Rousset, 2008) jsem analyzovala, jestli nejsou některé lokusy ve vazbě. Jak již bylo zmíněno, lokus Parm01 je shodný s lokusem RBG29 a kvůli lepším podmínkám PCR amplifikace a hodnocení jsem pro další analýzy použila pouze lokus RBG29. Celkem jsem tedy našla 42 párů primerů, které amplifikují 43 nezávislých polymorfni mikrosatelitových lokusů u plameňáka růžového. Výstup z programu Cervus 3.0.6 (Kalinowski *et al.*, 2007), kde jsou statisticky charakterizovány všechny nezávislé polymorfni lokusy (43), uvádím v příloze 1.

Z řádu trubkonosí bylo dosud u plameňáka růžového otestováno 207 párů primerů pro mikrosatelity izolované od 3 čeledí – albatrosovití (Diomedidae), buňáčkovití (Hydrobatidae) a buňákovití (Procellariidae).

Z čeledi albatrosovití bylo u plameňáka růžového dosud otestováno 53 párů primerů, z nichž bylo 9 polymorfni, konkrétně BFAL4 od albatrosa černonohého (*Phoebastria nigripes*), LAAL7, LAAL10 a LAAL19 od albatrosa laysanského (*P. immutabilis*), 12H8 a De3 od albatrosa stěhovavého (*Diomedea exulans*), Dc5 a Dc31 od albatrosa šedohlavého (*D. chrysostoma*) a D29 pro albatrosa šedohlavého i stěhovavého.

Hernandez *et al.* (2014) charakterizovali 15 mikrosatelitových lokusů u albatrosa černonohého, laysanského a bělohřbetého (*Phoebastria albatrus*). Celkem jsem z nich u 22 nepříbuzných jedinců plameňáka růžového určila 4 jako polymorfni (BFAL4, LAAL7, LAAL10 a LAAL9). Autoři u všech párů primerů použili T_a 60 °C a provedli multiplex PCR u 51 jedinců (konkrétně 36 jedinců albatrosa černonohého, 12 jedinců albatrosa laysanského a 3 jedinci albatrosa bělohřbetého). Hernandez *et al.* (2014) našli na lokusu BFAL4 u albatrosa černonohého 8 alel, 4 alely u albatrosa laysanského a 2 alely u albatrosa bělohřbetého. Já jsem u tohoto lokusu detekovala 2 alely při T_a 62 °C.

U lokusu LAAL7 autoři určili po 4 alelách u albatrosa černonohého a laysanského a 2 alely u albatrosa bělohřbetého. Já jsem taktéž u tohoto lokusu detekovala 4 alely při T_a 64 °C. U lokusu LAAL10 autoři detekovali 14 alel u albatrosa černonohého, 10 alel u albatrosa laysanského a 4 alely u albatrosa bělohřbetého. Já jsem u plameňáka růžového detekovala 7 alel při T_a 62 °C. Posledním polymorfním lokusem byl LAAL19, kde jsem detekovala 5 alel. Hernandez *et al.* (2014) u tohoto lokusu našli 4 alely u albatrosa černonohého, 6 alel u albatrosa laysanského a 4 alely u albatrosa bělohřbetého.

U albatrosa stěhovavého Dubois *et al.* (2005) popsali 10 mikrosatelitových markerů, jejichž variabilitu testovali u 3 populací (každá po 20 jedincích). Autoři u lokusu 12H8 použili T_a 58 °C a detekovali 5 alel. Já jsem při amplifikaci párů primerů pro tento lokus našla u 22 nepříbuzných jedinců plameňáka růžového 2 alely při T_a 63 °C. Páry primerů pro lokus 12H8 amplifikovali u 340 jedinců buňňáka trinidadského Brown *et Jordan* (2009). Při této *cross-species* PCR amplifikaci našli 4 alely a použili T_a 55 °C. Také u albatrosa černonohého byl lokus 12H8 polymorfní a autoři detekovali 2 alely (Ando *et al.*, 2014).

Burg (1999) ve svém článku charakterizovala 26 mikrosatelitových lokusů izolovaných od albatrosa šedohlavého a stěhovavého. Provedla *cross-species* PCR amplifikaci párů primerů pro tyto nalezené lokusy u 50 jedinců albatrosa šedohlavého, 50 jedinců albatrosa černobrvého a 90 jedinců albatrosa stěhovavého. Jako T_a použila 2 různé teploty (1. teplota 7 cyklů, zbylých 25 cyklů 2. teplota). Pro lokus De3 byla první použita T_a 50 °C a druhá T_a byla 54 °C. U albatrosa černobrvého a stěhovavého detekovala 3 alely a u albatrosa šedohlavého 4 alely. Já jsem při amplifikaci párů primerů pro tento lokus u plameňáka růžového detekovala 2 alely při T_a 50 °C. Pro lokus Dc5 autorka použila jako první T_a 46 °C a jako druhou T_a použila 48 °C. U albatrosa černobrvého a stěhovavého detekovala 5 alel a u albatrosa šedohlavého 4 alely. Já jsem u tohoto lokusu detekovala 3 alely při T_a 63 °C. Další lokus byl Dc31, při jehož amplifikaci Burg (1999) použila T_a 48 °C a 52 °C, a tento lokus byl monomorfní u všech 3 testovaných druhů albatrosů. Já jsem u tohoto lokusu detekovala 2 alely u plameňáka růžového a T_a jsem použila 64 °C. Posledním lokusem byl D29, u kterého Burg (1999) použila T_a 48 °C a 52 °C, a detekovala 2 alely pouze u albatrosa šedohlavého. Stejně tak u plameňáka růžového jsem detekovala pouze 2 alely při T_a 56 °C.

Z čeledi buňňáčkovití bylo u plameňáka růžového dosud testováno 54 párů primerů pro mikrosatelity, z nichž jsem našla 10 polymorfních. Jednalo se o lokusy Ole02, Ole09, Ole17, Ole21 a OI10-39 od buňňáčka dlouhokřídlého (*Oceanodroma leucorhoa*), Oc28B a Oc49 od buňňáčka madeirského (*O. castro*) a Omn1, Omn8 a Omn21 od buňňáčka Monteirova (*O. monteiroi*).

Bicknell *et al.* (2011) popsali u buňňáčka dlouhokřídlého 26 mikrosatelitových lokusů. U všech lokusů použili T_a 60 °C. Lokus Ole02 autoři amplifikovali u 17 jedinců a našli 12 alel. Já jsem u plameňáka růžového našla 13 alel při T_a 70 °C. Variabilitu lokusu Ole09 autoři testovali u 24 jedinců a našli u nich 2 alely. Já jsem při *cross-species* PCR amplifikaci tohoto lokusu našla alel 5 při T_a 59 °C. Lokus Ole17 autoři testovali u 24 jedinců, u kterých detekovali 5 alel. Já jsem detekovala 2 alely u plameňáka růžového při T_a 62 °C. Lokus Ole21 amplifikovali u 24 jedinců a detekovali 21 alel. Já jsem u tohoto lokusu našla 4 alely při T_a 55 °C.

Sun *et al.* (2009) charakterizovali 9 mikrosatelitových lokusů od buňňáčka madeirského a 1 lokus od buňňáčka dlouhokřídlého. Variabilitu testovali na DNA 27 jedinců buňňáčka madeirského, 22 jedinců buňňáčka Monteirova a 24 jedinců buňňáčka dlouhokřídlého. Právě 1 nalezený lokus od buňňáčka dlouhokřídlého, OI10-39, jsem určila jako polymorfní u plameňáka růžového se 3 alelami při T_a 60 °C. Sun *et al.* (2009) u tohoto lokusu detekovali po 8 alelách u buňňáčka madeirského a Monteirova a 3 alely detekovali u buňňáčka dlouhokřídlého. U lokusu Oc28B autoři detekovali po 3 alelách u buňňáčka madeirského a Monteirova a u buňňáčka dlouhokřídlého tento lokus určili jako monomorfní. Posledním lokusem je Oc49, u kterého jsem při T_a 61 °C určila 6 alel u plameňáka růžového, zatímco autoři detekovali po 3 alelách u buňňáčka Monteirova a dlouhokřídlého a u buňňáčka madeirského tento lokus byl monomorfní.

U buňňáčka Monteirova Bried *et al.* (2012) popsali 18 polymorfních mikrosatelitů, které dále testovali u 3 dalších druhů z řádu trubkonosí. Nejúspěšnější *cross-species* PCR amplifikace byla u buňňáčka madeirského, což autoři vysvětlují tím, že je ze všech *cross-species* testovaných druhů nejbližší příbuzný buňňáčkovití Monteirovu. Pro testování variability lokusů použili DNA 125 jedinců buňňáčka Monteirova a amplifikaci prováděli při T_a 58 °C. U lokusu Omn1 jsem detekovala 3 alely u plameňáka růžového, T_a byla 56 °C. Autoři u tohoto lokusu detekovali 8 alel. Dalším lokusem je Omn8, u kterého Bried *et al.* (2012) našli 10 alel a já jsem u plameňáka růžového našla 8 alel při

T_a 60 °C. U lokusu Omn21 autoři detekovali 6 alel, zatímco já pouze 2 alely, T_a byla 54 °C.

Z čeledi buňňákovití bylo dosud u plameňáka růžového testováno 100 párů primerů pro mikrosatelity. Celkem jsem našla 22 polymorfních mikrosatelitů, konkrétně Puff G2F od buňňáka baleárského (*Puffinus mauretanicus*), Paequ3 a Paequ7 od buňňáka bělobradého (*Procellaria aequinoctialis*), Bb20, Bb22 a Bb25 od buňňáka Bulwerova (*Bulweria bulwerii*), od buňňáka havajského (*Pterodroma sandwichensis*) lokus Ptero05, Lokusy Pc B109, Pc D3 a Pc D103 od buňňáka světlenohého (*Puffinus carneipes*), Cd5 od buňňáka šedého (*Calonectris diomedea*), Tch6 od buňňáka taiko (*Pterodroma magentae*), od buňňáka trinidadského (*P. arminjoniana*) lokus Parm01 a od buňňáka útlozobého (*Pachyptila belcherii*) lokusy Pacbel_00386, Pacbel_07265, Pacbel_08988, Pacbel_09021, Pacbel_09528, Pacbel_10033, Pacbel_17944, Pacbel_17986 a Patbel3.

Gonzalez *et al.* (2009) u buňňáka baleárského našli 10 mikrosatelitových markerů, z nichž jsem pouze u 1, Puff G2F, detekovala polymorfismus u plameňáka růžového, kde jsem u 22 jedinců našla 3 alely při T_a 57 °C. Autoři tento lokus amplifikovali u 51 jedinců a detekovali 2 alely při T_a 60 °C. Gonzalez *et al.* (2009) také ve svém článku popisují *cross-species* PCR amplifikaci těchto 10 lokusů u 23 jedinců buňňáka středomořského, kde právě zmíněný lokus Puff G2F byl jako jediný monomorfní.

U buňňáka bělobradého Techow *et O’Ryan* (2004) charakterizovali 6 polymorfních mikrosatelitových lokusů. U lokusu Paequ3 autoři použili T_a 55 °C a detekovali 9 alel při amplifikaci u 93 jedinců. Já jsem pro tento lokus u plameňáka růžového našla 3 alely a finální T_a jsem stanovila na 65 °C. Páry primerů pro lokus Paequ3 testovala i Lawrence (2008), která provedla *cross-species* PCR amplifikaci u 143 jedinců buňňáka taiko a detekovala 9 alel (T_a 55 °C). Dále lokus Paequ3 použili pro *cross-species* PCR amplifikaci u buňňáka trinidadského (340 jedinců) Brown *et Jordan* (2009), kteří detekovali 5 alel a jako T_a použili 55 °C. Další autoři, kteří testovali *cross-species* PCR amplifikaci párů primerů pro lokus Paequ3, byli Welch *et Fleischer* (2011). Autoři použili DNA 15 jedinců buňňáka havajského a detekovali 5 alel při T_a 53 °C.

Pro lokus Paequ7 Techow *et O’Ryan* (2004) použili T_a 64 °C a našli 5 alel při amplifikaci u 94 jedinců buňáka bělobradého. Já jsem našla 4 alely při T_a 59 °C u 22 jedinců plameňáka růžového.

Celkem 11 mikrosatelitových markerů pro buňáka Bulwerova charakterizovali Andris *et al.* (2010) (Andris *et al.*, 2012). Variabilitu nalezených lokusů testovali u 91 jedinců a jako T_a použili 58 °C. Páry primerů také autoři použili pro *cross-species* PCR amplifikaci u 3 dalších druhů z řádu trubkonosí (buňák bělobradý, buňák modravý a buňáček Monteirova) a z každého druhu testovali DNA 5 jedinců. U lokusu Bb20 Andris *et al.* (2010) (Andris *et al.*, 2012) našli 7 alel u buňáka Bulwerova, já jsem u plameňáka růžového našla při amplifikaci tohoto lokusu 2 alely a jako T_a jsem použila 50 °C. Také tento lokus, Bb20, Andris *et al.* (2010) (Andris *et al.*, 2012) označili jako monomorfní u buňáka bělobradého, a současně jako polymorfní u buňáka modravého a buňáčka Monteirova. U lokusu Bb22 jsem u plameňáka růžového našla 2 alely při T_a 58 °C, což je shodné s výsledky autorů pro amplifikaci tohoto lokusu u buňáka Bulwerova. Navíc je dle Andris *et al.* (2010) (Andris *et al.*, 2012) lokus Bb22 polymorfní u všech 3 druhů testovaných pomocí *cross-species* PCR amplifikace. Lokus Bb25 měl dle autorů 6 alel, já jsem použila stejnou T_a jako autoři a detekovala jsem 4 alely u plameňáka růžového. Při *cross-species* PCR amplifikaci byl lokus Bb25 polymorfní u buňáka bělobradého a modravého a monomorfní u buňáčka Monteirova.

Welch *et Fleischer* (2011) popsali 10 polymorfních mikrosatelitových lokusů u buňáka havajského. Z tohoto počtu nalezených lokusů jsem detekovala u plameňáka růžového pouze 1 polymorfní lokus, a to Ptero05, u kterého jsem detekovala 2 alely při T_a 64 °C. Autoři u tohoto lokusu detekovali 3 alely při T_a 53 °C.

U buňáka světlenohého Hardesty *et al.* (2012) našli 11 polymorfních mikrosatelitů, jejichž variabilitu testovali u 84 jedinců. U lokusu Pc B109 autoři použili T_a 57 °C a detekovali 5 alel, já jsem při amplifikaci tohoto lokusu u plameňáka růžového našla 3 alely a jako T_a jsem použila 64 °C. Další polymorfní lokus u plameňáka růžového popsáný ve studii Hardesty *et al.* (2012) byl Pc D103, u kterého jsem našla 2 alely a autoři článku detekovali 6 alel. T_a jsme použili stejnou, a to 58 °C. U lokusu Pc D3 autoři použili T_a 56 °C a detekovali 6 alel u buňáka světlenohého. Já jsem při amplifikaci tohoto lokusu u plameňáka růžového detekovala 2 polymorfní oblasti a u každé se vyskytovaly 2 alely. Jako T_a jsem použila 48 °C.

Bried *et al.* (2008) charakterizovali 11 polymorfních lokusů u buřňáka šedého. Při amplifikaci párů primerů pro lokus Cd5 u 43 jedinců buřňáka šedého autoři použili T_a 58 °C a detekovali 6 alel. Já jsem u tohoto lokusu při amplifikaci u plameňáka růžového našla 2 alely a jako T_a jsem použila 51 °C. Navíc autoři provedli *cross-species* PCR amplifikaci 11 nalezených lokusů u 3 dalších druhů z řádu trubkonosí (albatrosa stěhovavého, buřňáka bělobradého a buřňáka Bulwerova) s využitím DNA vždy od 6 jedinců daného druhu a u lokusu Cd5 se povedla amplifikace pouze u buřňáka bělobradého, kde tento lokus byl monomorfní.

Od buřňáka taiko Lawrence (2008) izolovala 2 polymorfní mikrosatelitové lokusy. Jedním z nich byl lokus Tch6, který jsem určila jako polymorfní i u plameňáka růžového se 4 alelami a jako T_a jsem použila 54 °C. Autorka pro amplifikaci tohoto lokusu u 143 jedinců buřňáka taiko použila T_a 57 °C a detekovala 2 alely.

Brown *et Jordan* (2009) charakterizovali 6 mikrosatelitových lokusů u buřňáka trinidadského, z nichž jsem 1 lokus, Parm01, určila jako polymorfní u plameňáka růžového, kde jsem detekovala 8 alel při T_a 67 °C. Autoři článku lokus amplifikovali u 340 jedinců buřňáka trinidadského, detekovali 10 alel a jako T_a použili 55 °C. Dále lokus Parm01 použili Brown *et Jordan* (2009) pro *cross-species* PCR amplifikaci u 17 druhů trubkonosých a 1 druhu tučňáka. U 12 druhů trubkonosých, ze 17 testovaných, byl lokus polymorfní s počty alel od 2 do 9, u 1 druhu tučňáka byl tento lokus polymorfní se 7 alelami. Páry primerů pro lokus Parm01 Welch *et Fleischer* (2011) modifikovali, aby amplifikovaly kratší fragmenty, a následně testovali na polymorfismus pomocí *cross-species* PCR amplifikace u 15 jedinců buřňáka havajského. Autoři detekovali 13 alel a jako T_a použili 53 °C. Jak už bylo zmíněno výše, lokus Parm01 dle výsledků Cervus 3.0.6 (Kalinowski *et al.*, 2007) a Genepop 4.1 (Rousset, 2008) je shodný s lokusem RBG29, který byl izolován od racka novozélandského. Stejně tak i Welch *et Fleischer* (2011) ve svém článku zmiňují, že jsou lokusy Parm01 a RBG29 ve vazbě.

U buřňáka útlozobého bylo ve 2 pracích charakterizováno celkem 32 párů primerů pro mikrosatelitové lokusy. První prací byla Quillfeldt *et al.* (2012), kde autoři popisují nalezení 7 párů primerů pro mikrosatelity izolované od buřňáka útlozobého. U plameňáka růžového se mi podařilo amplifikovat polymorfní produkt pouze pomocí párů primerů pro lokus Patbel3. Našla jsem 2 alely a použila jsem T_a 55 °C. Autoři testovali variabilitu lokusu Patbel3 u 68 jedinců buřňáka útlozobého a detekovali 10 alel. Druhou prací zabývající se izolací mikrosatelitových lokusů u buřňáka útlozobého byla práce

Moodley *et al.* (2015), kteří izolovali a charakterizovali 25 mikrosatelitových lokusů. U 22 jedinců plameňáka růžového z nich bylo 8 polymorfních. U lokusu Pacbel_00386 jsem detekovala 3 alely (T_a 53 °C), zatímco autoři detekovali 11 alel (T_a 56 °C). U dalšího lokusu Pacbel_07265 jsem detekovala 2 alely (T_a 59 °C) a autoři našli 15 alel (T_a 56 °C). U lokusu Pacbel_08988 jsem detekovala 2 alely (T_a 67 °C) a autoři detekovali 10 alel (T_a 56 °C). U lokusu Pacbel_09021 autoři našli 17 alel (T_a 56 °C) a já jsem našla alely 4 (T_a 61 °C). Lokus Pacbel_09528 měl u plameňáka růžového 4 alely (T_a 58 °C) a u buřňáka útlozobého měl 9 alel (T_a 56 °C). Lokus Pacbel_10033 měl u plameňáka růžového pouze 2 alely (T_a 54 °C) a u buřňáka útlozobého měl 9 alel. U lokusu Pacbel_17944 autoři detekovali 12 alel (T_a 56 °C), já jsem detekovala 6 alel (T_a 62 °C). Poslední polymorfní lokus u plameňáka růžového popsán Moodley *et al.* (2015) byl Pacbel_17986, u kterého jsem detekovala 3 alely (T_a 63 °C) a autoři u tohoto lokusu našli 5 alel (T_a 56 °C).

Z řádu dlouhokřídlí (Charadriiformes) bylo u plameňáka růžového dosud testováno 7 párů primerů pro mikrosatelity. Drobek (2010) ve své diplomové práci u jednoho z nich, konkrétně Apy06 (Dawson *et al.*, 2005), detekoval polymorfismus u plameňáka růžového a našel 5 alel. Další polymorfní *cross-species* lokusy u plameňáka růžového z řádu dlouhokřídlí jsem detekovala v rámci této práce, konkrétně se jedná o lokus Calex-01 od kulíka mořského (*Charadrius alexandrius*) z čeledi kulíkovití (Charadriidae) a lokus RBG29 od racka novozélandského (*Larus novaehollandiae*) z čeledi rackovití (Laridae). Jelikož je úspěšnost polymorfní amplifikace pomocí mikrosatelitových lokusů izolovaných z řádu dlouhokřídlí vysoká u plameňáka růžového (42,8 %), bylo by vhodné otestovat na polymorfismus větší soubor mikrosatelitů. Je však velmi pravděpodobné, že úspěšnost polymorfní amplifikace nebude takto vysoká, jelikož již testované mikrosatelity z řádu dlouhokřídlí (7) nebyly vybrány náhodně, ale byly určeny ty, u kterých byl detekován polymorfismus při *cross-species* PCR amplifikaci u zástupců z řádu trubkonosí (viz níže v textu).

Küpper *et al.* (2007) charakterizovali 36 polymorfních mikrosatelitových lokusů u kulíka mořského. U plameňáka růžového jsem detekovala jen lokus Calex-01 jako polymorfní, u něhož jsem našla 2 alely a jako T_a jsem použila 59 °C. Autoři našli u tohoto lokusu 10 alel a jako T_a měli 62 °C. Páry primerů pro lokus Calex-01 testovali

Brown *et al.* (2009) pomocí *cross-species* PCR amplifikace u 340 jedinců buňňáka trinidadského, kde se jim podařilo detekovat 4 alely (T_a 55 °C).

Od racka novozélandského bylo izolováno 7 mikrosatelitových lokusů (Given *et al.*, 2002), z nichž pouze lokus RBG29 byl polymorfní u plameňáka růžového. Detekovala jsem u něj 8 alel a T_a byla 59 °C, zatímco autoři u racka novozélandského našli 5 alel a T_a použili 50 °C. Given *et al.* (2002) tento lokus použili pro *cross-species* PCR amplifikaci u 10 dalších příbuzných druhů a pouze u 1 druhu, tenkozobce hnědohlavého (*Recurvirostra novaehollandiae*), byl lokus RBG29 monomorfní a u zbylých druhů detekovali 2–9 alel. Dále Lawrence (2008) provedla *cross-species* PCR amplifikaci párů primerů pro lokus RBG29 u buňňáka taiko a detekovala 5 alel (T_a 55 °C). U 15 jedinců buňňáka havajského provedli Welch *et al.* (2011) *cross-species* PCR amplifikaci lokusu RBG29 a při T_a 53 °C detekovali 14 alel. Dále také tito autoři uvádějí, že lokus RBG29 je ve vazbě s lokusem Parm01, izolovaným od buňňáka trinidadského (Brown *et al.*, 2009), což ve své práci potvrdila i Strejčková (2018), která sekvence porovnávala pomocí programu BLASTN 2.8.0 (Altschul *et al.*, 1997). Ke stejnému závěru, že jsou lokusy shodné, jsem přišla i já při analýze lokusů programem Cervus 4.1 (Rousset, 2008).

V Laboratoři populační genetiky na Katedře buněčné biologie a genetiky PřF UPOL bylo dosud testováno 213 párů primerů pro mikrosatelity, z nichž 207 párů primerů je pro mikrosatelity z řádu trubkonosí, 5 pro mikrosatelity z řádu dlouhokřídlí a 1 z řádu pěvci, u 6 druhů ptáků z kladu Aequirornithes. Dosud byly provedeny charakterizace polymorfních mikrosatelitů z řádu trubkonosí a několika z řádu dlouhokřídlí u plameňáka růžového (tato práce), plameňáka karibského (Strejčková, 2018) a potápky roháče (Janušová, 2017). Testování na polymorfismus u 6 nepříbuzných jedinců bylo provedeno u nesya indomalajského (Nedvěďová, 2015), pelikána afrického (Kopečná, 2018) a pelikána kadeřavého (Verešová, 2018). U těchto 3 prací je ještě potřeba provést genotypizaci na větším počtu jedinců a charakterizaci.

Janušová (2017) ve své diplomové práci, kromě jiných mikrosatelitů, charakterizovala i mikrosatelitové lokusy původně navržené pro zástupce z řádu trubkonosí a dlouhokřídlí, které v rámci bakalářské práce (Janušová, 2015) označila za polymorfní u 6 nepříbuzných jedinců potápky roháče (*Podiceps cristatus*). Autorka prováděla *cross-species* PCR amplifikaci vybraných 20 mikrosatelitových lokusů u 13 nepříbuzných jedinců potápky roháče, ze kterých charakterizovala celkem 17

polymorfních mikrosatelitových lokusů z řádu trubkonosí, konkrétně 10 z čeledi buňňákovití, 4 z čeledi albatrosovití a 3 z čeledi buňňáčkovití. Janušová (2017) u 17 polymorfních lokusů našla od 2 do 12 alel. Srovnáním polymorfních mikrosatelitů nalezených u plameňáka růžového a potápky roháče jsem našla 9 mikrosatelitů, které jsou polymorfní současně pro oba druhy (viz tabulka 6).

Nedvěďová (2015) provedla *cross-species* PCR amplifikaci s 212 páry primerů pro mikrosatelity z řádu trubkonosí, dlouhokřídli a pěvci (kromě páru primerů pro lokus RBG18M (Welch *et* Fleischer, 2011)) u 6 nepříbuzných jedinců nesyta indomalajského (*Mycteria leucocephala*). Autorka našla 46 polymorfních mikrosatelitů, ale také zjistila, že dva lokusy, lokus De3 a De18, jsou totožné, tedy detekovala 45 nezávislých polymorfních mikrosatelitů u nesyta indomalajského. Od čeledi albatrosovití pocházelo 9 polymorfních mikrosatelitů, 26 od čeledi buňňákovití, 9 od čeledi buňňáčkovití a 2 z řádu dlouhokřídli. U nalezených polymorfních mikrosatelitů autorka detekovala od 2 do 5 alel. Ze všech polymorfních mikrosatelitů nalezených u plameňáka růžového a nesyta indomalajského je 18 mikrosatelitů polymorfních u obou druhů. Srovnání nalezených polymorfních lokusů uvádím v tabulce 6.

U 30 nepříbuzných jedinců plameňáka karibského (*Phoenicopterus ruber*) Strejčková (2018) charakterizovala mikrosatelitové lokusy z řádu trubkonosí a dlouhokřídli, které ve své bakalářské práci (Strejčková, 2016) označila jako polymorfní. Testovala celkem 50 párů primerů pomocí *cross-species* PCR amplifikace, ze kterých určila 45 jako polymorfních. Následnou analýzou našla shodu 2 lokusů, a to lokusu Parm01 a RBG29, a stejně jako v této práci, pro následující analýzy použila pouze lokus RBG29. Autorka tedy našla 44 nezávislých polymorfních markerů pro plameňáka karibského, ze kterých 8 pochází od čeledi albatrosovití, 23 z čeledi buňňákovití, 12 z čeledi buňňáčkovití a 1 z řádu dlouhokřídli. Strejčková (2018) detekovala u polymorfních lokusů od 2 do 11 alel. Při srovnání detekovaných polymorfních mikrosatelitů u plameňák růžového a karibského jsem našla 31 mikrosatelitů, které jsou polymorfní současně u obou druhů. Přehled uvádím v tabulce 6.

Kopečná (2018) testovala všech 213 *cross-species* párů primerů pro mikrosatelity z řádu trubkonosí, dlouhokřídli a pěvci u 6 nepříbuzných jedinců pelikána afrického (*Pelecanus rufescens*). Autorka našla 24 polymorfních mikrosatelitů s počtem alel 2–3. Z 24 polymorfních mikrosatelitů 5 pocházelo od zástupců z čeledi albatrosovití, 6 z čeledi

buňňáčkovití a 13 z čeledi buňňáčkovití. U pelikána afrického jsem při srovnání našla 12 mikrosatelitů, které jsou také polymorfni u plameňáka růžového (viz tabulka 6).

Všech 213 párů primerů navržených pro mikrosatelity z řádu trubkonosí, dlouhokřídli a pěvci testovala u 6 nepříbuzných jedinců pelikána kadeřavého (*Pelecanus crispus*) Verešová (2018). Autorka našla 12 párů primerů, které amplifikují polymorfni produkt, z nichž 1 pocházel z řádu dlouhokřídli, 4 z čeledi buňňáčkovití, 5 z čeledi albatrosovití a 2 z čeledi buňňáčkovití. Verešová (2018) u nalezených polymorfni lokusů detekovala od 2 do 3 alel. Autorka také detekovala 1 pár primerů, který poskytl 2 polymorfni oblasti (obě se 2 alelami), konkrétně pár primerů pro lokus Dc19 od albatrosa šedohlavého čeledi albatrosovití řád trubkonosí. Celkem tedy autorka našla 13 polymorfni lokusů amplifikovaných pomocí 12 párů primerů. U pelikána kadeřavého a současně u plameňáka růžového jsou polymorfni 4 mikrosatelity.

Tabulka 6: Přehled polymorfni mikrosatelitů izolovaných od zástupců z řádu trubkonosí, které pomocí *cross-species* PCR amplifikace byly polymorfni u 22 nepříbuzných jedinců plameňáka růžového (PIR) (tato práce) a současně u 30 nepříbuzných jedinců plameňáka karibského (PIK) (Strejčková, 2018), 13 nepříbuzných jedinců potápky roháče (PoR) (Janušová, 2017), 6 nepříbuzných jedinců nesyta indomalajského (NeI) (Nedvěďová, 2015), 6 nepříbuzných jedinců pelikána afrického (PeA) (Kopečná, 2018) nebo 6 nepříbuzných jedinců pelikána kadeřavého (PeK) (Verešová, 2018). V tabulce jsou uvedeny počty nalezených alel (A) u jednotlivých lokusů amplifikovaných u konkrétního druhu, popř. je lokus monomorfni (M).

Lokus	Zdrojový druh	PIR (A)	PIK (A)	PoR (A)	NeI (A)	PeA (A)	PeK (A)
BFAL4	Albatros černonohý	2	2	M	2	2	2
LAAL7	Albatros laysanský	4	6	M	M	2	2
LAAL19		5	6	M	M	M	M
12H8	Albatros stěhovavý	2	M	M	2	M	M
De3		2	4	M	4	M	M
Dc5	Albatros šedohlavý	3	2	4	M	M	M
Dc31		2	4	M	M	M	2
Ole02	Buňňáček dlouhokřídli	13	11	M	M	M	M
Ole09		5	5	M	3	M	M
Ole21		4	M	M	M	2	M
Oli10-39		3	3	8	M	M	M
Oc28B	Buňňáček madeirský	4	3	M	M	M	M
Oc49		6	3	2	M	M	M
Omn1	Buňňáček Monteirův	3	5	M	M	M	M
Omn8		8	7	9	4	3	M
Omn21		2	3	M	2	M	M

Tabulka 6: Pokračování.

Lokus	Zdrojový druh	PIR (A)	PIK (A)	PoR (A)	NeI (A)	PeA (A)	PeK (A)
Puff G2F	Buřňák baleárský	3	3	M	2	M	M
Paequ3	Buřňák bělobradý	3	3	M	2	3	M
Paequ7		4	3	M	2	M	M
Bb22	Buřňák Bulwerův	2	2	M	2	M	M
Bb25		4	3	M	M	2	M
Ptero05	Buřňák havajský	2	2	M	M	M	M
Pc B109	Buřňák světlenohý	3	4	12	M	M	M
Pc D3		2 + 2	M	3	2	M	M
Pc D103		2	3	2	2	2	M
Cd5	Buřňák šedý	2	2	M	M	2	M
Tch6	Buřňák taiko	4	M	4	3	M	M
Parm01	Buřňák trinidatský	8	7	M	3	M	M
Pacbel_00386	Buřňák útlozobý	3	5	M	M	2	M
Pacbel_07265		2	3	M	2	M	M
Pacbel_08988		3	3	M	M	2	M
Pacbel_09021		4	3	M	2	M	M
Pacbel_09528		4	3	M	M	M	M
Pacbel_10033		2	2	M	M	2	M
Pacbel_17944		6	4	M	M	M	M
Pacbel_17986		3	M	2	M	M	M
Patbel3		2	M	M	M	3	M
Calex-01		Kulík mořský	2	M	M	2	M
RBG29	Racek novozélandský	8	7	M	4	M	M

Z 213 testovaných mikrosatelitových lokusů z řádu trubkonosí, dlouhokřídli a pěvci bylo u 22 nepříbuzných jedinců plameňáka růžového polymorfních 43 mikrosatelitových lokusů amplifikovaných pomocí 42 párů primerů. Při srovnání těchto polymorfních lokusů s těmi, které byly nalezeny jako polymorfní u dalších 5 druhů z řádu Aequorlornithes, konkrétně u 30 nepříbuzných jedinců plameňáka karibského, 13 nepříbuzných jedinců potápky roháče, 6 nepříbuzných jedinců nesyta indomalajského, 6 nepříbuzných jedinců pelikána afrického a 6 nepříbuzných jedinců pelikána kadeřavého, nebyl ani 1 mikrosatelitový lokus polymorfní současně pro všech 6 testovaných druhů. Tři lokusy však vykazovaly polymorfismus alespoň u 5 z 6 testovaných druhů ptáků (v tabulce 6 označeny žlutě). Konkrétně se jedná o lokus BFAL4 izolovaný od albatrosa černonohého (Hernandez *et al.*, 2014), dále lokus Omn8 izolovaný od buřňáčka Monteirova (Bried *et al.*, 2012) a lokus Pc D103 izolovaný od buřňáka světlenohého

(Hardesty *et al.*, 2013). Lokus BFAL4 byl monomorfní pouze u potápky roháče a u zbylých 5 testovaných druhů ptáků z řádu *Aequorlornithes* byl polymorfní a byly vždy detekovány 2 alely. Lokus Omn8 byl monomorfní pouze u pelikána kadeřavého, u ostatních 5 druhů ptáků bylo detekováno od 3 do 9 alel. Dále byl tento lokus amplifikován pomocí *cross-species* PCR amplifikace u buřňáčka madeirského, kde Bried *et al.* (2012) detekovali 6 alel. Lokus Pc D103 též nebyl polymorfní pouze u pelikána kadeřavého. Jako u jediného druhu, plameňáka karibského, byly detekovány 3 alely a u zbývajících druhů bylo nalezeno po 2 alelách,

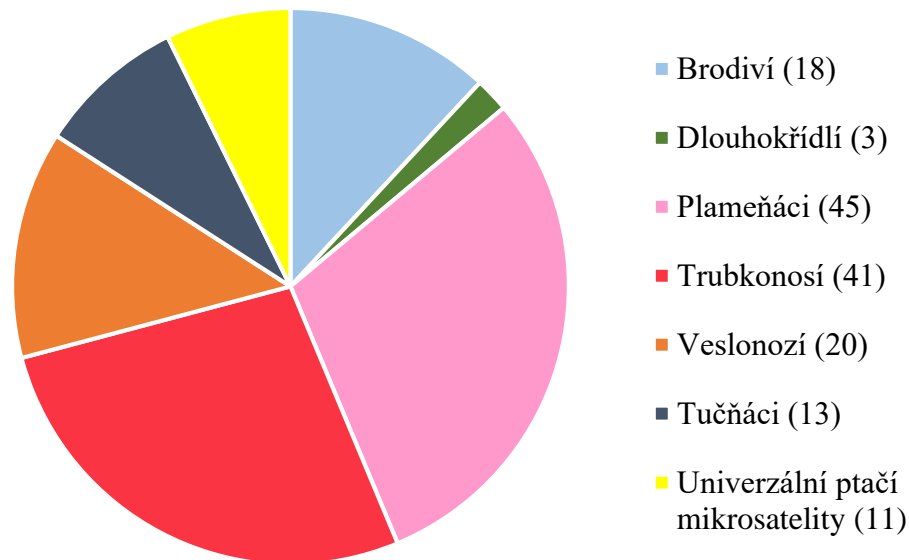
Další 2 mikrosatelitové lokusy, LAAL7 od albatrosa laysanského (Hernandez *et al.*, 2014) a Paequ3 od buřňáka bělobradého (Techow *et O’Ryan*, 2004), byly polymorfní u 4 z 6 testovaných druhů z řádu *Aequorlornithes* (v tabulce 6 označeny zeleně). Páry primerů pro lokus LAAL7 amplifikovaly polymorfní produkt u obou testovaných druhů plameňáků a pelikánů a bylo detekováno od 2 do 6 alel. U lokusu Paequ3 byly detekovány 3 alely u 3 druhů a u jednoho druhu, nesyta indomalajského, byly detekovány pouze 2 alely. Lokus Paequ3 byl při *cross-species* PCR amplifikaci polymorfní u buřňáka tristsanského, buřňáka obrovského, buřňáka Hallova, albatrosa černobrvého, albatrosa šedohlavého (Techow *et O’Ryen*, 2004), také u albatrosa trinidadského (Brown *et Jordan*, 2009) a buřňáka havajského (Welch *et Fleischer*, 2011).

Dalších 22 polymorfních mikrosatelitových lokusů polymorfních alespoň u 3 z 6 testovaných druhů ptáků z řádu *Aequorlornithes* je označeno v tabulce 6 světle modře.

Zajímavostí je, že lokusy RBG29 a Parm01, které jsem určila jako totožné, mají v některých pracích různý počet alel. Nedvědová (2015) u 6 nepříbuzných jedinců nesyta indomalajského detekovala 4 alely u lokusu RBG29 a pouze 3 alely u lokusu Parm01. Welch *et Fleischer* (2011) prováděli *cross-species* PCR amplifikaci mikrosatelitových lokusů od příbuzných druhů buřňáka havajského a kromě jiných lokusů použili i lokusy RBG29 a Parm01. Faktem je, že pro lokus Parm01 upravili páry primerů, ale i přesto pomocí nich našli 13 alel. U lokusu RBG29 autoři detekovali 14 alel. Další *cross-species* PCR amplifikaci obou těchto mikrosatelitů provedli Lombal *et al.* (2015) u buřňáka hnědohlavého. U lokusu RBG29 našli 5 alel a u lokusu Parm01 dokonce 6. Páry primerů označeny RBG29 a Parm01 sice amplifikují stejný mikrosatelitový lokus, ale sekvence těchto lokusů se trochu liší, jelikož tyto 2 páry primerů nasedají na vlákno DNA v trochu jiném místě. Proto se může stát, že pokud DNA testovaného druhu nese v místě nasednutí primerů určitou mutaci, nedojde k nasednutí primerů na vlákno

a následné amplifikaci. Jelikož ve 3 výše zmíněných pracích nebyl výskyt nižšího/vyššího počtu alel konzistentní, ale u lokusu Parm01 byly detekovány nulové alely (nižší počet alel) u nesyta indomalajského a buřňáka havajského a u lokusu RBG29 byly nulové alely u buřňáka hnědohlavého, muselo by se v případě amplifikace u konkrétního druhu rozhodnout pro pár primerů, kde nulové alely nejsou. Při amplifikaci těchto 2 párů primerů u 2 druhů plameňáků (růžový a karibský) byl detekován vždy stejný počet alel, tedy u těchto druhů nebyl zaznamenán výskyt nulových alel. U plameňáka růžového jsem z párů primerů pro mikrosatelitové lokusy označené RBG29 a Parm01 podle dalších kritérií, jako T_a nebo hodnotitelnost, zvolila jako vhodnější pro další analýzy lokus RBG29.

U plameňáka růžového bylo dosud v Laboratoři populační genetiky na Katedře buněčné biologie a genetiky PřF UPOL testováno celkem 781 párů primerů pro mikrosatelitové lokusy odvozené od zástupců řádů z kladu Aequorlitorornithes, dále několik mikrosatelitů od vrubozobých a univerzální ptačí mikrosatelity. Dosud bylo nalezeno a plně charakterizováno u 22 nepříbuzných jedinců plameňáka růžového 127 nezávislých polymorfních lokusů. Z těchto 127 nezávislých lokusů je 45 *de novo* a 82 je *cross-species* mikrosatelitových lokusů odvozených od zástupců z řádu trubkonosí, brodiví, veslonozí a dlouhokřídli. Dále bylo u 6 nepříbuzných jedinců plameňáka růžového nalezeno 13 polymorfních mikrosatelitových lokusů odvozených z řádu tučňáci a 11 univerzálních ptačích mikrosatelitů, které je třeba ještě genotypizovat u 22 jedinců a také charakterizovat. Dosud je tedy u plameňáka růžového nalezeno celkem 151 nezávislých mikrosatelitových lokusů, jejichž schématické rozdělení uvádím v grafu 3.



Graf 3: Rozdělení 151 nezávislých polymorfních mikrosatelitových lokusů testovaných u plameňáka růžového pomocí *cross-species* PCR amplifikace. Jedná se o mikrosatelity od zástupců příbuzných řádů z kladu Aequorlornithes a univerzální ptačí mikrosatelity. V závorkách jsou uvedeny počty nalezených polymorfních lokusů od daného řádu.

Všech 127 nezávislých polymorfních mikrosatelitových lokusů charakterizovaných u 22 nepříbuzných jedinců plameňáka růžového bylo statisticky hodnoceno pomocí programu Cervus 3.0.6 (Kalinowski *et al.*, 2007). Průměrně bylo stanoveno 5,213 alel na lokus a průměrná očekávaná heterozygotnost byla určena na 0,5744. Při paternitních studiích těmito mikrosatelitovými lokusy je pravděpodobnost chyby při přiřazení 1 rodiče k mláděti $9,083 \cdot 10^{-18}$, pravděpodobnost chyby při přiřazení druhého rodiče k mláděti, když jednoho rodiče známe, je $3,457 \cdot 10^{-30}$ a pravděpodobnost chyby při přiřazení celého rodičovského páru k mláděti je $1,134 \cdot 10^{-50}$. V případě náhodně vybraných 2 jedinců z populace je pravděpodobnost, že oba mají stejnou alelovou konstituci pro všech 129 lokusů, rovna $1,515 \cdot 10^{-92}$ a pravděpodobnost stejné alelové konstituce pro všechny tyto lokusy u 2 sourozenců je $2,936 \cdot 10^{-37}$. Dále byly všechny lokusy statisticky hodnoceny samostatně. Lokusy, které mají pravděpodobnost výskytu nulových alel do hodnoty 5–10 %, jsou ještě vhodné pro paternitní studie. Ze 127 analyzovaných lokusů mělo vyšší hodnotu než 10 % 14 mikrosatelitových lokusů, z nichž nejvyšší pravděpodobnost výskytu nulových alel má lokus Ptero05 a to 83%. Odchylna od Hardy-Weinbergovy rovnováhy se vyskytovala u 2 lokusů na hladině pravděpodobnosti 5 %, odchylna na hladině 1 % se vyskytovala u 1 lokusu a u 31 lokusů nebylo možné vypočítat soulad s Hardy-Weinbergovým zákonem. Zbylých 93 mikrosatelitových lokusů bylo v souladu s Hardy-Weinbergovou rovnováhou.

Dále bylo všech 127 polymorfních markerů hodnoceno programem Genepop 4.1 (Rousset, 2008). Bylo zjištěno, že mnou detekovaný polymorfní lokus BFAL4 je ve vzájemné vazbě s dříve detekovanými polymorfními lokusy u plameňáka růžového, a to lokusy Sn2A-36 (Taylor *et al.*, 2010) a Eru03 (Santos *et al.*, 2006). Tyto lokusy byly určeny jako vázané na pohlaví (tedy leží na chromozomu Z) (Chmelařová, 2012). Díky tomuto je více než pravděpodobné, že lokus BFAL4 taktéž leží na chromozomu Z. Lokusy D29, O110-39 a Pacbel_17986 sice dle analýzy leží pod hranicí signifikance vazby, ale je u nich také pravděpodobná vazba s lokusy Sn2A-36 a Eru03, a proto by bylo potřebné provést další analýzu na větším počtu jedinců plameňáka růžového, než je 22, pro potvrzení či vyloučení vazby na pohlavní chromozom. Taktéž by bylo možné pomocí bioinformatických nástrojů prohledat sekvenční data celého chromozomu Z.

Páry primerů pro mikrosatelitové lokusy izolované od zástupců z kladu *Aequorlitornithes* měly u plameňáka růžového poměrně dobrý výsledek výskytu polymorfismu. Proto by bylo vhodné primárně dotestovat nově navržené páry primerů pro mikrosatelity od již testovaných řádů a poté další mikrosatelity od zástupců z kladu *Aequorlitornithes*, jako třeba řád dlouhokřídlí. Právě z tohoto řádu bylo u plameňáka růžového dosud testováno 7 párů primerů pro mikrosatelity, z nichž byly 3 polymorfní. Nejednalo se sice o náhodně vybrané páry primerů pro mikrosatelity, ale i tak lze předpokládat, že i některé další páry primerů z řádu dlouhokřídlí budou u plameňáka růžového amplifikovat polymorfní produkt.

7 Závěr

V mé diplomové práci jsem se zabývala amplifikací celkem 64 *cross-species* mikrosatelitových lokusů u 22 nepříbuzných jedinců plameňáka růžového (*Phoenicopterus roseus*). Z tohoto počtu bylo 62 mikrosatelitů původně izolováno od 3 čeledí z řádu trubkonosí, konkrétně z čeledi albatrosovití (Diomedidae), buňáčkovití (Hydrobatidae) a z čeledi buňáčovití (Procellariidae). Další 2 lokusy byly izolovány od 2 druhů z řádu dlouhokřídlí (Charadriiformes), konkrétně od racka novozélandského (*Larus novaehollandiae*) a od kulíka mořského (*Charadrius alexandrius*).

Experiment byl rozdělen na 2 části. V první jsem amplifikovala ze 64 mikrosatelitů 48, které Kůrová (2017) určila jako polymorfní u 6 nepříbuzných jedinců plameňáka růžového. Zbylých 16 mikrosatelitů jsem retestovala kvůli jejich polymorfismu u 30 nepříbuzných jedinců plameňáka karibského (*Phoenicopterus ruber*) (Strejčková, 2018). Jelikož se jedná o blízce příbuzné druhy, je zde pravděpodobnost výskytu polymorfismu u stejných mikrosatelitových lokusů. Následně jsem nalezené polymorfní lokusy statisticky charakterizovala pomocí programu Cervus 3.0.6 a také analyzovala na vazbu lokusů programem Genepop 4.1.

Z 64 amplifikovaných párů primerů pro mikrosatelity jsem detekovala u 43 z nich 44 polymorfních oblastí, které jsem charakterizovala u 22 nepříbuzných jedinců plameňáka růžového. Programem Cervus 3.0.6 a následně programem Genepop 4.1 jsem zjistila, že lokus Parm01 od buňáka trinidadského a lokus RBG29 od racka novozélandského jsou totožné. Kvůli lepším parametrům jsem pro další analýzu ponechala pouze lokus RBG29.

U plameňáka růžového bylo dosud detekováno 151 polymorfních mikrosatelitových lokusů, z nichž bylo doposud plně charakterizováno celkem 82 nezávislých *cross-species* a 45 nezávislých *de novo* polymorfních mikrosatelitových lokusů. Jejich porovnáním programem Genepop 4.1 jsem našla lokus BFAL4, který je ve vzájemné vazbě s lokusy Sn2A-36 a Eru03, které byly již dříve určeny jako vázané na pohlaví (leží na chromozomu Z), a proto lze považovat za vázaný na pohlaví i lokus BFAL4. Dalšími potenciálně vázanými na pohlaví jsou lokusy D29, O110-39 a Pacbel_17986, ale u nich je třeba provést analýzu na větším počtu jedinců pro potvrzení či vyvrácení vazby.

8 Literatura

- Abdoullaye, D., Acevedo, I., Adebayo, A. A., Behrmann-Godel, J., Benjamin, R. C., Bock, D. G., Born, C., Brouat, C., Caccone, A., Cao, L.-Z., Casado-Amezúa, P., Catanéo, J., Correa-Ramirez, M.-M., Cristescu, M. E., Dobigny, G., Egbosimba, E. E., Etchberger, L. K., Fan, B., Fields, P. D., Forcioli, D., Furla, P., Garcia de Leon, F. J., García-Jiménez, R., Gauthier, P., Gergs, R., González, C., Granjon, L, Gutiérrez-Rodríguez, C., Havill, N. P., Helsen, P., Hether, T. D., Hoffman, E. A., Hu, X., Ingvarsson, P. K., Ishizaki, S., Ji, H., Ji, X. S., Jimenez, M. L., Kapil, R., Karban, R., Keller, S. R., Kubota, S., Li, S., Li, W., Lim, D. D., Lin, H., Liu, X., Luo, Y., Machordom, A., Martin, A. P., Matthysen, E., Mazzella, M. N., McGeoch, M. A., Meng, Z., Nishizawa, M., O'Brien, P., Ohara, M., Ornelas, J. F., Ortu, M. F., Pedersen, A. B., Preston, L., Ren, Q., Rothhaupt, K.-O., Sackett, L. C., Sang, Q., Sawyer, G. M., Shiojiri, K., Taylor, D. R., Van Dongen, S., Jansen van Vuuren, B., Vandewoestijne, S., Wang, H., Wang, J. T., Lewang, Xu, X.-L., Yang, G., Yang, Y., Zeng, Y. Q., Zhang, Q.-W., Zhang, Y., Zhao, Y., Zhou, Y. (2010): Permanent Genetic Resources note: Permanent Genetic Resources added to Molecular Ecology Resources Database 1 August 2009–30 September 2009. *Molecular Ecology Resources*, 10, 232–236.
- Abdurakhmonov, I. Y. (2016): Introduction to Microsatellites: Basics, Trends and Highlights, *Microsatellite Markers*, IntechOpen. Publikováno online: <https://www.intechopen.com/books/microsatellite-markers/introduction-to-microsatellites-basics-trends-and-highlights>.
- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schäffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D. J. (1997): Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acid Research*, 25, 3389–3402.
- An, J., Bechet, A., Berggren, Å., Brown, S. K., Bruford, M. W., Cai, Q., Cassellundhagen, A., Cezilly, F., Chen, S.-L., Cheng, W., Choi, S.-K., Ding, X. Y., Fan, Y., Feldheim, K. A., Feng, Z. Y., Friesen, V. L., Gaillard, M., Galaraza, J. A., Gallo, L., Ganeshiah, K. N., Geraci, J., Gibbons, J. G., Grant, W. S., Grauvogel, Z., Gustafsson, S., Guyon, J. R., Han, L., Heath, D. D., Hemmila, S., Hogan, J. D., Hou, B. W., Jakse, J., Javornik, B., Kaňuch, P., Kim, K.-K., Kim, K., Kim, S.-G., Kim, S.-I., Kim, W.-J., Kim, Y.-K., Klich, M. A., Kreiser, B. R., Kwan, Y.-S., Lam, A. W., Lasater, K., Lascoux, M., Lee, H., Lee, Y.-S., Li, D. L., Li, S.-J., Li, W. Y., Liao, X., Liber, Z., Lin, L., Liu, S., Luo,

X.-H., Ma, Y. H., Ma, Y., Marchelli, P., Min, M.-S., Moccia, M. D., Mohana, K. P., Moore, M., Morris-Pocock, J. A., Park, H.-Ch., Pfunder, M., Radosavljević, I., Ravikanth, G., Roderick, G. K., Rokas, A., Sacks, B. N., Sasaki, C. A., Satovic, Z., Schoville, S. D., Sebastiani, F., Sha, Z.-X., Shin, E.-H., Soliani, C., Sreejayan, N., Sun, Z., Tao, Y., Taylor, S. A., Templin, W. D., Shaanker, R. U., Vasudeva, R., Vendramin, G. G., Walter, R. P., Wang, G.-Z., Wang, K.-J., Wang, Y. Q., Wattier, R. A., Wei, F., Widmer, A., Woltmann, S., Won, Y.-J., Wu, J., Xie, M. L., Xu, G., Xu, X.-J., Ye, H.-H., Zhan, X., Zhang, F., Zhong, J. (2010): Permanent Genetic Resources note: Permanent Genetic Resources added to Molecular Ecology Resources Database 1 October 2009–30 November 2009. *Molecular Ecology Resources*, 10, 404–408.

Ando, H., Young, L., Naughton, M., Suzuki, H., Deguchi, T., Isagi, Y. (2014): Predominance of unbalanced gene flow from Western to Central North Pacific colonies of the black-footed albatross (*Phoebastria nigripes*). *Pacific Science*, 68, 309–319.

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*. Preprint.

Andris, M., Arias, M. C., Barthel, B. L., Bluhm, B. H., Bried, J., Canal, D., Chen, X. M., Cheng, P., Chiappero, M. B., Coelho, M. M., Collins, A. B., Dash, M., Davis, M. C., Duarte, M., Dubois, M.-P., Françoso, E., Galmes, M. A., Gopal, K., Jarne, P., Kalbe, M., Karczmarski, L., Kim, H., Martella, M. B., McBride, R. S., Negri, V., Negro, J. J., Newell, A. D., Piedade, A. F., Puchulutegui, C., Raggi, L., Samonte, I. E., Sarasola, J. H., See, D. R., Seyoum, S., Silva, M. C., Solaro, C., Tolley, K. A., Tringali, M. D., Vasemägi, A., Xu, L. S., Zanón-Martínez, J. I. (2012): Permanent Genetic Resources note: Permanent Genetic Resources added to Molecular Ecology Resources Database 1 February 2012–31 March 2012. *Molecular Ecology Resources*, 12, 779–781.

Anonymous (2019): Species factsheet: *Phoenicopterus roseus*. BirdLife International. Publikováno online: <http://www.birdlife.org>.

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.
- Braun, E. L., Kimball, R. T., Han, K.-L., Iuhasz-Velez, N. R., Bonilla, A. J., Chojnowski, J. L., Yuri, T. (2011): Homoplastic microinversions and the avian tree of life. *BMC Evolutionary Biology*, 11, 141.
- 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*, 9, 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*, 8, 913–915.
- Brown, R. M., Jordan, W. C. (2009): Characterization of polymorphic microsatellite loci from Round Island Petrels (*Pterodroma arminjoniana*) and their utility in other seabird species. *Journal of Ornithology*, 150, 925–929.
- Burg, T. M. (1999): Isolation and characterization of microsatellites in albatrosses. *Molecular Ecology*, 8, 335–346.
- Burg, T. M., Croxall, J. P. (2001): Global relationships amongst black-browed and grey-headed albatrosses: analysis of population structure using mitochondrial DNA and microsatellites. *Molecular Ecology*, 10, 2647–2660.
- Burg, T. M., Croxall, J. P. (2004): Global population structure and taxonomy of the wandering albatross species complex. *Molecular Ecology*, 13, 2345–2355.
- Cramp, S., Simmons, K. E. L., Ferguson-Lees, I. J., Gillmor, R., Hollom, P. A. D. (1977): *Handbook of the Birds of Europe, the Middle East and North Africa: The Birds of Western Palearctic. Volume 1. Ostrich to Ducks.* Oxford University Press, New York.

- Dawson, D. A., Hunter, F. M., Pandhal, J., Buckland, R., Parham, A., Jones, I. L., Burke, T. (2005): Assessment of 17 new whiskered auklet (*Aethia pygmaea*) microsatellite loci in 42 seabirds identifies 5–15 polymorphic markers for each of nine Alcinae species. *Molecular Ecology Notes*, 5, 289–297.
- Del Hoyo, J., Elliott, A., Sargatal, J., Imboden, C. (1992): Handbook of the birds of the world. Volume 1. Ostrich to Ducks. Lynx Editions, Barcelona.
- Drobek, A. (2008): Studium paternity i plameňáků (*Phoenicopterus* sp.) pomocí analýzy mikrosatelitové DNA. Bakalářská práce. Depon in: Knihovna biologických oborů PřF UPOL v Olomouci.
- Drobek, A. (2010): Analýza mikrosatelitových lokusů pro determinaci paternity u plameňáka karibského (*Phoenicopterus roseus*) a plameňáka růžového (*P. ruber*). Diplomová práce. Depon in: Knihovna biologických oborů PřF UPOL v Olomouci.
- Dubois, M. P., Jarne, P., Jouventin, P. (2005): Ten polymorphic microsatellite markers in the wandering albatross *Diomedea exulans*. *Molecular Ecology Notes*, 5, 905–907.
- 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 Galápagos Islands. *Waterbirds*, 37, 349–468.
- Gaisler, J., Zima, J. (2007): Zoologie obratlovců. Nakladatelství Academia, Akademie věd České republiky, Praha.
- 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.
- Given, A. D., Mills, J. A., Baker, A. J. (2002): Isolation of polymorphic microsatellite loci from the red-billed gull (*Larus novaehollandiae scopulinus*) and amplification in related species. *Molecular Ecology Notes*, 2, 416–418.
- Gonzalez, E. G., Genovart, M., Oro, D., Zardoya, R., Juste, J. (2009): Polymorphic microsatellite markers for the critically endangered Balearic shearwater, *Puffinus mauretanicus*. *Molecular Ecology Resources*, 9, 1044–1046.
- Gosler, A. (1994): Atlas ptáků světa. Druhé české vydání. Příroda, Bratislava.

- Hackett, S. J., Kimball, R. T., Reddy, S., Bowie, R. C. K., Braun, E. L., Braun, M. J., Yuri, T. (2008): A Phylogenomic Study of Birds Reveals Their Evolutionary History. *Science*, 320, 1763–1768.
- Hardesty, B. D., Metcalfe, S. S., Wilcox, C. (2012): Genetic variability and population diversity as revealed by microsatellites for Flesh-footed shearwaters (*Puffinus carneipes*) in the southern hemisphere. *Conservation Genetics Resources*, 5, 27–29.
- 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.
- Howard, R., Moore, A. (1994): A complete checklist of the birds of the World. Druhé vydání. Academic Press, San Diego.
- Chmelařová, A. (2012): Charakterizace polymorfních *cross-species* mikrosatelitů u pelikána afrického (*Pelecanus rufescens*) a pelikána kadeřavého (*Pelecanus crispus*). Diplomová práce. Depon in: Knihovna biologických oborů PřF UPOL v Olomouci.
- Janušová, D. (2015): *Cross-species* amplifikace mikrosatelitů z řádu trubkonosí u potápky roháče (*Podiceps cristatus*). Bakalářská práce. Depon in: Knihovna biologických oborů PřF UPOL v Olomouci.
- Janušová, D. (2017): Charakteristika vybraných polymorfních *cross-species* mikrosatelitů z kladu Aequorlitorornithes u potápky roháče (*Podiceps cristatus*). Diplomová práce. Depon in: Knihovna biologických oborů PřF UPOL v Olomouci.
- Jarvis, E. D., Mirarab, S., Aberer, A. J., Li, B., Houde, P., Li, C., Zhang, G. (2014): Whole-genome analyses resolve early branches in the tree of life of modern birds. *Science*, 346, 1320–1331.
- Kalinowski, S. T., Taper, M. L., Marshall, T. C. (2007): Revising how the computer program cervus accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. *Molecular Ecology*, 16, 1099–1106.
- Kapil, R. (2005): Microsatellite-based genetic profiling for the management of wild and captive flamingo populations. Disertační práce. Denton, University of North Texas.

- Kapil, R., Sawyer, G. M., Preston, L., Benjamin, R. C. (2010): Isolation and characterization of polymorphic microsatellite loci from the Caribbean flamingo (*Phoenicopterus ruber ruber*). *Molecular Ecology Resources*. Preprint.
- Kimball, R. T., Wang, N., Heimer-McGinn, V., Ferguson, C., Braun, E. L. (2013): Identifying localized biases in large datasets: a case study using the avian tree of life. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 69, 1021–1032.
- Klaclová, M. (2018): *Cross-species* amplifikace mikrosatelitů z řádu tučňáci a konzervovaných ptačích mikrosatelitů u plameňáka růžového (*Phoenicopterus roseus*). Bakalářská práce. Depon in: Knihovna biologických oborů PřF UPOL v Olomouci.
- Kopečná, K. (2018): *Cross-species* amplifikace mikrosatelitů z řádu trubkonosí u pelikána afrického (*Pelecanus rufescens*). Bakalářská práce. Depon in: Knihovna biologických oborů PřF UPOL v Olomouci.
- Küpper, C., Horsburgh, G. J., Dawson, D. A., French-Constant, R., Székely, 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.
- Kůrová, V. (2017): *Cross-species* amplifikace mikrosatelitů z řádu trubkonosí u plameňáka růžového (*Phoenicopterus roseus*). Bakalářská práce. Depon in: Knihovna biologických oborů PřF UPOL v Olomouci.
- Lawrence, H. A. (2008): Conservation genetics of the world's most endangered seabird, the Chatham Island tāiko (*Pterodroma magentae*). Disertační práce. Massey University, Auckland. Publikováno online: <https://mro.massey.ac.nz/handle/10179/657?show=full>
- Lombal, A. J., Wenner, T. J., Burrige, Ch. P. (2015): Assessment of high-resolution melting (HRM) profiles as predictors of microsatellite variation: an example in Providence Petrel (*Pterodroma solandri*). *Genes and Genomics*, 37, 977–983.
- Manišová (2011): Analýza vybraných polymorfních *cross-species* mikrosatelitů pro determinaci paternity u plameňáka růžového (*Phoenicopterus roseus*). Bakalářská práce. Depon in: Knihovna biologických oborů PřF UPOL v Olomouci.

- Málková (2013): Analýza a charakteristika polymorfních *cross-species* mikrosatelitů u plameňáka růžového (*Phoenicopterus roseus*). Diplomová práce. Depon in: Knihovna biologických oborů PřF UPOL v Olomouci.
- Moodley, Y., Masello, J. F., Cole, T. L., Calderon, L., Munimanda, G. K., Thali, M. R., Quillfeldt, P. (2015): Evolutionary factors affecting the cross-species utility of newly developed microsatellite markers in seabirds. *Molecular Ecology Resources*, 15, 1046–1058.
- Myers, P., R. Espinosa, C. S. Parr, T. Jones, G. S. Hammond, T. A. Dewey (2019): The Animal Diversity Web. Publikováno online: <https://animaldiversity.org>.
- Nadir, E., Margalit, H., Gallily, T., Ben-Sasson, S. A. (1996): Microsatellite spreading in the human genome: evolutionary mechanisms and structural implications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93, 6470–6475.
- Nedvědová, M. (2015): *Cross-species* amplifikace mikrosatelitů z řádu trubkonosí u nesyta indomalajského (*Mycteria leucocephala*). Diplomová práce. Depon in: Knihovna biologických oborů PřF UPOL v Olomouci.
- Oliveira, E. J., Pádua, J. G., Zucchi, M. I., Vencovsky, R., Vieira, M. L. C. (2006): Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. *Genetics and Molecular Biology*, 29, 294–307.
- Preston, E. L. (2005): Isolation and Characterization of Polymorphic Loci from the Caribbean Flamingo (*Phoenicopterus ruber ruber*): New Tools for Wildlife Management. Disertační práce. Denton, University of North Texas.
- Prum, R. O., Berv, J. S., Dornburg, A., Field, D. J., Townsend, J. P., Lemmon, E. M., Lemmon, A. R. (2015): A comprehensive phylogeny of birds (Aves) using targeted next-generation DNA sequencing. *Nature*, 526, 569–573.
- Quillfeldt, P., Masello, J. F., Segelbacher, G. (2012): Extra-pair paternity in seabirds: A review and case study of Thin-billed Prions *Pachyptila belcheri*. *Journal of Ornithology*, 153, 367–373.

- Reddy, S., Kimball, R. T., Pandey, A., Hosner, P. A., Braun, M. J., Hackett, S. J., 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.
- Rousset, F. (2008): Genepop'007: a complete re-implementation of the genepop software for Windows and Linux. *Molecular Ecology Resources*, 8, 103–106.
- Santos, M. S., Gonçalves, E. C., Barbosa, M. S. R., Silva, A., Schneider, M. P. C. (2006): Isolation and characterization of polymorphic microsatellite loci in the scarlet ibis (*Eudocimus ruber* - Threskiornithidae-Aves). *Molecular Ecology Notes*, 6, 307–309.
- Schlötterer, C. (2000): Evolutionary dynamics of microsatellite DNA. *Chromosoma*, 109, 365–71.
- Smith, J. V., Braun, E. L., Kimball, R. T. (2013): Ratite nonmonophyly: independent evidence from 40 novel loci. *Systematic Biology*, 62, 35–49.
- Strand, M., Prolla, T. A., Liskay, R. M., Petes, T. D. (1993): Destabilization of tracts of simple repetitive DNA in yeast by mutations affecting DNA mismatch repair. *Nature*, 365, 274–276.
- Strejčková, B. (2016): *Cross-species* amplifikace mikrosatelitů z řádu trubkonosí u plameňáka karibského (*Phoenicopterus ruber*). Bakalářská práce. Depon in: Knihovna biologických oborů PřF UPOL v Olomouci.
- Strejčková, B. (2018): Analýza a charakteristika polymorfních *cross-species* mikrosatelitů od trubkonosých u plameňáka karibského (*Phoenicopterus ruber*). Diplomová práce. Depon in: Knihovna biologických oborů PřF UPOL v Olomouci.
- Sun, Z., Gómez-Díaz, E., Bailie, A., Friesen, V. (2009): Isolation and characterization of microsatellite loci for storm-petrels. *Molecular Ecology Resources*, 9, 913–915.
- Svensson, L., Mullarney, K., Zetterström, D. (2009): Ptáci Evropy, Severní Afriky a Blízké Východu. Druhé vydání. Nakladatelství Ševčík, Plzeň.
- Šťastný, K., Bejček, V., Hudec, K. (1998): Svět zvířat IV., Ptáci (1). Albatros, Praha.
- Tautz, D., Trick, M., & Dover, G. A. (1986): Cryptic simplicity in DNA is a major source of genetic variation. *Nature*, 322, 652–656.

- Taylor, S. A., Morris-Pocock, J. A., Sun, Z., Friesen, V. L. (2010): Isolation and characterization of ten microsatellite loci in Blue-footed (*Sula nebouxii*) and Peruvian Boobies (*Sula variegata*). *Journal of Ornithology*, 151, 525–528.
- 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.
- 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, 36.
- Tóth, G., Gáspári, Z., Jurka, J. (2000): Microsatellites in different eukaryotic genomes: survey and analysis. *Genome Research*, 10, 967–981.
- Trivedi, S. (2004): Microsatellites (SSRs): Puzzles within puzzle. *Indian Journal of Biotechnology*, 3, 331–347.
- Van Tuinen, M., Butvill, D. B., Kirsch, J. A., & Hedges, S. B. (2001): Convergence and divergence in the evolution of aquatic birds. *Proceedings. Biological Sciences*, 268, 1345–1350.
- Verešová, D. (2018): *Cross-species* amplifikace mikrosatelitů z řádu trubkonosí u pelikána kadeřavého (*Pelecanus crispus*). Bakalářská práce. Depon in: Knihovna biologických oborů PřF UPOL v Olomouci.
- Veselovský, Z. (2001): *Obecná ornitologie*. Academia, nakladatelství Akademie věd České republiky, Praha.
- Vieira, M. L. C., Santini, L., Diniz, A. L., Munhoz, C. de F. (2016): Microsatellite markers: what they mean and why they are so useful. *Genetics and Molecular Biology*, 39, 312–328.
- Wang, N., Braun, E. L., Kimball, R. T. (2012): Testing Hypotheses about the Sister Group of the Passeriformes Using an Independent 30-Locus Data Set. *Molecular Biology and Evolution*, 29, 737–750.
- Welch, A. J., Fleischer, R. C. (2011): Polymorphic microsatellite markers for the endangered Hawaiian petrel (*Pterodroma sandwichensis*). *Conservation Genetics Resources*, 3, 581–584.

- Winkler, D. W., Billerman, S. M., Lovette, I. J. (2015): Bird Families of the World: An Invitation to the Spectacular Diversity of Birds. Lynx Edicions, Barcelona.
- 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 - Journal of African Ornithology, 82, 95–100.
- Zima, J., Macholán, M., Munclinger, P., Piálek, J. (2004): Genetické metody v zoologii. Nakladatelství Karolinum, Praha.

9 Přílohy

Příloha 1: Originální výstup z programu Cervus 3.0.6 při analýze 43 nezávislých polymorfních lokusů amplifikovaných pomocí 42 párů primerů pro mikrosatelitové lokusy izolované z řádu trubkonosí a dlouhokřídli. Amplifikace byla provedena u 22 nepříbuzných jedinců plameňáka růžového. V tabulce je uveden název lokusu, počet detekovaných alel (k), počet testovaných jedinců (N), pozorovaná heterozygotnost (H_{OBS}), očekávaná heterozygotnost (H_{EXP}), obsah polymorfní informace (PIC), pravděpodobnost chyby při přiřazování 1 rodiče k mláděti (NE-1P), pravděpodobnost chyby při přiřazování druhého rodiče k mláděti, když jednoho rodiče známe (NE-2P), pravděpodobnost chyby při přiřazování rodičovského páru k mláděti (NE-PP), pravděpodobnost stejné alelické konstituce na všech lokusech u 2 náhodně vybraných jedinců z populace (NE-I), pravděpodobnost stejné alelické konstituce na všech lokusech u 2 sourozenců (NE-SI), odchylka od Hardy-Weinbergovy rovnováhy (HW), (kde NS = není signifikantní, ** = signifikance na hladině 1 %, ND = není možné spočítat) a odhadovaná frekvence nulových alel F(Null).

Cervus 3.0.6 - (c) Copyright Tristan Marshall 1998-2012
Distributed by Field Genetics Ltd - www.fieldgenetics.com
Licensed for non-commercial use only

Allele frequency analysis completed 5.3.2019 16:33:16

Locus	k	N	HObs	HExp	PIC	NE-1P	NE-2P	NE-PP	NE-I	NE-SI	HW	F(Null)
Omn21	2	22	0.818	0.495	0.367	0.883	0.817	0.724	0.384	0.604	NS	-0.2571
Bb20	2	22	0.455	0.359	0.290	0.938	0.855	0.770	0.483	0.695	NS	-0.1273
Ole21	4	22	0.545	0.547	0.483	0.853	0.704	0.544	0.268	0.550	NS	-0.0032
D29	2	22	0.409	0.384	0.305	0.930	0.848	0.761	0.461	0.678	NS	-0.0435
Pacbel_10033	2	22	0.455	0.406	0.318	0.921	0.841	0.753	0.443	0.662	NS	-0.0680
Patbel3	2	22	0.136	0.130	0.119	0.992	0.941	0.892	0.770	0.879	ND	-0.0267

Locus	k	N	HObs	HExp	PIC	NE-1P	NE-2P	NE-PP	NE-I	NE-SI	HW	F(Null)
LAAL19	5	22	0.682	0.745	0.681	0.689	0.515	0.336	0.121	0.416	NS	0.0351
Omn1	3	22	0.682	0.575	0.476	0.842	0.723	0.586	0.278	0.538	NS	-0.1040
Bb22	2	22	0.455	0.359	0.290	0.938	0.855	0.770	0.483	0.695	NS	-0.1273
PcD103	2	22	0.182	0.169	0.152	0.986	0.924	0.865	0.710	0.845	ND	-0.0405
LAAL10	7	22	0.591	0.585	0.531	0.816	0.650	0.466	0.224	0.520	NS	-0.0198
Pacbel_17986	3	22	0.500	0.521	0.401	0.870	0.788	0.679	0.349	0.583	NS	0.0065
Cd5	2	22	0.182	0.241	0.208	0.972	0.896	0.824	0.612	0.785	ND	0.1287
Omn8	8	22	0.864	0.822	0.776	0.559	0.383	0.201	0.066	0.365	NS	-0.0372
Pc D3-I	2	22	0.591	0.502	0.370	0.880	0.815	0.722	0.380	0.600	NS	-0.0926
Pc D3-II	2	22	0.182	0.169	0.152	0.986	0.924	0.865	0.710	0.845	ND	-0.0405
O110-39	3	22	0.409	0.513	0.444	0.874	0.740	0.597	0.306	0.576	NS	0.0814
Bb25	4	22	0.591	0.625	0.544	0.803	0.656	0.494	0.218	0.499	NS	0.0167
Dc5	3	22	0.591	0.566	0.470	0.847	0.727	0.589	0.282	0.544	NS	-0.0481
Oc28B	4	22	0.682	0.711	0.636	0.735	0.572	0.403	0.152	0.440	NS	0.0063
RBG29	8	22	0.864	0.805	0.761	0.580	0.400	0.211	0.071	0.374	NS	-0.0420
Pacbel_07265	2	22	0.227	0.426	0.330	0.913	0.835	0.746	0.427	0.649	NS	0.2937
Dc31	2	22	0.455	0.507	0.373	0.877	0.814	0.720	0.377	0.596	NS	0.0435
12H8	2	22	0.045	0.045	0.043	0.999	0.978	0.958	0.914	0.956	ND	-0.0042
LAAL7	4	22	0.500	0.467	0.410	0.893	0.760	0.616	0.342	0.607	NS	-0.0739
Pacbel_00386	3	22	0.364	0.376	0.326	0.932	0.822	0.707	0.442	0.677	NS	0.0588
Pacbel_08988	3	22	0.727	0.580	0.505	0.839	0.694	0.543	0.249	0.529	NS	-0.1284
Calex_01	2	22	0.091	0.089	0.083	0.996	0.958	0.922	0.838	0.916	ND	-0.0141
Pacbel_09528	4	22	0.773	0.717	0.651	0.722	0.550	0.372	0.140	0.435	NS	-0.0435
Pacbel_09021	4	22	0.636	0.646	0.574	0.788	0.628	0.459	0.193	0.483	NS	-0.0034
Puff G2F	3	22	0.818	0.669	0.580	0.786	0.640	0.491	0.194	0.472	NS	-0.1158
Oc49	6	22	0.864	0.781	0.729	0.629	0.449	0.263	0.091	0.391	NS	-0.0715

Locus	k	N	HObs	HExp	PIC	NE-1P	NE-2P	NE-PP	NE-I	NE-SI	HW	F(Null)
Tch6	4	22	0.591	0.692	0.628	0.743	0.571	0.391	0.154	0.450	NS	0.0736
Ptero05	2	22	0.045	0.502	0.370	0.880	0.815	0.722	0.380	0.600	**	0.8303
Ole17	2	22	0.500	0.511	0.374	0.876	0.813	0.719	0.376	0.594	NS	-0.0010
Pacbel_17944	6	22	0.636	0.780	0.731	0.624	0.443	0.252	0.088	0.391	NS	0.0980
Pc B109	3	22	0.318	0.280	0.247	0.963	0.870	0.778	0.554	0.752	ND	-0.0815
Ole02	13	22	0.818	0.872	0.839	0.443	0.282	0.112	0.035	0.333	NS	0.0206
Ole09	5	22	0.818	0.781	0.724	0.640	0.462	0.282	0.096	0.392	NS	-0.0447
Paequ3	3	22	0.409	0.502	0.391	0.880	0.793	0.685	0.359	0.595	NS	0.0884
De3	3	22	0.591	0.538	0.427	0.862	0.764	0.644	0.323	0.568	NS	-0.0786
BFAL4	2	22	0.500	0.384	0.305	0.930	0.848	0.761	0.461	0.678	NS	-0.1423
Paequ7	4	22	0.682	0.601	0.517	0.822	0.683	0.529	0.241	0.516	NS	-0.1027

Number of individuals: 22
 Number of loci: 43
 Mean number of alleles per locus: 3.581
 Mean proportion of loci typed: 1.0000
 Mean expected heterozygosity: 0.5111
 Mean polymorphic information content (PIC): 0.4402
 Combined non-exclusion probability (first parent): 0.00024251
 Combined non-exclusion probability (second parent): 0.00000019
 Combined non-exclusion probability (parent pair): 5.423E-0012
 Combined non-exclusion probability (identity): 1.607E-0024
 Combined non-exclusion probability (sib identity): 2.814E-0011