

**Univerzita Palackého v Olomouci**  
**Přírodovědecká fakulta**  
**Katedra buněčné biologie a genetiky**



**Analýza mikrosatelitových lokusů pro  
determinaci paternity u plameňáka karibského  
(*Phoenicopterus ruber*) a plameňáka růžového  
(*P. roseus*)**

**Diplomová práce**

**Aleš Drobek**

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

**Olomouc 2010**

**Školitel: RNDr. Petr Nádvorník, Ph.D.**

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracoval samostatně v průběhu magisterského studia pod vedením RNDr. Petra Nádvorníka, Ph.D. s použitím uvedených literárních zdrojů.

V Olomouci dne 10.5.2010

.....

Práce vznikla za finanční podpory Vnitřní grantové agentury Univerzity Palackého v Olomouci (IGA UPOL) v rámci projektu PrF\_2010\_052 „Mezidruhová amplifikace polymorfních DNA mikrosatelitů u vodních ptáků“.

Děkuji RNDr. Petru Nádvorníkovi, Ph.D. za jeho trpělivost i čas, který mi během konzultací a psaní diplomové práce věnoval, za jeho odbornou pomoc, věcné připomínky, cenné praktické rady, přátelský a vřelý přístup a velkou motivaci pro mé další studium.

## Souhrn

Mikrosatelity jsou vysoce polymorfní úseky DNA, které jsou tvořeny tandemovými repeticemi s délkou motivu 1-6 párů bazí. Díky svému polymorfizmu se jich využívá jako genetických markerů v široké škále praktických aplikací i výzkumu od určování paternitních vztahů, přes vytváření genetických map až po studium celých populací a jejich vzájemných interakcí.

Předkládaná práce řeší problematiku *cross-species* amplifikace mikrosatelitových lokusů u plameňáků. Cílem práce bylo nalézt nové polymorfní mikrosatelitové lokusy u plameňáka růžového (*Phoenicopus roseus*) a plameňáka karibského (*P. ruber*), které by byly vhodné jako markery nejenom k určení paternity. Pro detekci polymorfizmu byla použita polymerázová řetězová reakce *cross-species* primerů příbuzných druhů z řádu Ciconiiformes, Pelecaniformes, Podicipediformes, Gaviiformes a Anseriformes. Dále pak z řádu Charadriiformes a Sphenisciformes. K separaci PCR produktů byla použita polyakrylamidová elektroforéza za denaturujících podmínek.

Celkový počet 284 mikrosatelitů odvozených od 26 zdrojových druhů byl testován na 6 jedincích od každého druhu plameňáka. Polymorfní lokusy byly následně genotypizovány na 22 jedincích plameňáka růžového a 30 jedincích plameňáka karibského. Pro plameňáka růžového bylo nalezeno 29 polymorfních lokusů. Pro plameňáka karibského bylo nalezeno 33 polymorfních lokusů. Většina z objevených mikrosatelitů byla pro oba druhy společná. Tyto polymorfní lokusy lze použít k testům paternity a jiným hodnocením příbuzenských vztahů u těchto ptáků.

## Summary

Microsatellites are highly polymorphic stretches of DNA which are made of tandem repeats 1-6 base pair long. Due to its polymorphism, microsatellites are used as a genetic markers in broad range of practical applications and in research: From paternity determination and genetic mapping to population studies.

This diploma thesis solves problems of microsatellite cross-species amplification in flamingos. The goal of this work was to find a new polymorphic loci in Greater flamingo (*Phoenicopterus roseus*) and Caribbean flamingo (*P. ruber*) which would be suitable not only for paternity determination. Cross-species primers from related species (Ciconiiformes, Pelecaniformes, Podicipediformes, Gaviiformes, Anseriformes, Charadriiformes and Sphenisciformes) were used to find polymorphic loci using polymerase chain reaction. Denaturing polyacrylamide gel electrophoresis was used for separation of polymerase chain reaction products.

Total number of 284 microsatellites derived from 26 source species were tested on 6 individuals for each flamingo species. Polymorphic loci were then genotyped in 22 individuals of Greater flamingo and 30 individuals of Caribbean flamingo. In Greater flamingo were found 29 polymorphic loci. In Caribbean flamingo were found 33 polymorphic loci. Majority of discovered microsatellites were common for both species. These polymorphic microsatellites can be used in paternity determination and other tests of relativeness.

## Obsah

1. Úvod .....	6
2. Cíle .....	7
3. Literární přehled .....	8
3.1. Cross-species amplifikace mikrosatelitů.....	8
3.2. Evoluce mikrosatelitů.....	10
3.3. Mikrosatelity ve fylogenezi.....	13
3.4. Analýza rodičovství .....	14
3.4.1. <i>Exclusion</i> .....	15
3.4.2. <i>Categorical allocation</i> .....	15
3.4.3. <i>Fractional allocation</i> .....	16
3.4.4. <i>Parental reconstruction</i> .....	16
3.4.5. <i>Sibship reconstruction</i> .....	17
3.4.6. <i>Full probability parentage analysis</i> .....	17
3.5. Faktory ovlivňující kvalitu výsledků rodičovské analýzy .....	18
3.6. Nové mikrosatelitové lokusy pro plameňáky.....	19
4. Materiál a metody.....	23
4.1. Izolace DNA z krve pro účely PCR .....	23
4.2. PCR amplifikace DNA.....	23
4.3. Elektroforetická separace PCR produktů.....	24
4.4. Chemikálie .....	25
4.5. Roztoky .....	25
5. Výsledky.....	28
6. Diskuze.....	39
7. Závěr .....	47
8. Seznam zkratk .....	48
9. Použitá literatura .....	49
10. Příloha.....	56

## 1. Úvod

Moderní metody molekulární ekologie jsou v současné době ze značné části založeny na analýze mikrosatelitů. Pro svůj obecně vysoký polymorfismus a četný výskyt v eukaryotických genomech jsou však mikrosatelity používány nejenom v této oblasti. Jako vysoce ceněné genetické markery, nacházejí své uplatnění téměř ve všech odvětvích genetického výzkumu, kde se používá technik molekulární biologie. Jednou z možných aplikací je určování rodičovských, většinou pak paternitních (otcovských) vztahů. Mikrosatelitové analýzy se za tímto účelem využívá u mnoha druhů zvířat až po člověka.

V této diplomové práci řeším problematiku hledání a využití *cross-species* mikrosatelitů pro determinaci paternity u plameňáků. Navazuji tím na svou bakalářskou práci, ve které jsem prezentoval úspěšnost *cross-species* amplifikace a nalezení 7 polymorfních lokusů u plameňáka růžového a 10 u plameňáka karibského. V době vypracování bakalářské práce nebyly z publikací známy žádné původní ani *cross-species* mikrosatelity pro plameňáky. V současné době jsou známy 3 práce zabývající se *de novo* izolovanými mikrosatelity pro plameňáky. Tyto výsledky nebyly zatím publikovány.

Jelikož se *cross-species* amplifikace ukázala jako efektivní cesta k získání nových mikrosatelitů u plameňáků, výrazně jsem v této práci rozšířil sadu testovaných primerů. K 70 mikrosatelitům odvozených od 7 druhů, které jsem testoval v mé bakalářské práci jsem přidal dalších 214 mikrosatelitů odvozených od 19 druhů. U všech objevených polymorfních lokusů bude provedena genotypizace na větším počtu nepříbuzných jedinců. Většina z celkových 26 testovaných zdrojových druhů ptáků patří do řádu brodivých a veslonohých.

## 2. Cíle

1. Vypracování literární rešerše na téma *cross-species* amplifikace mikrosatelitů, jejich evoluční dynamiky a využití při fylogenetických studiích u ptáků.
2. Otestování dostupné sady *cross-species* primerů od příbuzných druhů ptáků z řádu Ciconiiformes, Pelecaniformes, Podicipediformes a Gaviiformes. Výběrově pak i z řádů jako jsou Anseriformes, Charadriiformes a Sphenisciformes. Zjistit amplifikaci polymorfních lokusů u plameňáka růžového (*Phoenicopterus roseus*) a plameňáka karibského (*P. ruber*).
3. U polymorfních lokusů provést jejich otestování na 22 nepříbuzných jedincích plameňáka růžového a 30 jedincích plameňáka karibského. Zjistit populační charakteristiku jednotlivých mikrosatelitů a jejich výpovědní hodnotu pro testy paternity.
4. Vypracování diplomové práce.



### 3. Literární přehled

#### 3.1. Cross-species amplifikace mikrosatelitů

Před více než dvěma desetiletími se mikrosatelity staly novými genetickými markery a postupem času nabyly značné oblíbenosti (Weber & May, 1989). Díky svému vysokému polymorfizmu a snadnému hodnocení založeném na polymerázové řetězové reakci (*Polymerase chain reaction* – PCR), pomalu nahradily používání takových genetických markerů jakými jsou RFLP, RAPD apod. (Bowcock *et al.*, 1994; Jame & Lagoda, 1996). Rychlost, se kterou mikrosatelity nahradily ostatní markery však nebyla tak vysoká, jak by se dalo očekávat.

Hlavním problémem širšího používání mikrosatelitů je jejich vysoká druhová specifita, která znemožňuje jejich univerzální použití. Izolace nových mikrosatelitových lokusů je nejen časově, ale hlavně finančně náročná, což se také stalo důvodem jejich relativně pomalého nástupu. S přibývajícím počtem známých mikrosatelitů se však zjistila jejich určitá míra úspěšného použití i u jiných druhů, většinou však v rámci rodu nebo úzké fylogenetické linie (Moore *et al.*, 1991). S rostoucím počtem známých lokusů již bylo možné provádět rozsáhlejší komparativní studie (Primmer *et al.*, 1996), které odhalily základní možnosti a omezení tohoto *cross-species* přenosu mikrosatelitů, jak byl pojmenován.

Ze všech větších studií, které byly na toto téma provedeny, vyplývá jako hlavní ukazatel úspěšnosti *cross-species* amplifikace genetická příbuznost, respektive genetická vzdálenost testovaného druhu od zdrojového druhu kde byl mikrosatelitový lokus izolován (Primmer *et al.*, 1996; Primmer *et al.*, 2005). Tato genetická vzdálenost, která je často označována jako fylogenetická vzdálenost, však nesmí být ztotožňována se systematickou příbuzností založenou na taxonomickém třídění organismů. Tyto systémy mnohdy neodrážejí skutečnou fylogenetickou historii daných skupin druhů (Tuinen *et al.*, 2001). Genetická vzdálenost může být hodnocena na základě DNA-DNA hybridizace, porovnání evolučně konzervativních sekvencí cytochromu b, popř. porovnáním dostupných sekvencí jiných konzervativních genů.

Rozsáhlý výzkum *cross-species* amplifikace u ptáků (Primmer *et al.*, 1996) vycházející z fylogenetických vztahů založených na DNA-DNA hybridizaci (Sibley & Ahlquist, 1990) vedl k přibližnému přiřazení procentického úspěchu amplifikace / polymorfizmu k fylogenetické vzdálenosti určitých skupin ptáků.

Například pro pěvce byla stanovena evoluční vzdálenost 11 miliónů let pro zachování 50% polymorfizmu z testované sady mikrosatelitů. Data získaná z DNA hybridizace jsou pro jednotlivé skupiny organismů relativní a pro převod do absolutních hodnot evoluční vzdálenosti v milionech let se musí použít vždy jiný koeficient založený převážně na věku, kdy se druh začíná rozmnožovat. Díky nejednotnému převodu hodnot do absolutní fylogenetické vzdálenosti a jinému způsobu testování mikrosatelitů (malý soubor lokusů testovaný na velkém počtu druhů a obráceně) dochází sice k potvrzení negativní korelace fylogenetické vzdálenosti / úspěšnosti amplifikace, ale se značně rozdílnými hodnotami evoluční vzdálenosti. Rekonstrukce fylogeneze na základě DNA hybridizace pro účely testování *cross-species* mikrosatelitů má tak svá omezení, jak faktická, tak i praktická a v dnešní době se již běžně nepoužívá (Sheldon *et al.*, 1999).

Při pozdější *cross-species* studii na ptácích, byla fylogeneze založena na porovnání sekvencí cytochromu *b* (Primmer *et al.*, 2005). Takto stanovená relativní fylogenetická vzdálenost opět potvrdila již známý fakt negativní korelace fylogenetické vzdálenosti a úspěšnost amplifikace mikrosatelitů.

Problém při výběru mikrosatelitů pro *cross-species* testování však nastává, pokud není možnost zjištění fylogenetické příbuznosti testovaného druhu ke skupinám případných zdrojových druhů. Současné taxonomické třídění sice již značnou měrou vychází ze zjištěných fylogenetických poměrů, ale velká část systému je stále fylogeneticky nedokonalá. Ilustruje to zjištění při testování mikrosatelitů, kdy u členovců v rámci rodů i mezi rody není dosahováno zdaleka tak úspěšné amplifikace a polymorfizmu jako u ostatních skupin bezobratlých a obratlovců (Barbara *et al.*, 2007). Jiným příkladem může být značně rozdílná klasifikace ptáků založená na anatomických versus molekulárních znacích (Hedges & Sibley, 1994; Tuinen *et al.*, 2001).

S přibývajícím počtem sekvencí v databázích získaných sekvencováním celkové mRNA byl zjištěný výskyt mikrosatelitů (Ruyter-Spira *et al.*, 1998). U takto získaných lokusů (ze sekvencí EST – *expressed sequence tag*) se prokázala větší míra úspěšné *cross-species* amplifikace. Tato větší konzervovanost mikrosatelitů je zapříčiněna jejich přítomností v kódujících oblastech genomu, které nepodléhají tak rychlým mutacím jako nekódující oblasti. Jejich *cross-species* použití na vzdálenější druhy se však také ukázalo jako omezené. Díky své konzervovanosti vykazují tyto mikrosatelity navíc v průměru nižší polymorfizmus v porovnání s ostatními lokusy. Nová metoda odvozování EST-mikrosatelitů však odstranila problém jejich širšího *cross-species*

využití (Dawson *et al.*, 2010). Za použití bioinformatických nástrojů se vyhledají v EST databázích takové polymorfní mikrosatelity, které jsou společné pro fylogeneticky vzdálené druhy. Takto selektované lokusy se pak s vysokou úspěšností amplifikují a zachovávají si svůj polymorfismus napříč širokým spektrem druhů. Tento přístup byl úspěšně otestován na ptácích, kteří jsou známí svým velmi nízkým výskytem mikrosatelitů v genomu. S téměř exponenciálním nárůstem EST sekvencí a stále nižšími cenami na jejich získání se tato metoda může brzy stát jedním ze standardů pro objevování a výběr „univerzálních“ *cross-species* mikrosatelitů.

Mezi další podmínky, které ovlivňují úspěšnost amplifikace a zachování polymorfismu, patří počet repetice daného lokusu. Čím větší počet repetice, tím větší pravděpodobnost zachování polymorfismu u zkoumaného druhu. Naopak typ repetice (di-, tri-, tetranukleotidová) nebo jejich složení (jednoduchá, složená) nemá na *cross-species* amplifikaci výrazný vliv. Mezi další podmínky, které mají vliv, patří rozmnožovací systém a generační čas daného druhu. Čím delší je čas nutný pro pohlavní rozmnožení, tím větší je pravděpodobnost zachování amplifikace / polymorfismu určitého lokusu u příbuzného druhu. Tyto podmínky zapříčiňují pomalejší hromadění mutací a tak větší konzervativnost mikrosatelitů (Primmer *et al.*, 2005).

Po výběru mikrosatelitů pro *cross-species* testování se všeobecně používá snížení *annealing* teploty ( $T_a$ ) během PCR reakce. Tento krok výrazně zvyšuje úspěšnost amplifikace pomocí *cross-species* primerů. Snížení teploty však přináší nebezpečí amplifikace paralogních lokusů, které mohly během evoluce vzniknout duplikací nebo jiným mutačním procesem (Barbara *et al.*, 2007). Během PCR reakce tak mohou vzniknout polymorfní produkty, které však obsahují jiný typ repetice. Pouze sekvenací *cross-species* PCR produktu a jeho srovnáním s původní sekvencí lokusu zdrojového druhu lze potvrdit pravou homologii.

Každý zjištěný polymorfní *cross-species* mikrosatelit tak v důsledku ušetří při výzkumu nejen čas a značné finanční prostředky, ale následně také napomůže při rekonstrukci fylogeneze dané skupiny.

### **3.2. Evoluce mikrosatelitů**

Mutační dynamikou a evolucí mikrosatelitů se již zabývalo mnoho studií (Schlötterer, 2000; Neff & Gross, 2001) a bylo popsáno několik mutačních modelů

(SMM, IAM, KAM, TPM) snažících se vysvětlit generování nových alel (Kimura & Crow, 1964; Crow & Kimura, 1970; Kimura & Ohta, 1978; di Rienzo *et al.*, 1994). Objevené mutační mechanismy popisovaly jak prodlužování, tak zkracování délky mikrosatelitů, jiné se zase snažily vysvětlit samotný vznik a distribuci mikrosatelitů napříč celým genomem eukaryotických organismů (Messier *et al.*, 1996). Dlouho však nikdo nepřišel s ucelenou a komplexní teorií evoluce mikrosatelitů podepřenou funkčním matematickým modelem, který by ji podporoval (Buschiazzo & Gemmell, 2006). Jako první přišel s takzvaným "životním cyklem" mikrosatelitů Amos (1999) a toto navrhované schéma bylo brzy doplněno popisem zániku mikrosatelitových lokusů (Taylor *et al.*, 1999) a jejich případným opětovným vznikem (Chambers & MacAvoy, 2000).

Nové mikrosatelitové lokusy mohou vzniknout v unikátních sekvencích genomu takzvaně *de novo* (Messier *et al.*, 1996) nebo jejich přenesením do budoucího místa vzniku již ve své prvotní formě pomocí mobilních elementů (Wilder & Hollocher, 2001). Za základní mechanismus *de novo* vzniku mikrosatelitů se dříve považoval mutační proces substituce bází, který vede k vytvoření proto-mikrosatelitu o dvou repeticích. Pro další expanzi počtu repetic těchto proto-mikrosatelitů byla postulována minimální délka alespoň 8 bp, kde samotný původní počet repetic nehraje hlavní roli. V takovémto stavu již mohou být proto-mikrosatelity náchylné ke svému rozšiřování pomocí DNA *slippage* (Rose & Falush, 1998). Dalším objeveným mutačním mechanismem vedoucím ke vzniku proto-mikrosatelitů je inserce 2-4 bp dlouhých sekvencí. Tyto inzertované úseky ve většině případů kopírují přilehlé báze a tímto zdvojením vzniká proto-mikrosatelit se 4-5 repeticemi, který bez dalších mutací může podléhat DNA *slippage* (Zhu *et al.*, 2000). V případě proto-mikrosatelitů vzniklých substitucí by však bylo zapotřebí dalších mutací, které by vedly k dosažení již zmíněné požadované minimální délky 8 bp pro DNA *slippage*. Takovéto mutace by musely být navíc časté, aby bylo dosaženo takové distribuce proto-mikrosatelitů v genomech, jaké byly skutečně zjištěny. Ve skutečnosti se však žádné další mutace nemusí podílet na rozšiřování a expanzi proto-mikrosatelitů je v těchto případech zajištěna vzácným, ale na délce nezávislým DNA *slippage* (Pupko & Graur, 1999).

Po tomto vzniku mikrosatelitů zajišťuje další generování repetic relativně vysoký mutační poměr avšak se širokým rozpětím  $10^{-7}$  až  $10^{-3}$  mutací na lokus za generaci (Buschiazzo & Gemmell, 2006). Rychlost mutování mikrosatelitu je rozdílná druhově, individuálně, lokusově a dokonce i alelově v rámci jednoho lokusu což

způsobuje výše uvedenou variabilitu rychlosti. Při fylogenetických studiích pak může tato různorodost způsobovat obtíže s přiřazením mutační rychlosti k absolutní časové ose (McDonald & Potts, 1997; Petren *et al.*, 1999). Sledování mutační dynamiky navíc stěžuje i zjištěný fakt, že závislost rychlosti mutací na délce lokusu, resp. počtu repetice, má spíše exponenciální než lineární vztah (Lai & Sun, 2003). I přes složitý a rychlý vývoj a navzdory predikci několika možných mutačních procesů ovlivňujících růst, patří jednoduchý DNA *slippage* při replikaci mikrosatelitů k naprosto dominantním procesům generujícím tuto dynamiku (Klitsch *et al.*, 2004). Růst délky lokusů by tak teoreticky mohl dosahovat nekontrolovatelných rozměrů, ale v mutačních procesech jsou i mechanismy, které tento nekontrolovaný růst zastavují.

Konečného limitu expanze dosahují mikrosatelity při dosažení určité délky, kdy se v repeticích začínají hromadit bodové mutace a dochází tak k přerušení linie repetice (Kruglyak *et al.*, 1998). Samotný vznik nukleotidových interupcí je ale nedostatečný pro udržení délkového omezení lokusů, jelikož mohou být opět odstraněny pomocí DNA *slippage* (Harr *et al.*, 2000). Je to právě DNA *slippage*, který zajišťoval růst a který nyní vede ke zkracování, protože lineární až exponenciální vztah vedoucí k prodlužování krátkých mikrosatelitů funguje exponenciálně i v opačném směru a silně působí proti lokusům obsahujícím velký počet repetice (Xu *et al.*, 2000). Tak může probíhat zkracování počtu repetice až na úroveň, kdy jsou náchylnější k opětovnému prodlužování. Ve výsledku jsou tak oba mutační směry v rovnováze a udržují velikost mikrosatelitu v kompromisní velikosti. Vznik nových mutací narušujících repetice přesto stále probíhá a má na mutační dynamiku stále větší konzervativní vliv. V důsledku toho se může mikrosatelit změnit v naprosto monomorfní nebo dále degenerovat až do podoby jen několika kryptických repetice. Tento stav může být udržen po dlouhou dobu což může demonstrovat *cross-species* amplifikace monomorfních lokusů blízkých taxonů (Taylor *et al.*, 1999). Po úplném rozpadu repetice, které by připomínaly původní mikrosatelit, dochází k jeho zániku. Z těchto zbytků je teoreticky možný sekundární vznik a opětovná expanze, čímž by došlo k uzavření evolučního koloběhu vzniku a zániku mikrosatelitu. K dokázání tohoto životního cyklu ale bude zapotřebí důkladná komparativní analýza celogenomových databází širokého spektra druhů, aby byl tento děj průkazně dokázán (Buschiazzi & Gemmell, 2006).

### 3.3. Mikrosatelity ve fylogenezi

Pro *cross-species* testování mikrosatelitů se vybírají druhy fylogeneticky příbuzné, kdy je fylogeneze založena na molekulárních nebo morfologických znacích, jak již bylo uvedeno výše. Avšak i samotné mikrosatelity mohou být použity pro sestrojení fylogenetického stromu, ať již v rámci druhu mezi jednotlivými populacemi nebo mezi příbuznými druhy (Bowcock *et al.*, 1994; Taylor *et al.*, 1999). Odvozování fylogenetických příbuzností z mikrosatelitových sekvencí ale není zdaleka tak spolehlivé, jako z jiných konzervativních sekvencí, např. cytochromu *b* (Primmer *et al.*, 2005). Tato relativní nespolehlivost je dána vyšší rychlostí jakou mikrosatelity podléhají mutacím. Při rekonstrukci fylogeneze blízké příbuzných druhů, například v rámci rodu, se však ukázaly jako velice užitečné a s vysokou vypovídací hodnotou při použití dostatečného počtu lokusů (Zhu *et al.*, 2000).

Po svém nástupu se mikrosatelity ukázaly jako téměř nepostradatelné při vnitrodruhových studiích. O to větší bylo překvapení, když se začalo s jejich využitím při rekonstrukci fylogenetického vývoje příbuzných druhů, kdy nebylo možné získat průkazná či vůbec použitelná data. Tento problém byl způsoben jejich použitím ve standardních algoritmech produkujících fylogenetickou topologii, bez zahrnutí přirozené dynamiky mikrosatelitových sekvencí, která je značně rozdílná od ostatních sekvencí v genomu eukaryot. Mezi hlavní body, na které se musí při analýzách pamatovat, tedy patří rychlé a přitom silně nepravidelné mutace a omezení repetice výrazně diverzifikovat do délky (Goldstein & Pollock, 1997). Pokud se však v evolučním kontextu zohlední jedinečné biologické vlastnosti hypervariabilních mikrosatelitů, je možné dosáhnout konsenzuálního a věrohodného fylogenetického stromu. Jedinečné vlastnosti mikrosatelitů se mohou zohlednit například vytvořením algoritmu tzv. na míru (Shriver *et al.*, 1995) nebo začleněním mutačních modelů zohledňujících jejich evoluční dynamiku (například *Infinite Allele Model* nebo *Stepwise Mutation Model*) do běžně užívaných algoritmů (Takezaki & Nei, 1996).

Aby byla jakákoliv fylogenetická analýza vůbec možná, je nutno nejdříve získat potřebnou sadu polymorfních mikrosatelitů pro druh, který považujeme za nejvíce ancestrální pro danou skupinu druhů. Z těchto mikrosatelitů pak nejlépe pomocí *cross-species* amplifikace u předpokládaných odvozených druhů vybrat ty, které si svůj polymorfismus zachovávají a použít je pro vlastní studii (Chambers & MacAvoy, 2000). Pro získání co nejlepších dat však nelze použít jakékoliv polymorfni

mikrosatelity. Pokud fylogenetická analýza překračuje hranici poddruhů, je mnohem vhodnější vybírat lokusy s nižší alelickou diverzitou, což je paradoxní ve srovnání s vnitrodruhovými studii, kdy je naopak žádoucí co nejvyšší počet alel (Goldstein & Pollock, 1997).

Překonáním prvotních obtíží a vynaložením úsilí na zdokonalení metod analýz se nakonec ukázala pozitiva použití mikrosatelitů v určitých oblastech studia fylogeneze. Pomocí nich lze odvodit fylogenezi i u natolik příbuzných druhů, kde již jiné molekulární postupy selhávají. Navíc u nich lze s větší spolehlivostí použít metodu tzv. absolutního genetického datování (Goldstein *et al.*, 1995), kdy lze v analýze použít míru diferenciací mikrosatelitů, tedy mutační rychlost jednotlivých lokusů zjištěnou z rodokmenů, případně experimentálně. Takto zjištěná rychlost a direkcionálna mutací vede k mnohem přesnějšimu historickému datování než kalibrování a následná korelace molekulárních analýz s paleontologickými nálezy. Další výhodou je rovnoměrný výskyt mikrosatelitů napříč genomem poskytující ucelenější obraz o změnách během fylogeneze, než srovnávání jedné nebo několika genových sekvencí určité genomové oblasti. Pro všechny výše uvedené klady je potřeba mít na paměti, že platí pouze pro studium blízce příbuzných druhů a že pro plné využití těchto výhod je nezbytný pečlivý výběr jednotlivých lokusů použitých v analýze (Goldstein & Pollock, 1997).

### **3.4. Analýza rodičovství**

Objasňování rodičovských vztahů v populacích pohlavně se rozmnožujících organismů patří k základním výzkumným přístupům v molekulární ekologii. Podrobné rodičovské analýzy mohou zjistit genetickou diverzitu dané populace (Evans & Sheldon, 2008), odhalit skutečné rozmnožovací návyky (Lindstedt *et al.*, 2007), u ohrožených druhů pomoci s ochrannými opatřeními a u druhů držených v zajetí poskytnout nenahraditelné informace k správnému sestavení rozmnožovacího programu nepříbuzných jedinců (Haig, 1998). I přes své široké použití je analýza rodičovství poměrně mladou metodou genetické analýzy. Věrohodné testy rodičovství sice již umožnila metoda DNA *fingerprinting*, která byla záhy po svém vzniku využita ke studiu ptáků (Burke & Bruford, 1987), avšak skutečného rozkvětu se analýza rodičovství dočkala až s objevem mikrosatelitů (Tautz, 1989). Mikrosatelitové markery se ukázaly jako vysoce polymorfní, kodominantní a hlavně jednoduše detekovatelné

a hodnotitelné (Awise, 2004), proto jsou z dostupných markerů naprosto perfektní volbou pro analýzu rodičovství.

Přístupy, které se v analýze rodičovství uplatňují lze rozdělit celkem do 6 kategorií. Popis prvních 4 metod shrnuli již dříve ve své práci Jones & Ardren (2003), jsou to *Exclusion* (Chakraborty *et al.*, 1974), *Categorical allocation* (Meagher & Thompson, 1986), *Fractional allocation* (Devlin *et al.*, 1988) a *Parental reconstruction* (Jones, 2001). S rozvojem počítačových statistických analýz přibyly další dvě, *Sibship reconstruction* (Thomas & Hill, 2002) a *Full probability parentage analysis* (Hadfield *et al.*, 2006).

#### **3.4.1. *Exclusion***

Princip tohoto přístupu, který je stejně jako ostatní metody založen na Mendelistické dědičnosti sledovaných znaků (mikrosatelitů), je velmi jednoduchý. Vychází ze zákonitosti, že potomek a rodič musí sdílet jednu stejnou alelu daného lokusu. Pokud potomek nesdílí s potenciálním rodičem ani jednu alelu sledovaného lokusu, může být tento rodič vyloučen jako biologický (Chakraborty *et al.*, 1974). Takto jednoduché hodnocení však má i svá úskalí. K špatnému hodnocení a zamítnutí biologického rodiče může vést mutace v zárodečné linii, která dá vznik nové alele u potomka. Další možností je, že je rodič heterozygot pro nulovou alelu, kterou potomek získal (Pemberton *et al.*, 1995). Tyto mutace nejsou příliš časté, ale při rodičovských analýzách je třeba na ně brát zřetel. Z důvodu možných mutací a pro dostatečnou průkaznost testování se proto sleduje hned několik lokusů a pro vyloučení rodičovství je zapotřebí neshody minimálně ve dvou lokusech. Jiným možným omezením této metody je obtížné hodnocení většího počtu potomků a možných rodičů, u takovéto komplikovanější problematiky již nastupují sofistikovanější přístupy. I přesto patří tato metoda k základům v analýze rodičovství (Jones *et al.*, 2009).

#### **3.4.2. *Categorical allocation***

V případě rozsáhlejšího počtu testovaných jedinců, kdy použití výše uvedeného přístupu nevede k jednoznačnému výběru rodiče (rodičů), nastupuje tato metoda. Jelikož se při rodičovských analýzách populací pracuje s velkým počtem jedinců, patří *categorical allocation* k tomu nejpoužívanějšímu způsobu odhalování příbuzenských vazeb. Tato metoda staví na předpokladu, že různé rodičovské genotypy mají různou pravděpodobnost přenosu na potomka (Meagher & Thompson, 1986). Pokud má



například potomek určitou alelu, je pravděpodobnější, že ji zdědil od homozygotního otce pro tuto alelu, než od otce heterozygotního. Tímto způsobem je možné vybrat ze skupiny potenciálních, nevyloučených rodičů toho nejvíce pravděpodobného. Tento statistický přístup může být uplatněn, když známe jednoho z rodičů již předem nebo když neznáme ani jednoho rodiče. Dle toho jsou také různé studie rodičovství zaměřeny na různé konkrétní cíle a jelikož lze tuto metodu statisticky uzpůsobit daným potřebám, činí ji tato flexibilita mocnou a široce používanou metodou (Marshall *et al.*, 1998).

### **3.4.3. Fractional allocation**

Tato metoda se ve svém statistickém využití pravděpodobnosti od předchozí metody teoreticky neliší. Hlavním rozdílem však je, že *categorical allocation* přiřazuje celého potomka k jednomu (příp. k oběma) z předpokládaných rodičů, zatímco *fractional allocation* přiřazuje potomka částečně k několika rodičům na základě jejich relativní pravděpodobnosti být skutečným biologickým rodičem (Devlin *et al.*, 1988). Logicky se zdá být tato metoda naprosto nepoužitelná, jelikož ze své podstaty nemůže odhalit biologického rodiče. Žádný potomek nemůže mít částečně 2 nebo více biologických otců. Výhodou této metody však je, že disponuje lepšími statistickými vlastnostmi pro testování určitých hypotéz. Pokud je zapotřebí v rámci populační studie odhadnout například rozdíly v reprodukčním úspěchu, je tato metoda nebo její modifikace (Nielsen *et al.*, 2001) mnohem lepší volbou než *categorical allocation*.

### **3.4.4. Parental reconstruction**

Při studiu některých druhů máme někdy možnost zajištění vzorků, u kterých již před samotným testováním víme, že pocházejí ze stejné rodiny. Může se jednat třeba o masu vajíček obojživelníků (Myers & Zamudio, 2004) a podobně, kde máme jistotu, že potomstvo má shodné oba rodiče nebo alespoň jednoho. Za takovýchto podmínek je možné rekonstruovat genotyp rodičů aniž by byl od nich přímo získán vzorek DNA (Jones, 2001). V případě velkého počtu vajíček od jedné samice tak lze odvodit možný počet samců podílejících se na oplodnění a tím poodhalit systém párování a nepřímo i genetickou diverzitu v dané populaci. Při sběru vzorků by proto měl být brán zřetel na možnost tohoto testování a vzorky by měly být tříděny tak, aby odpovídaly své příbuznosti. Tato analýza však může být účinná jen s dostatečně polymorfními markery, což již sada několika mikrosatelitů splňuje (Emery *et al.*, 2001). Nevýhodou této

metody je její malá použitelnost u druhů s nízkým počtem potomků. Obecně je proto špatně použitelná u ptáků a savců (Jones *et al.*, 2009) a navíc se stává počítačově velmi náročnou v případech, kdy se na oplození jedné samice podílí více jak 6 samců (Jones & Ardren, 2003).

#### **3.4.5. Sibship reconstruction**

Pokud lze pro studium určité populace zajistit množství vzorků od mláďat, ale nelze odhadnout jejich potenciální příbuzenské vztahy nebo zařazení do rodin, lze použít tuto metodu pro rozřídění do příbuzenských skupin. Tato analýza byla na okraji zájmů v komplexních analýzách paternity, ale s vylepšením výpočetních algoritmů našla své místo v různých studiích (Thomas & Hill, 2002). Stejně jako předchozí metoda, je i tato výpočetně náročná. Využívá dvojího přístupu, v první možnosti analýzy jsou algoritmy založeny na pravděpodobnosti dědění znaků (Smith *et al.*, 2001). Druhý přístup využívá kombinatoriku založenou čistě na mendelistických zákonech dědičnosti (Berger-Wolf *et al.*, 2007). První přístup je stavěn pro velký počet testovaných jedinců, kteří spadají do četných malých rodin, což ve skutečnosti nemusí odpovídat celé škále druhů. Tento nedostatek odstraňuje druhý přístup, jehož použití a výsledky mnohem lépe odpovídají divokým populacím volně žijících druhů. Při testování tak velkého počtu jedinců je však důležité více zohlednit možné chyby již na úrovni chybného genotypování a nulových alel (Wang, 2004).

#### **3.4.6. Full probability parentage analysis**

S výjimkou cíleného testování paternity nebo maternity například u lidí nebo u ohrožených druhů zvířat z důvodu vhodného párování nepříbuzných jedinců, není na úrovni studia populací analýza rodičovství vlastním cílem. Testování se provádí hlavně z důvodu určité výpovědní hodnoty o genetické strukturovanosti a variabilitě dané populace, o systému párování a rozmnožování jedinců apod. Tyto informace pak mohou být použity v oblastech ekologického výzkumu, kvantitativní genetiky i evoluční biologie. Právě tato sofistikovaná metoda řeší uvedené populační otázky komplexně, zároveň s analýzou paternity. Velkou výhodou této metody je, že umožňuje zahrnutí prakticky jakýchkoliv proměnných, majících potenciální vliv na správnost výsledků, do statistického rámce před samotnou analýzou (Hadfield *et al.*, 2006). Lze tak v testování rodičovství zohlednit teritorialitu daného druhu, výskyt dominantních samců, rozmístění jedinců v areálu rozšíření, migrace jedinců mezi populacemi apod. a tak maximálně

využít všechny dostupné relevantní údaje (Neff *et al.*, 2001). Naproti tomu třeba *categorical* a *fractional allocation* vycházejí z předpokladu, že všichni potenciální rodiče zahrnutí v analýze mají stejnou pravděpodobnost být biologickými rodiči testovaných mláďat. Až z těchto výsledků rodičovské analýzy jsou pak odvozovány další populační údaje (Hadfield *et al.*, 2006).

Natolik propracovaný systém má možnost opravdu širokého použití v populačních studiích, avšak pro svou obtížnou statistickou implementaci teprve čeká na plné využití svého potenciálu populačními genetiky a molekulárními ekology (Jones *et al.*, 2009). V ideálních případech a při použití dokonalých genetických markerů, by veškeré výše uvedené metody dávaly vždy stejné výsledky. V reálných situacích a s dostupnými markery tomu tak ale není, proto je vždy důležité posoudit možnosti prováděné studie a vybrat takovou metodu, která by nejlépe splnila plánované cíle.

### **3.5. Faktory ovlivňující kvalitu výsledků rodičovské analýzy**

Existuje řada faktorů, kterými lze přímo ovlivnit kvalitu studií a spolehlivost jejich výsledků. Jako naprosto klíčový faktor v jakékoliv populační studii je kvalita, respektive množství vzorků, které lze získat. Získání vzorků (*sampling*) je nejenom nejdůležitější, ale mnohdy i nejobtížnější část celé studie (Jones *et al.*, 2009). Dalším faktorem je volba vhodného typu markeru pro analýzu. V současné době je tento výběr značně zúžen na použití mikrosatelitů, které dominují rodičovským analýzám (Pemberton, 2009), avšak použití AFLP je stále jistou alternativou (Gerber *et al.*, 2000). V budoucnu je možný nástup a široké použití slibných SNP markerů (Anderson & Garza, 2006).

Mezi faktory, který už nelze výrazně nebo vůbec ovlivnit patří chyby v genotypování jedinců. Mutace, které mění kompozice alel ovlivnit nelze, proto se tento problém řeší až ve statistické analýze. Mutace vedoucí k nulovým alelám jsou sice také statisticky ošetřeny, avšak ne příliš dobře a je lepší se použití mikrosatelitů s prokázanými nulovými alelami vyhnout. K špatně zjištěnému genotypu lze ale dojít i bez interferujících mutací, kdy je možné prosté špatné přečtení alelové kompozice, selhání amplifikace (ne z důvodu nulové alely) nebo při vzniku špatně hodnotitelných produktů. Na tyto chyby je nutné brát zřetel a nespoléhat pouze na statistické odstranění těchto nejistot (Hoffman & Amos, 2005).

Jako stěžejní proměnné v rodičovské analýze ovlivňující spolehlivost výsledků jsou tedy brány chyby v genotypování a množství rodičů, respektive celkový počet jedinců zahrnutých v testování (Jones *et al.*, 2009).

### **3.6. Nové mikrosatelitové lokusy pro plameňáky**

Popisem nových mikrosatelitů pro plameňáky se doposud zabývaly 2 disertační práce (Kapil, 2005; Preston, 2005), u kterých nebyly výsledky zatím publikovány a francouzský tým (Geraci *et al.*, 2010). Úspěšné *cross-species* amplifikace mikrosatelitových lokusů až na výjimku (Nádvořník *et al.*, 2008) zatím nebyly publikovány.

Pro rozšíření *cross-species* testování mikrosatelitů u plameňáka růžového a karibského jsem k 70 párům primerů testovaných v mé bakalářské práci (Drobek, 2008) přidal dalších 214 mikrosatelitů. Kritéria pro výběr testovaných mikrosatelitů se držela stejných podmínek fylogenetické příbuznosti (morfoloická i molekulární příbuznost) jako v mé bakalářské práci. Stěžejní dvě skupiny testovaných primerů tvořily mikrosatelity popsané pro druhy z řádu brodivých (Ciconiiformes) a veslonohých (Pelecaniformes). Testování bylo provedeno na 6 nepříbuzných jedincích u obou druhů. Celkový výčet testovaných mikrosatelitů uvádí tabulka č. 1.

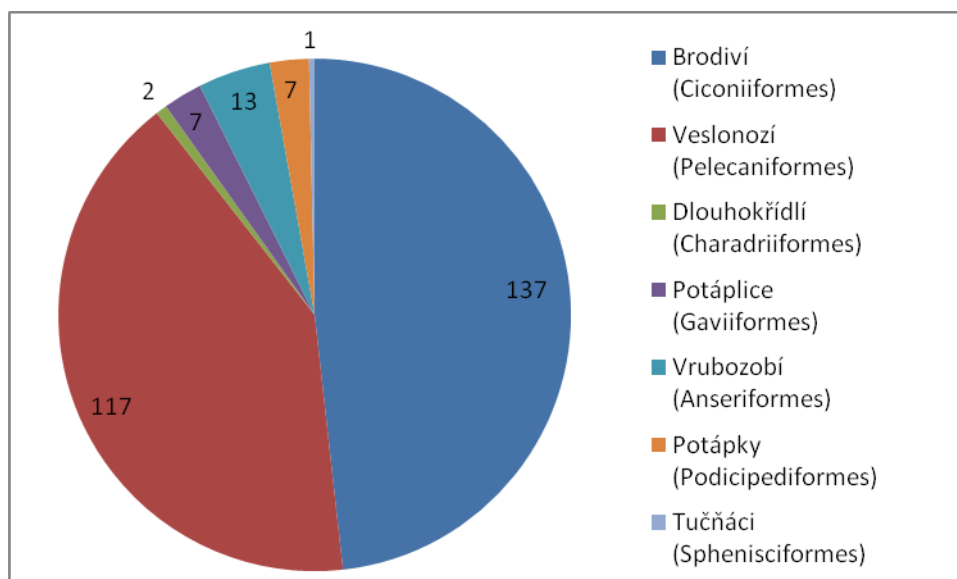
**Tabulka č. 1:** - Seznam zdrojových druhů a jejich mikrosatelitů, které byly použity pro testování u obou druhů plameňáků. Horní část tabulky oddělená čarou reprezentuje mikrosatelity testované již v mé bakalářské práci. Řády: P - Potápky, A - Vrubozobí, G - Potáplice, CH - Dlouhokřídílí, S - Tučňáci. (Piertney *et al.*, 1998; Sachs & Hughes, 1999; van den Bussche *et al.*, 1999; Maak *et al.*, 2000; Roeder *et al.*, 2001; McGuire & Noor, 2002; Maak *et al.*, 2003; Paulus & Tiedemann, 2003; Stai & Hughes, 2003; Tomasulo-Seccomandi *et al.*, 2003; Ji *et al.*, 2004; McMillan *et al.*, 2004; Dawson *et al.*, 2005; Guay *et al.*, 2005; He *et al.*, 2006; Santos *et al.*, 2006; Sawyer & Benjamin, 2006; Dearborn *et al.*, 2008; Duffie *et al.*, 2008; Hickman *et al.*, 2008; de Ponte Machado *et al.*, 2009; Fike *et al.*, 2009; Huang *et al.*, 2009; Shephard *et al.*, 2009; Chang *et al.*, 2009; Yeung *et al.*, 2009; Faircloth *et al.*, 2009; Taylor *et al.*, 2010)

<b>Řád</b>	<b>Zdrojový druh</b>	<b>Testované mikrosatelitové lokusy</b>
<b>Brodíví</b>	Ibis rudý ( <i>Eudocimus ruber</i> )	Eru02, Eru03, Eru04, Eru05, Eru06, Eru07, Eru08, Eru09, Eru10, Eru11
	Kolpík růžový ( <i>Ajaia ajaja</i> )	Aaju1, Aaju2, Aaju3, Aaju4, Aaju5, Aaju6
	Nesyt lesní ( <i>Mycteria americana</i> )	WS $\mu$ 03, WS $\mu$ 08, WS $\mu$ 09, WS $\mu$ 13, WS $\mu$ 14, WS $\mu$ 17, WS $\mu$ 18, WS $\mu$ 19, WS $\mu$ 20, WS $\mu$ 23, WS $\mu$ 24, WS1, WS2, WS4, WS6
	Volavka velká ( <i>Ardea herodias</i> )	Ah 205, Ah 208, Ah 209, Ah 210, Ah 211, Ah 212, Ah 217, Ah 320, Ah 341, Ah 343, Ah 414, Ah 421, Ah 517, Ah 522, Ah 526, Ah 536, Ah 630
<b>Veslonoží</b>	Kormorán galapážský ( <i>Phalacrocorax harrisi</i> )	PhB2, PhB4, PhB11, PhC11, PhD11, PhF12, PhG8, PhG12
	Kormorán velký ( <i>Phalacrocorax carbo</i> )	PcD 2, PcD 4, PcD 5, PcD 6, PcT 1, PcT 3, PcT 4
<b>P</b>	Potápka rudokrká ( <i>Podiceps grisegena</i> )	PgAAT1, PgAAT3, PgAAT6, PgAAT8, PgAAT25, PgAAT34, PgAAT41
<b>Brodíví</b>	Volavka žlutozobá ( <i>Egretta eulophotes</i> )	Ae01, Ae04, Ae05, Ae09, Ae13, Ae24, Ae25, Ae26, Ae27, Ae28, Ae30, Ae35, Ae36, Ae37, Ae38, Ae42, Ae44, Ae47
	Čáp bílý ( <i>Ciconia ciconia</i> )	Cc01, Cc02, Cc03, Cc04, Cc05, Cc06, Cc07, CC1, CC3, CC7, CC9, CC10, CC13
	Ibis čínský ( <i>Nipponia nippon</i> )	NnAF4, NnBF7, NnCE11, NnCG3, NnDD9, NnEB12, NnHB12, NnNF5, NnEA9, NnAD10, NnEH10, NnGF4, NnLF11, Nn01, Nn03,

	Zdrojový druh	Testované mikrosatelitové lokusy
	Ibis čínský ( <i>Nipponia nippon</i> )	Nn04, Nn12, Nn16, Nn17, Nn18, Nn21, Nn23, Nn25, Nn26
	Kvakoš noční ( <i>Nycticorax nycticorax</i> )	nycti14, nycti15, nycti22, nycti26, nycti35, nycti36, nycti41, nycti43, nycti62, nycti68, nycti74
	Kolpík malý ( <i>Platalea minor</i> )	PM1-4, PM1-13, PM1-17, PM2-14, PM2-16, PM2-20, PM2-21, PM2-28, PM2-29, PM2-37, PM2-62, PM2-68, PM2-80, PM3-13, PM3-15, PM3-16, PM3-17, PM3-20, PM3-22, PM3-25, PM3-28, PM3-29, PM3-31
Veslonozí	Terej modronohý ( <i>Sula neboxii</i> )	BOOB-RM2-F07, BOOB-RM3-D07, BOOB- RM3-F11, BOOB-RM4-A08, BOOB-RM4- B03, BOOB-RM4-C03, BOOB-RM4-D07, BOOB-RM4-E03, BOOB-RM4-E10, BOOB- RM4-F11, BOOB-RM4-G03, Sn2A-36, Sn2A- 90, Sn2A-123, Sn2B-68, Sn2B-83, Sn2B-100
	Terej červenonohý ( <i>Sula sula</i> )	Ss1b-16, Ss1b-51, Ss1b-57, Ss1b-98, Ss1b-106, Ss1b-142, Ss2b-2, Ss2b-35, Ss2b-48, Ss2b-71, Ss2b-88, Ss2b-92, Ss2b-110, Ss2b-138, Ss2b-153
	Terej guánový ( <i>Sula variegata</i> )	Sv2A-2, Sv2A-26, Sv2A-47, Sv2A-50, Sv2A- 53, Sv2A-95, Sv2A-152, Sv2B-27, Sv2B-138
	Kormorán ušatý ( <i>Phalacrocorax auritus</i> )	COR 01, COR 03, COR 05, COR 06, COR 07, COR 12, COR 15, COR 17, COR 19, COR 20, COR 21, COR 22, COR 23, COR 26, COR 28, COR 30, COR 31, COR 35, COR 38, COR 40, COR 41, COR 43, COR 45, COR 47
	Fregatka obecná ( <i>Fregata minor</i> )	Fmin01, Fmin02, Fmin03, Fmin04, Fmin05, Fmin06, Fmin07, Fmin08, Fmin09, Fmin10, Fmin11, Fmin12, Fmin13, Fmin14, Fmin15, Fmin16, Fmin17, Fmin18

	Zdrojový druh	Testované mikrosatelitové lokusy
V	Pelikán severoamerický ( <i>Pelecanus erythrorhynchos</i> )	PeEr 01, PeEr 02, PeEr 03, PeEr 04, PeEr 05, PeEr 06, PeEr 07, PeEr 08, PeEr 09
	Pelikán bílý ( <i>Pelecanus onocrotalus</i> )	PEL086, PEL149, PEL175, PEL185, PEL188, PEL190, PEL207, PEL221, PEL265, PEL304
	Kachna divoká ( <i>Anas platyrhynchos</i> )	APH07, APH08, APH09, APH12, APH13, APH16
	Kachnice laločnatá ( <i>Biziura lobata</i> )	BIm1, BIm10, BIm12
G	Pižmovka velká ( <i>Cairina moschata</i> )	CmAAT16, CmAAT35, CmAAT38,
	Kajka mořská ( <i>Somateria mollissima</i> )	Smo10
CH	Potáplice lední ( <i>Gavia immer</i> )	GimA9EPA, GimA12EPA, GimC5EPA, GimC11EPA, GimD9EPA, GimD12EPA, GimE11EPA
S	Alkounek drobný ( <i>Aethia pygmaea</i> )	Apy06, Apy07
	Tučňák kroužkový ( <i>Pygoscelis adeliae</i> )	AM13

Graf č.1 - Souhrný přehled počtu testovaných mikrosatelitů z jednotlivých řádů.



## 4. Materiál a metody

### 4.1. Izolace DNA z krve pro účely PCR

Izolace byla provedena dle postupu Maniatis *et al.* (1982) s ohledem na technické podmínky laboratoří Katedry buněčné biologie a genetiky PřF UP v Olomouci. Krev pro izolaci byla uchována v 2ml mikrozkuvkách obsahující 1 ml Queen's pufru (Seutin *et al.*, 1991). Izolovaná DNA byla rozpuštěna v TE pufru a po stanovení její koncentrace pomocí fluorometru byla uchována při -20 °C. Podrobný postup izolace DNA je uveden v mé bakalářské práci (Drobek, 2008).

### 4.2. PCR amplifikace DNA

Složení PCR mixu pro 6 vzorků (včetně započítaných ztrát při pipetování) pro testované primery:

Deionizovaná voda	45 µl
Storage Buffer 10x (10 mmol/l Tris-HCl, 50 mmol/l KCl, 0,1% Triton X-100)	6,7 µl
Roztok MgCl <sub>2</sub> o koncentraci 25 mmol/l	4,0 µl
Roztok dNTPs o koncentraci 20 µmol/l	0,7 µl
Primer F o koncentraci 10 µmol/l	3,3 µl
Primer R o koncentraci 10 µmol/l	3,3 µl
aTaq DNA polymeráza 50x	1,2 µl

Mikrozkuvku po napipetování všech složek zvortexovat a krátce zcentrifugovat. Každá reakce sestává z 9 µl PCR mixu a 1 µl roztoku DNA o koncentraci 10 - 50 µg/ml.

Základní testovací časový a teplotní profil PCR reakce:

3. 94 °C: 5 min
  4. 94 °C: 30 s
  - 50 °C: 30 s
  - 72 °C: 30 s
  5. 72 °C: 7 min
- } 35 cyklů



### 4.3. Elektroforetická separace PCR produktů

1. Veškeré zpracování PCR produktů bylo provedeno na vyhřívané sekvenační elektroforetické komůrce S2 Whatman Biometra, s rozměry skel 333 x 392 mm a 333 x 418 mm a tloušťkou gelu 0,4 mm.
2. Po důkladném omytí a osušení obou skel se aktivní plocha většího skla ošetří přípravkem na odpuzování vody a menšího skla molekulárním lepidlem. Po zaschnutí se opláchnou deionizovanou vodou, resp. 96% ethanolem.
3. Mezi skla přiložená aktivními stranami k sobě a oddělená spacers se aplikuje připravený 6% polyakrylamidový gel. Poklepem se zajistí rovnoměrné rozlití gelu mezi skla, zasune se hřebínek rovnou stranou do gelu (cca 1 cm) a přichytí se klipsy. Gel se nechá hodinu polymerizovat.
4. Přebytečný zatuhlý gel se odstraní a skla se omyjí a osuší. Po vložení do elektroforetické komůrky, zalití anodového i katodového prostoru 0,5x TBE pufrem a vytažení hřebínku se nechá gel nahřívát při 90 W (3000 V / 150mA) zhruba 30 minut.
5. Ke vzorkům se před nanášením přidá 5  $\mu$ l nanášecího pufru a ty se nechají 4 minuty denaturovat. Mezitím se do vyčištěné mezery v gelu vloží hřebínek. Vzorky se po denuraci umísťují na led a nanášejí se po 2  $\mu$ l. Separace probíhá při 70 W (3000 V / 150mA).
6. Po ukončení separace se z gelu vyjme hřebínek i spacers a skla se oddělí nožem. Menší sklo s přichyceným gelem se umístí na 20 minut do vaničky s fix/stop roztokem. Poté se 3 krát důkladně omyje deionizovanou vodou a dá do 1% roztoku HNO<sub>3</sub> na 5 minut. Následuje opět důkladné promytí deionizovanou vodou (4 krát) a umístění gelu na 30 minut do roztoku AgNO<sub>3</sub> (používá se opakovaně 5 krát). Dalším krokem je vizualizace PCR produktů, kdy se gel krátce ponoří do deionizované vody a po okapání se zalije vychlazeným roztokem vývojky. Po dostatečném obarvení PCR produktů se reakce zastaví přilítím fix/stop roztoku uchovaným po jeho prvním použití. Veškeré lázně v chemikáliích včetně samotné vizualizace se provádí na třepačce.
7. Takto vyvolaný gel se ponoří na několik minut do deionizované vody a následně nechá usušit v sušárně (60 °C/1 hodina) nebo volně v digestoři přes noc. Po vysušení se gel vyhodnotí, zjistí se výskyt polymorfních mikrosatelitů (testovací gely), případně již frekvence jednotlivých alel (genotypizační gely).
8. Gel se nakonec likviduje v roztoku NaOH (1 mol/l) a sklo je po umytí připraveno k opětovnému použití.

#### 4.4. Chemikálie

- Akrylamid (Serva)
- *aTaq* polymeráza (5U/ $\mu$ l), M1241 (Promega)
- Bromfenolová modř (Serva)
- Deionizovaná voda
- Deoxyribonukleosidtrifosfáty (100 mmol/l, 400  $\mu$ l každý), U1240 (Promega)
- Dusičnan stříbrný (Lachema)
- Ethanol 96% roztok (Seliko Olomouc)
- Ethylendiaminotetraoctan sodný – Na<sub>2</sub>EDTA (Lachema)
- Ethylendiaminotetraoctová kyselina – EDTA (Lachema)
- Formaldehyd (Lachema)
- Formamid (Lachema)
- Hydroxid sodný (Lachema)
- Chlorid sodný (Lachema)
- Kyselina boritá (Lachema)
- Kyselina chlorovodíková – 35% roztok (Lachema)
- Kyselina octová – ledová (Lachema)
- Laurylsíran sodný (SDS) (Lachema)
- 3-methakryloxypropyltrimethoxysilan (Serva)
- Methylenová modř (Serva)
- Močovina (Lachema)
- N-lauroylsarkosin (Sigma)
- N,N' - methylenbisakrylamid (Serva)
- N,N,N',N' - tetramethyletylendiamin (TEMED) (Serva)
- Peroxodisíran amonný (Serva)
- Rain-X (Pennzoil-Quaker State)
- Thiosíran sodný (Lachema)
- Trishydroxymethylaminomethan – (Tris) (Applichem)
- Uhličitan sodný (Lachema)
- Xylenová modř (Applichem)

#### 4.5. Roztoky

Akrylamid : N,N'- methylenbisakrylamid 19:1 – 40% zásobní roztok

- 380 g akrylamidu
- 20 g N,N'- methylenbisakrylamidu
- rozpustit v 500 ml deionizované H<sub>2</sub>O
- objem doplnit na 1 l
- roztok uložit v temné lahvi ve 4 °C

Akrylamid – 6% zásobní roztok

- 420 g močoviny

- 484 ml deionizované H<sub>2</sub>O
- 50 ml 10x TBE
- 150 ml 40% zásobního roztoku akrylamid : N,N'-methylenbisakrylamid 19:1
- po rozpuštění všech složek zfiltrovat a uložit v temné lahvi ve 4 °C

#### Dusičnan stříbrný AgNO<sub>3</sub> – 0,1% roztok

- 0,8 g AgNO<sub>3</sub>
- objem doplnit deionizovanou H<sub>2</sub>O na 800 ml
- před použitím přidat 1,2 ml formaldehydu

#### Fix/stop roztok

- 80 ml ledové kyseliny octové
- objem doplnit deionizovanou H<sub>2</sub>O na 800 ml

#### Hydroxid sodný NaOH (1 mol/l)

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

#### Roztok 1% kyseliny dusičné HNO<sub>3</sub>

- 12 ml 65% HNO<sub>3</sub>
- objem doplnit deionizovanou H<sub>2</sub>O na 800 ml

#### Molekulární lepidlo

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

#### Nanášecí pufr pro elektroforézu

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

#### Peroxodisíran amonný (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub> – 10% roztok

- 1 g peroxodisíranu amonného (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>
- rozpustit v 10 ml deionizované H<sub>2</sub>O
- uchovávat v mikrozkušavkách po 400 µl v – 20 °C

#### Polyakrylamidový 6% gel

- 60 ml 6% zásobního roztoku akrylamidu
- 400 µl 10% roztoku peroxodisíranu amonného (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>
- 40 µl N, N, N', N' - tetramethylethyldiaminu

#### Queen's pufr

- 10 ml zásobního roztoku Tris 1 mol/l, pH 8,0
- 2 ml zásobního roztoku NaCl (5 mol/l)

- 2,92 g EDTA
- 10 g N-Lauroylsarkosinu
- rozpustit v 900 ml deionizované vody
- pH upravit na 7,5
- doplnit deionizovanou vodou na 1 l

TBE pufr – 10x zásobní roztok

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

Vývojka (před použitím vychlazená pod 10 °C)

- 24 g uhličitanu sodného  $Na_2CO_3$
- objem doplnit deionizovanou  $H_2O$  na 800 ml
- uložit ve 4 °C
- před použitím přidat 1,2 ml formaldehydu a 160  $\mu$ l 1% roztoku thiosranu sodného  $Na_2S_2O_3$

#### 4.6. Přístrojové vybavení

- elektroforetický zdroj ECPS 3000/150 (Pharmacia)
- elektroforetický zdroj EV232 (Consort)
- hybridizační pec Hybridiser HB-2D (Techne)
- laboratorní analytické váhy AE240 (Mettler)
- laboratorní váhy EK-200g (AND)
- magnetická míchačka RCTbasic (Ika)
- mikropipety Finnnpipette 0,5-10  $\mu$ l (osmikanálová) a 0,3-1000  $\mu$ l (ThermoLabsystem)
- mikropipety Nichipipet EX 0,5-1000  $\mu$ l (Nichiryo)
- minicentrifuga E-centrifuge (Wealtec)
- negatoskop NEGA1 (Maneko)
- pH metr OP 208/1 (Radelkis)
- sekvenační elektroforetické komůrky S2 (Whatman Biometra)
- sušárna HS 122A (Chirana)
- temperovaný blok Dri-block DB-2D (Techne)
- termocyklér XP Thermal Cyclers (BIOER technology)
- třepačka Orbit 1900 (Labnet International)
- vortex MS2 (Ika)
- výrobník deionizované a ultračisté vody (AquaOsmotic)
- výrobník ledu Icematic F100 Compact (Castel Mac)

## **5. Výsledky**























## 6. Diskuze

















## 7. Závěr

Ve své diplomové práci jsem se zabýval potenciálem *cross-species* amplifikace mikrosatelitových lokusů a jejich využitím v analýze rodičovství u dvou druhů plameňáků. Do testování jsem zahrnul širokou škálu zdrojových druhů s různým stupněm taxonomické příbuznosti.

Z velkého počtu 284 mikrosatelitů, které jsem podrobil testování jsem objevil 29 polymorfních lokusů pro plameňáka růžového (*Phoenicopterus roseus*) s průměrným počtem 5,07 alel na lokus a 33 polymorfních lokusů pro plameňáka karibského (*P. ruber*) s průměrným počtem 4,15 alel na lokus. Z těchto mikrosatelitů jsem vybral 9 lokusů společných pro oba druhy, které jsou nejvhodnější pro rodičovskou analýzu.

V této práci se mi podařilo dosáhnout všech cílů, které byly stanoveny na začátku této práce.



## 8. Seznam zkratek

AFLP	polymorfizmus délky amplifikovaných fragmentů ( <i>Amplified Fragment Length Polymorphism</i> )
bp	pár bází ( <i>base pair</i> )
DNA	deoxyribonukleová kyselina
dNTPs	směs deoxyribonukleosid trifosfátů
EDTA	etylendiaminotetraoctová kyselina
EST	<i>Expressed Sequence Tag</i>
IAM	mutační model nekonečných alel mikrosatelitů ( <i>Infinite Allele Model</i> )
KAM	mutační model K alely mikrosatelitů ( <i>K-Allele Model</i> )
mRNA	mediátorová ribonukleová kyselina
Na <sub>2</sub> EDTA	sodná sůl kyseliny etylendiaminotetraoctové
PCR	polymerázová řetězová reakce ( <i>Polymerase Chain Reaction</i> )
RAPD	polymorfizmus náhodně amplifikované DNA ( <i>Random Amplified Polymorphic DNA</i> )
RFLP	polymorfizmus délky restrikčních fragmentů ( <i>Restriction fragment length polymorphism</i> )
RNA	ribonukleová kyselina
SDS	lauryl síran sodný ( <i>Sodium Dodecyl Sulphate</i> )
SMM	krokový mutační model mikrosatelitů ( <i>Stepwise Mutation Model</i> )
SNP	jednonukleotidový polymorfizmus ( <i>Single Nucleotide Polymorphism</i> )
T <sub>a</sub>	teplota annealingu ( <i>annealing temperature</i> )
TPM	dvoufázový mutační model mikrosatelitů ( <i>Two Phase Model</i> )

## 9. Použitá literatura

- Amos, W. (1999): A comparative approach to study the evolution of microsatellites. In: Goldstein, D., Schlötterer, C., editors. *Microsatellites - Evolution and Applications*. New York: Oxford University Press, pp 60-79.
- Anderson, E.C., Garza, J.C. (2006): The power of single-nucleotide polymorphisms for large-scale parentage inference. *Genetics*, 172, 2567-2582.
- Avise, J.C. (2004): *Molecular Markers, Natural History, and Evolution*. 2. edition, Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Barbará, T., Palma-Silva, C., Paggi, G.M., Bered, F., Fay, M.F., Lexer, C. (2007): Cross-species transfer of nuclear microsatellite markers: potential and limitations. *Molecular Ecology*, 16, 3759-3767.
- Berger-Wolf, T.Y., Sheikh, S.L., DasGupta, B., Ashley, M.V., Caballero, I.C., Chaovalitwongse, W., Putreva, S.L. (2007): Reconstructing sibling relationships in wild populations. *Bioinformatics*, 23, i49-i56.
- Bowcock, A.M., Ruiz Linares, A., Tomfohrde, J., Minch E., Kidd, J.R., Cavalli-Sforza, L.L. (1994): High resolution of human evolutionary trees with polymorphic microsatellites. *Nature*, 368, 455-457.
- Burke, T., Bruford, M.W. (1987): DNA fingerprinting in birds. *Nature*, 327, 149-152.
- Buschiazzo, E., Gemmell, N.J. (2006): The rise, fall and renaissance of microsatellites in eukaryotic genomes. *BioEssays*, 28, 1040-1050.
- Chakraborty, R., Shaw, M., Schull, M.J. (1974): Exclusion of paternity: the current state of the art. *American Journal of Human Genetics*, 26, 477-488.
- Chambers, G.K., MacAvoy, E.S. (2000): Microsatellites: consensus and controversy. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part B: Biochemistry & Molecular Biology*, 126, 455-476.
- Chang, Q., Xie, Z., Li, Q., Zhou, K. (2009): Microsatellite loci developed for black-crowned night-heron (*Nycticorax nycticorax*) and their cross-amplifications in Ardeidae. *Conservation Genetics*, 10, 1537-1539.
- Crow, J.F., Kimura, M. (1970): *An Introduction to Population Genetics Theory*. Harper & Row, New York.
- Dawson, D.A., Horsburgh, G.J., Küpper, C., Stewart, I.R.K., Ball, A.D., Durrant, K.L., Hansson, B., Bacon, I., Bird, S., Klein, A., Krupa, A.P., Lee, J-W., Martín-Gálvez, D., Simeoni, M., Smith, G., Spurgin, L.G., Burke, T. (2010): New methods to identify conserved microsatellite loci and develop primer sets of high cross-species utility - as demonstrated for birds. *Molecular Ecology Resources*, 10, 475-494.
- Dawson, D.A., Hunter, F.M., Pandhal, J., Buckland, R., Parham, A., Jones, I.L., Bradshaw, M., Jehle, R., 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.
- de Ponte Machado, M., Feldheim, K.A., Sellas, A., Bowie, R.C.K. (2009): Isolation and characterization of 10 polymorphic microsatellite loci from the Great White Pelican (*Pelecanus onocrotalus*) and widespread application to other members of Pelecanidae. *Conservation Genetics*, 10, 1033-1036.
- Dearborn, D.C., Hailer, F., Fleischer, R.C. (2008): Microsatellite primers for relatedness and population structure in great frigatebirds (Pelecaniformes: Fregatidae). *Molecular Ecology Resources*, 8, 1399-1401.

- Devlin, B., Roeder, K., Ellstrand, N.C. (1988): Fractional paternity assignment - theoretical development and comparison to other methods. *Theoretical and Applied Genetics*, 76, 369-380.
- di Rienzo, A., Peterson, A.C., Garza, J.C., Valdes, A.M., Slatkin, M., Freimer, N.B. (1994): Mutational processes of simple-sequence repeat loci in human populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 91, 3166-3170.
- Drobek, A. (2008): Studium paternity u plameňáků (*Phoenicopterus sp.*) pomocí analýzy mikrosatelitové DNA. (Bakalářská práce). Olomouc, Univerzita Palackého, 53 s.
- Duffie, C., Glenn, T.C., Hagen, C., Parker, P. (2008): Microsatellite markers isolated from the flightless cormorant (*Phalacrocorax harrisi*). *Molecular Ecology Resources*, 8, 625-627.
- Emery, A.M., Wilson, I.J., Craig, S., Boyle, P.R., Noble, L.R. (2001): Assignment of paternity groups without access to parental genotypes: multiple mating and developmental plasticity in squid. *Molecular Ecology*, 10, 1265-1278.
- Evans, S.R., Sheldon, B.C. (2008): Interspecific Patterns of Genetic Diversity in Birds: Correlations with Extinction Risk. *Conservation Biology*, 22, 1016-1025.
- Faircloth, B.C., Ramos, A., Drummond, H., Gowaty, P.A. (2009): Isolation and characterization of microsatellite loci from blue-footed boobies (*Sula nebouxi*). *Conservation Genetics Resources*, 1, 159-162.
- Fike, J.A., Devault, T.L., Rhodes, O.E. (2009): Identification of 24 polymorphic microsatellite markers for the double-crested cormorant (*Phalacrocorax auritus*). *Molecular Ecology Resources*, 9, 1183-1185.
- 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*.
- Gerber, S., Mariette, S., Streiff, R., Bodenes, C., Kremer, A. (2000): Comparison of microsatellites and amplified fragment length polymorphism markers for parentage analysis. *Molecular Ecology*, 9, 1037-1048.
- Goldstein, D.B., Linares, A.R., Cavalli-Sforza, L.L., Feldman, M.W. (1995): Genetic absolute dating based on microsatellites and the origin of modern humans. *The Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 92, 6723-6727.
- Goldstein, D.B., Pollock, D.D. (1997): Launching microsatellites: a review of mutation processes and methods of phylogenetic inference. *Journal of Heredity*, 88, 335-342.
- Guay, P.-J., Mulder R. A. (2005): Isolation and characterization of microsatellite markers in musk duck (*Biziura lobata*: Aves), and their application to other waterfowl species. *Molecular Ecology Notes*, 5, 249-252.
- Hadfield, J.D., Richardson, D.S., Burke, T. (2006): Towards unbiased parentage assignment: combining genetic, behavioural and spatial data in a Bayesian framework. *Molecular Ecology*, 15, 3715-3730.
- Haig, S.M. (1998): Molecular contributions to conservation. *Ecology*, 79, 413-425.
- Harr, B., Zangerl, B., Schlötterer, C. (2000): Removal of microsatellite interruptions by DNA replication slippage: phylogenetic evidence from *Drosophila*. *Molecular Biology and Evolution*, 17, 1001-1009.
- He, L-P., Wan, Q-H., Fang, S-G., Xi, Y-M. (2006): Development of novel microsatellite loci and assessment of genetic diversity in the endangered Crested Ibis, *Nipponia Nippon*. *Conservation Genetics*, 7, 157-160.

- Hedges, S.B., Sibley, C.G. (1994): Molecules vs. morphology in avian evolution: the case of the "pelecaniform" birds. *The Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 91, 9861-9865.
- Hickman, C.R., Peters, M.B., Crawford, N.G., Hagen, C., Glenn, T.C., Somers, C.M. (2008): Development and characterization of microsatellite loci in the American white pelican (*Pelecanus erythrorhynchos*). *Molecular Ecology Resources*, 8, 1439-1441.
- Hoffman, J.I., Amos, W. (2005): Microsatellite genotyping errors: detection approaches, common sources and consequences for paternal exclusion. *Molecular Ecology*, 14, 599-612.
- Huang, X., Zhou, X., Chen, M., Fang, W., Chen, X. (2009): Isolation and characterization of microsatellite loci in vulnerable Chinese egret (*Egretta eulophotes*: Aves). *Conservation Genetics*, ONLINE doi: 10.1007/s10592-009-9921-1
- Jame, P., Lagoda, P.J.L. (1996): Microsatellites, from molecules to populations and back. *Trends in Ecology & Evolution*, 11, 424-430.
- Ji, Y.-J., Liu, Y.-D., Ding, C.-Q., Zhang, D.-X. (2004): Eight polymorphic microsatellite loci for the critically endangered crested ibis, *Nipponia nippon* (Ciconiiformes: Threskiornithidae). *Molecular Ecology Notes*, 4, 615-617.
- Jones, A.G. (2001): GERUD1.0: a computer program for the reconstruction of parental genotypes from progeny arrays using multi-locus DNA data. *Molecular Ecology Notes*, 1, 215-218.
- Jones, A.G., Ardren, W.R. (2003): Methods of parentage analysis in natural populations. *Molecular Ecology*, 12, 2511-2523.
- Kalinowski, S.T., Taper, M.L., Marshall, T.C. (2007): Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. *Molecular Ecology*, 16, 1099-1106.
- Kapil, R. (2005): Microsatellite-based genetic profiling for the management of wild and captive flamingo populations : Dissertation. Denton, University of North Texas, 208 pp.
- 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*.
- Kimura, M., Crow, J.F. (1964): The number of alleles that can be maintained in a finite populations. *Genetics*, 49, 725-738.
- Kimura, M., Ohta, T. (1978): Stepwise mutation model and distribution of allelic frequencies in a finite population. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 75, 2868-2872.
- Klintschar, M., Dauber, E.M., Ricci, U., Cerri, N., Immel, U.D., Kleiber, M., Mayr, W.R. (2004): Haplotype studies support slippage as the mechanism of germline mutations in short tandem repeats. *Electrophoresis*, 25, 3344-3348.
- Kruglyak, S., Durrett, R.T., Schug, M.D., Aquadro, C.F. (1998): Equilibrium distributions of microsatellite repeat length resulting from a balance between slippage events and point mutations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 95, 10774-10778.
- Lai, Y., Sun, F. (2003): The relationship between microsatellite slippage mutation rate and the number of repeat units. *Molecular Biology and Evolution*, 20, 2123-2131.
- Li, X., Li, D. (1998): Current state and the future of the crested ibis (*Nipponia nippon*): A case study by population viability analysis. *Ecological research*, 13, 323-333.

- Lindstedt, E.R., Oh, K.P., Badyaev, A.V. (2007): Ecological, social, and genetic contingency of extrapair behavior in a socially monogamous bird. *Journal of Avian Biology*, 38, 214-223.
- Maak, S., Neumann, K., von Lengerken, G., Gattermann, R. (2000): First seven microsatellites developed for the Peking duck (*Anas platyrhynchos*). *Animal Genetics*, 31, 233.
- Maak, S., Wimmers, K., Weigend, S., Neumann, K. (2003): Isolation and characterization of 18 microsatellites in the Peking duck (*Anas platyrhynchos*) and their application in other waterfowl species. *Molecular Ecology Notes*, 3, 224-227.
- Maniatis, T., Fritsch, E.F., Sambrook, J. (1982): *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
- Marshall, T.C., Slate, J., Kruuk, L.E.B., Pemberton, J.M. (1998): Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. *Molecular Ecology*, 7, 639-655.
- McDonald, D. B., Potts, W. K. (1997): DNA microsatellites as genetic markers at several scales. In: Mindell, D. P., editor. *Avian molecular evolution and systematics*. New York: Academic Press. pp. 29-49.
- McGuire, H.L., Noor, M.A.F. (2002): Microsatellite loci for great white herons and great blue herons (Aves, Ardeidae, *Ardea herodias*). *Molecular Ecology Notes*, 2, 170-172.
- McMillan, A.M., Bagley, M.J., Evers, D.C. (2004): Characterization of seven polymorphic microsatellite loci in the Common Loon (*Gavia immer*). *Molecular Ecology Notes*, 4, 297-299.
- Meagher, T.R., Thompson, E.A. (1986): The relationship between single parent and parent pair likelihoods in genealogy reconstruction. *Theoretical Population Biology*, 29, 87-106.
- Messier, W., Li, S.H., Stewart, C.B. (1996): The birth of microsatellites. *Nature*, 381, 483.
- Morris-Pocock, J.A., Taylor, S.A., Sun, Z., Friesen, V.L. (2010): Isolation and characterization of fifteen polymorphic microsatellite loci for red-footed boobies (*Sula sula*). *Molecular Ecology Resources*. *Preprint*.
- Myers, E.M., Zamudio, K.R. (2004): Multiple paternity in an aggregate breeding amphibian: the effect of reproductive skew on estimates of male reproductive success. *Molecular Ecology*, 13, 1951-1963.
- Nádvořník, P., Drobek, A., Čihák, K. (2008): Microsatellite markers for the study of paternity in Greater Flamingo (*Phoenicopterus roseus*) and Caribbean Flamingo (*P. ruber*). *Journal of Agrobiology*, 25, 93-96.
- Neff, B.D., Gross, M.R. (2001): Microsatellite evolution in vertebrates: Inference from AC dinucleotide repeats. *Evolution*, 55, 1717-1733.
- Neff, B.D., Repka, J., Gross, M.R. (2001): A Bayesian framework for parentage analysis: the value of genetic and other biological data. *Theoretical Population Biology*, 59, 315-331.
- Nielsen, R., Mattila, D.K., Clapham, P.J., Palsbøll, P.J. (2001): Statistical approaches to paternity analysis in natural populations and applications to Northern Atlantic humpback whale. *Genetics*, 157, 1673-1682.
- Paulus, K. B., Tiedemann, R. (2003): Ten polymorphic autosomal microsatellite loci for the Eider duck *Somateria mollissima* and their cross-species applicability among waterfowl species (Anatidae). *Molecular Ecology Notes*, 3, 250-252.

- Pemberton, J.M. (2009): Wild pedigrees: the way forward. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 275, 613-621.
- Pemberton, J.M., Slate, J., Bancroft, D.R., Barrett, J.A. (1995): Nonamplifying alleles at microsatellite loci - a caution for parentage and population studies. *Molecular Ecology*, 4, 249-252.
- Petren, K., Grant, B.R., Grant P.R. (1999): A phylogeny of Darwin's finches based on microsatellite DNA length variation. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 266, 321-329.
- Piertney, S.B., Goostrey, A., Dallas, J.F., Carss, D.N. (1998): Highly polymorphic microsatellite markers in the great cormorant *Phalacrocorax carbo*. *Molecular Ecology*, 7, 138-140.
- Preston, E.L. (2005): Isolation and Characterization of Polymorphic Loci from the Caribbean Flamingo (*Phoenicopterus ruber ruber*): New Tools for Wildlife Management : Dissertation. Denton, University of North Texas, 196 pp.
- Primmer, C.R., Ellegren, H. (1998): Patterns of Molecular Evolution in Avian Microsatellites. *Molecular Biology and Evolution*, 15, 997-1008.
- Primmer, C.R., Møller, A.P., Ellegren, H. (1996): A wide-range survey of cross-species microsatellite amplification in birds. *Molecular Ecology*, 5, 365-378.
- Primmer, C.R., Painter, J.N., Koskinen, M.K., Palo, J.U., Merilä, J. (2005): Factors affecting avian cross-species microsatellite amplification. *Journal of Avian Biology*, 36, 348-360.
- Pupko, T., Graur, D. (1999): Evolution of microsatellites in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: role of length and number of repeated units. *Journal of Molecular Evolution*, 48, 313-316.
- Roeder, A.D., Marshall, R.K., Mitchelson, A.J., Visagathilagar, T., Ritchie, P.A., Love, D.R., Pakai, T.J., McPartlan, H.C., Murray, N.D., Robinson, N.A., Kerry, K.R., Lambert, D.M. (2001): Gene flow on the ice: genetic differentiation among Adélie penguin colonies around Antarctica. *Molecular Ecology*, 10, 1645-1656.
- Rose, O., Falush, D. (1998): A threshold size for microsatellite expansion. *Molecular Biology and Evolution*, 15, 613-615.
- Rousset, F. (2008): GENEPOP' 007: a complete re-implementation of the GENEPOP software for Windows and Linux. *Molecular Ecology Resources*, 8, 103-106.
- Ruyter-Spira, C.P., de Koning, D.J., van der Poel, J.J., Crooijmans, R.P.M.A., Dijkhof, R.J.M., Groenen, M.A.M. (1998): Developing microsatellite markers from cDNA: a tool for adding expressed sequence tags to the genetic linkage map of the chicken. *Animal Genetics*, 29, 85-90.
- Sachs, J.L., Hughes, C.R. (1999): Characterization of microsatellite loci for red-necked grebes *Podiceps grisegena*. *Molecular Ecology*, 8, 687-688.
- 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.
- Sawyer, G.M., Benjamin, R.C. (2006): Isolation and characterization of microsatellite loci for parentage assessment in captive populations of roseate spoonbill (*Ajaia ajaja*). *Molecular Ecology Notes*, 6, 677-679.
- Schlötterer, C. (2000): Evolutionary dynamics of microsatellite DNA. *Chromosoma*, 109, 365-371.
- Seutin, G., White, B.N., Boag, P.T. (1991): Preservation of avian blood and tissue samples for DNA analyses. *Canadian Journal of Zoology*, 69, 82-90.

- Sheldon, F.H., Whittingham, L.A., Winkler, D.W. (1999): A comparison of cytochrome b and DNA hybridization data bearing on the phylogeny of swallows (Aves : Hirundinidae ). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 11, 320-331.
- Shephard, J.M., Galbusera, P., Hellemans, B., Jusic, A., Akhandaf, Y. (2009): Isolation and characterization of a new suite of microsatellite markers in the European White Stork, *Ciconia ciconia*. *Conservation Genetics*, 10, 1525-1528.
- Shriver, M.D., Jin, R., Boerwinkle, E., Deka, R., Ferrell, R.E., Chakraborty, R. (1995): A novel measure of genetic distance for highly polymorphic tandem repeat loci. *Molecular Biology and Evolution*, 12, 914-920.
- Sibley, C.G., Ahlquist, J.E. (1990): *Phylogeny and classification of birds: a study in molecular evolution*. Yale University Press, New Haven-London.
- Smith, B.R., Herbinger, C.M., Merry, H.R. (2001): Accurate partition of individuals into full-sib families from genetic data without parental information. *Genetics*, 158, 1329-1338.
- Stai, S. M., Hughes, C. R. (2003): Characterization of microsatellite loci in wild and domestic Muscovy ducks (*Cairina moschata*). *Animal Genetics*, 34, 387-389.
- Takezaki, N., Nei, M. (1996): Genetic distances and reconstruction of phylogenetic trees from microsatellite DNA. *Genetics*, 144, 389-399.
- Tautz, D. (1989): Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucleic Acids Research*, 17, 6463-6471.
- Taylor JS, Durkin JM, Breden F. (1999): The death of a microsatellite: a phylogenetic perspective on microsatellite interruptions. *Molecular Biology and Evolution*, 16, 567-572.
- Taylor, J.S., Durkin, J.M., Breden, F. (1999): The death of a microsatellite: a phylogenetic perspective on microsatellite interruptions. *Molecular Biology and Evolution*, 16, 567-572.
- 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.
- Thomas, S.C., Hill, W.G. (2002): Sibship reconstruction in hierarchical population structures using Markov chain Monte Carlo techniques. *Genetical Research*, 79, 227-234.
- Tomasulo-Seccomandi, A.M., Schable, N.A., Bryan, A.L. Jr., Brisbin, I.L. Jr., Del Lama, S.N., Glenn, T.C. (2003): Development of microsatellite DNA loci from the wood stork (Aves, Ciconiidae, *Mycteria americana*). *Molecular Ecology Notes*, 3, 563-566.
- Tuinen, M., Butvill, D.B., Kirsch, J.A.W., Hedges, S.B. (2001): Convergence and divergence in the evolution of aquatic birds. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 268, 1345-1350.
- van den Bussche, R.A., Harmon, S.A., Baker, R.J., Bryan, A.L. Jr., Rodgers, J.A. Jr., Harris M.J., Brisbin, I.L. (1999): Low levels of genetic variability in North American populations of the Wood Stork (*Mycteria Americana*). *The Auk*, 116, 1083-1092.
- Wang, J.L. (2004): Sibship reconstruction from genetic data with typing errors. *Genetics*, 166, 1963-1979.
- Weber, J.L., May, P.E. (1989): Abundant Class of human DNA polymorphisms which can be typed using the Polymerase Chain Reaction. *The American Journal of Human Genetics*, 44, 388-396.
- Wilder, J., Hollocher, H. (2001): Mobile elements and the genesis of microsatellites in dipterans. *Molecular Biology and Evolution*, 18, 384-392.

- Xu, X., Peng, M., Fang, Z. (2000): The direction of microsatellite mutations is dependent upon allele length. *Nature Genetics*, 24, 396-399.
- Yeung, C.K.L., Hsu, Y.-C., Yao, C.-T., Li S.-H. (2009): Isolation and characterization of 23 microsatellite loci in the black-faced spoonbill (*Platalea minor*) and amplification in other Ciconiiformes waterbirds. *Conservation Genetics*, 10, 1081-1084.
- Zhu, Y., Strassmann, J.E., Queller, D.C. (2000): Insertions, substitutions, and the origin of microsatellites. *Genetical Research*, 76, 227-236.



## 10. Příloha

1. Plameňák růžový - Kompletní souhrnný výstup dat z programu Cervus pro *cross-species* mikrosatelity
2. Plameňák karibský - Kompletní souhrnný výstup dat z programu Cervus pro *cross-species* mikrosatelity
3. Plameňák růžový - Kompletní souhrnný výstup dat z programu Cervus pro původní mikrosatelity plameňáka
4. Plameňák karibský - Kompletní souhrnný výstup dat z programu Cervus pro původní mikrosatelity plameňáka
5. Plameňák růžový - Obrazová příloha vybraných genotypizačních gelů mikrosatelitů (Obrázek 1 - 11)
6. Plameňák karibský - Obrazová příloha vybraných genotypizačních gelů mikrosatelitů (Obrázek 12 - 21)
7. Porovnání totožnosti lokusů  $W_{\mu} 17$  a  $W_{\mu} 18$  u obou druhů. (Obrázek 22)
8. Porovnání totožnosti lokusů  $Pru_{\mu} 7, 8$  a  $9$  u obou druhů. (Obrázek 23 - 28)