

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI
Přírodovědecká fakulta
Laboratoř růstových regulátorů

**Analýza a charakteristika vybraných
polymorfních mikrosatelitů z řádu
trubkonosí a tučňáci a konzervovaných
ptačích mikrosatelitů u pelikána afrického
(*Pelecanus rufescens*)**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor: **Bc. Kristýna Kopečná**

Studijní program: N1501 Experimentální biologie

Studijní obor: Experimentální biologie

Forma studia: Prezenční

Vedoucí práce: **RNDr. Petr Nádvořník, Ph.D.**

Termín odevzdání práce: 2020

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Bc. Kristýna Kopečná
Název práce	Analýza a charakteristika vybraných polymorfních mikrosatelitů z řádu trubkonosí a tučňáci a konzervovaných ptačích mikrosatelitů u pelikána afrického (<i>Pelecanus rufescens</i>).
Typ práce	Diplomová
Pracoviště	Laboratoř růstových regulátorů, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého v Olomouci
Vedoucí práce	RNDr. Petr Nádvorník, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2020
Abstrakt	Moje diplomová práce se věnovala charakterizaci 36 mikrosatelitních lokusů u pelikána afrického. V teoretické části je rozebírána problematika vztahů mezi řády tučňáci, trubkonosí a veslonozí a také stručná charakteristika pelikána afrického. Dále je rozebírán vznik a variabilita mikrosatelitů, jejich hledání a analýza. Poslední část teorie se týká <i>de novo</i> a <i>cross-species</i> mikrosatelitů u pelikánů. V experimentální části byla použita metoda <i>cross-species</i> PCR amplifikace pro charakterizaci 36 párů primerů na 12 nepříbuzných jedincích pelikána afrického. Po amplifikaci byla provedena elektroforetická separace produktů a jejich genotypizace, následovala analýza v programech Cervus 3.0.7 a Genepop 4.7.5. Celkem bylo charakterizováno 33 nezávislých polymorfních lokusů se 2–5 alelami.
Klíčová slova	PCR amplifikace, mikrosatelit, pelikán africký, <i>Pelecanus rufescens</i> , Sphenisciformes, Procellariiformes, trubkonosí, tučňáci
Počet stran	68
Počet příloh	1
Jazyk	Český

Bibliographical identification

Author's first name and surname	Bc. Kristýna Kopečná
Title of thesis	The analysis and characterization of selected polymorphic microsatellites from orders Procellariiformes and Sphenisciformes and conserved avian microsatellites in Pink-backed Pelican (<i>Pelecanus rufescens</i>).
Type of thesis	Master
Department	Laboratory of growth regulators, Faculty of Science, Palacky University in Olomouc
Supervisor	RNDr. Petr Nádvořník, Ph.D.
The year of presentation	2020
Abstract	My master thesis was about characterization of 36 microsatellite loci of the Pink-backed Pelican. The problematics of relationships between penguins, Procellariiformes and Pelecaniformes and the short characteristics of Pink-backed Pelican are solved in the theoretical part. Then I wrote about the origin, variability, search and analysis of microsatellites. The last part is about de novo and cross-species microsatellites in pelicans. I have used the cross-species PCR amplification method for characterizing of 36 primer pairs at 12 unrelated individuals of Pink-backed Pelican. After the amplification, I have done electrophoretic separation of the products and then I was genotyping them. Then the results were analyzed in programs Cervus 3.0.7 and Genepop 4.7.5. Totally, I have characterized 33 independent polymorphic microsatellite loci with 2–5 alleles.
Keywords	PCR amplification, microsatellite, Pink-backed Pelican, <i>Pelecanus rufescens</i> , Sphenisciformes, Procellariiformes, penguins
Number of pages	68
Number of appendices	1
Language	Czech

Prohlašuji, že jsem předloženou diplomovou práci vypracovala samostatně za použití citované literatury.

V Olomouci dne 21. 5. 2020

Veliké díky patří mému vedoucímu práce RNDr. Petru Nádvorníkovi, Ph.D. především za jeho ochotu a čas, které mi věnoval. Dále za poskytnutí potřebných materiálů a cenných rad. A v neposlední řadě také za odborné vedení při zpracování teoretické i experimentální části mé diplomové práce.

Obsah

1. Úvod	7
2. Cíle práce	8
3. Literární přehled	9
3.1 Třída ptáci	9
3.2 Vztahy mezi řády trubkonosí, tučňáci a veslonozí	9
3.3 Pelikáni	14
3.4 Pelikán africký	15
3.5 Mikrosatelity	15
3.6 Vznik a variabilita mikrosatelitů	16
3.7 Hledání mikrosatelitů	16
3.8 Analýza mikrosatelitních lokusů	18
3.9 Polymorfní mikrosatelity izolované <i>de novo</i> u pelikánů	19
3.10 Polymorfní mikrosatelity nalezené u pelikánů pomocí <i>cross-species</i> PCR amplifikace	19
4. Materiál a metody	24
4.1 Biologický materiál	24
4.2 PCR amplifikace genomické DNA	24
4.3 Zpracování produktů PCR amplifikace metodou elektroforetické separace	26
4.4 Softwarové vyhodnocení výsledků	29
4.5 Použité chemikálie	29
4.6 Použité roztoky	30
4.7 Použité laboratorní přístroje	32
5. Výsledky	33
6. Diskuze	43
7. Závěr	55
8. Použitá literatura	56
9. Přílohy	66

1. Úvod

Mikrosatelity jsou jedním z typů krátkých tandemových repetit, většinou o délce jednotky repetice 2–6 bp. Mikrosatelity jsou volně rozptýleny po celém genomu a jsou vysoce variabilní. Z toho důvodu jsou využitelné jako genetické markery např. při populačně genetických studiích nebo při studiích paternity. Dají se získat třemi způsoby, a to metodou *de novo*, *cross-species* nebo *in silico*. Velkou výhodou při použití metody *cross-species* je přenositelnost mikrosatelitních lokusů napříč úzce příbuznými druhy.

Pelikáni jsou ptáci vázaní na vodu, z nichž některé druhy je možné zařadit mezi ohrožené. U nás jsou tyto ptáci chováni v zoologických zahradách. Je nutné udržovat čistotu těchto chovů a vzhledem k dlouhé fertilitní době je nutné zabránit křížení příbuzných jedinců. To je jeden z důvodů, proč se u nich zkoumají mikrosatelitní lokusy, které pak mohou být využity ke studiu paternity a k populačním studiím.

V Laboratoři populační genetiky Katedry buněčné biologie a genetiky na Přírodovědecké fakultě Univerzity Palackého v Olomouci jsou testovány mikrosatelity nejen od pelikánů, ale i od dalších zástupců kladu Aequorlithornithes. Testování mikrosatelitů od zástupců tohoto kladu je možné využít pro studium variability populací jednotlivých druhů. V mé diplomové práci navazuji na svoji bakalářskou práci (Kopečná, 2018) a bakalářskou práci Adámková (2019) a měla bych charakterizovat mikrosatelity, které byly v těchto pracích označeny jako polymorfní.

2. Cíle práce

1. Shromáždění dostupných literárních zdrojů.
2. Vypracování rešerše na téma diplomové práce.
3. Amplifikace a charakteristika mikrosatelitových lokusů na DNA 12 nepříbuzných jedinců pelikána afrického z chovu ZOO Dvůr Králové; jedná se o mikrosatelity označené jako polymorfní v bakalářské práci studentky (Kopečná, 2018) a v bakalářské práci Adámková (2019). Tyto mikrosatelity srovnat s polymorfními lokusy charakterizovanými v diplomových pracích Mikulová (2010) a Chmelařová (2012).

3. Literární přehled

3.1 Třída ptáci

Ptáci (Aves) jsou řazeni do monofyletické skupiny Reptilia. Protože pocházejí z dinosaurů skupiny Maniraptora, jsou řazeni mezi teplokrevnou vývojovou větev archosaurních plazů. Se skupinou Reptilia sdílejí určité pleziomorfní znaky, jako např. suchou kůži, ledvinu jakožto vylučovací orgán nebo volnou zadní končetinu s přítomností mezotarzálního kloubu. Mezi apomorfní znaky, které sdílejí ptáci se skupinou Maniraptora, se řadí např. srostlé klíční kosti ve vidlici, opeřené tělo nebo zadní končetiny uzpůsobené k bipednímu pohybu (Gaisler *et* Zima, 2018). V molekulárních studiích je často popisován blízký vztah ptáků a krokodýlů, kteří jsou jejich nejbližší příbuznou žijící skupinou. Mezi společné znaky patří například tvorba kostí a svalů z pohledu embryogeneze nebo také podobná skořápka vajec. Fylogeneze ptáků je však velice složitá a řazení jednotlivých taxonů do systému se neustále mění (Gaisler *et* Zima, 2007).

Linie, ze které se vyvinuli moderní ptáci, se nazývá Carinatae. Z této linie se vyvinuli tzv. Neornithes, kteří se dále dělí na dvě skupiny - Neognathae a Paleognathae, které se od sebe liší pevným nebo pohyblivým spojením v oblasti patra. Systém Neornithes bývá však často kritizován, zejména proto, že rozdělení na Neognathae a Paleognathae není na základě rozdílných znaků dostatečně průkazné. Toto tvrzení však bylo vyvráceno ve studii Sibleye a Ahlquista (1988), kteří použitím metody DNA-DNA hybridizace potvrdili jasné rozdíly mezi Neognathae a Paleognathae (Gaisler *et* Zima, 2018). Říše ptáci obsahuje v současné době více než 10 000 druhů a jak už bylo uvedeno, jedná se o říši velice rozmanitou, hlavně na základě morfologie, chování a ekologie (Prum *et al.*, 2015). Co se týče rozdělení do jednotlivých řádů, v tradičním pojetí jich bylo rozlišováno zhruba 24, ale v dnešní době už jich je přes 40 (Gaisler *et* Zima, 2018). V mé diplomové práci se zabývám převážně řády trubkonosí, tučňáci a veslonozí.

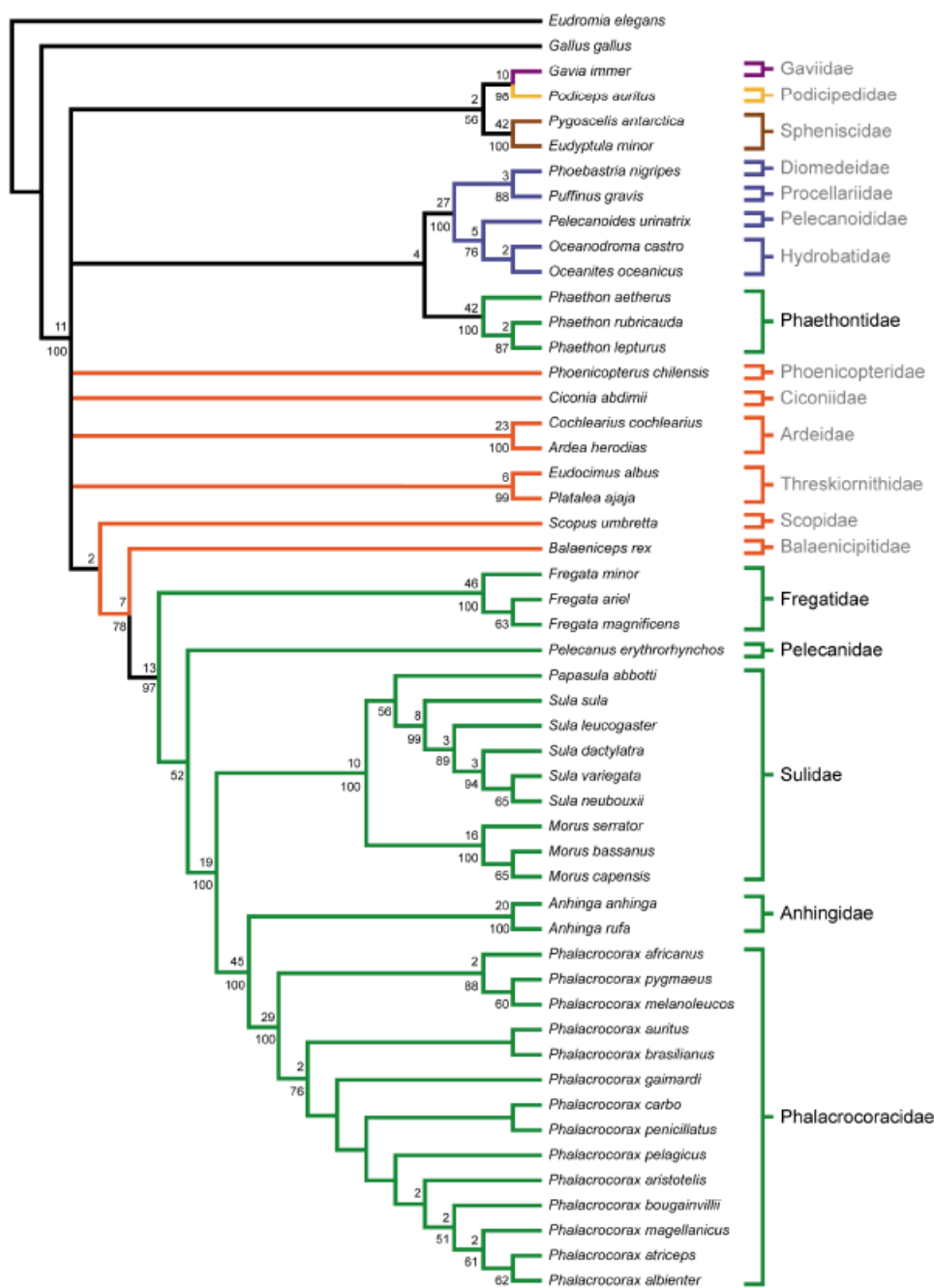
3.2 Vztahy mezi řády trubkonosí, tučňáci a veslonozí

Gaisler *et* Zima (2007) řadí tyto tři řády do skupiny letci, i když tučňáci (Sphenisciformes) jsou ptáci neschopní letu. Tučňáci jsou uzpůsobení k pohybu ve vodě, jelikož mají křídla pozměněna na vesla, která jim umožňují plavat. I když mají spoustu unikátních znaků, které se vyskytují pouze u této skupiny, předpokládá se jejich příbuznost s trubkonosými a potáplicemi. Trubkonosí (Procellariiformes) jsou ptáci létající, kteří stejně jako tučňáci loví potravu v moři. Mezi trubkonosé patří čtyři čeledě:

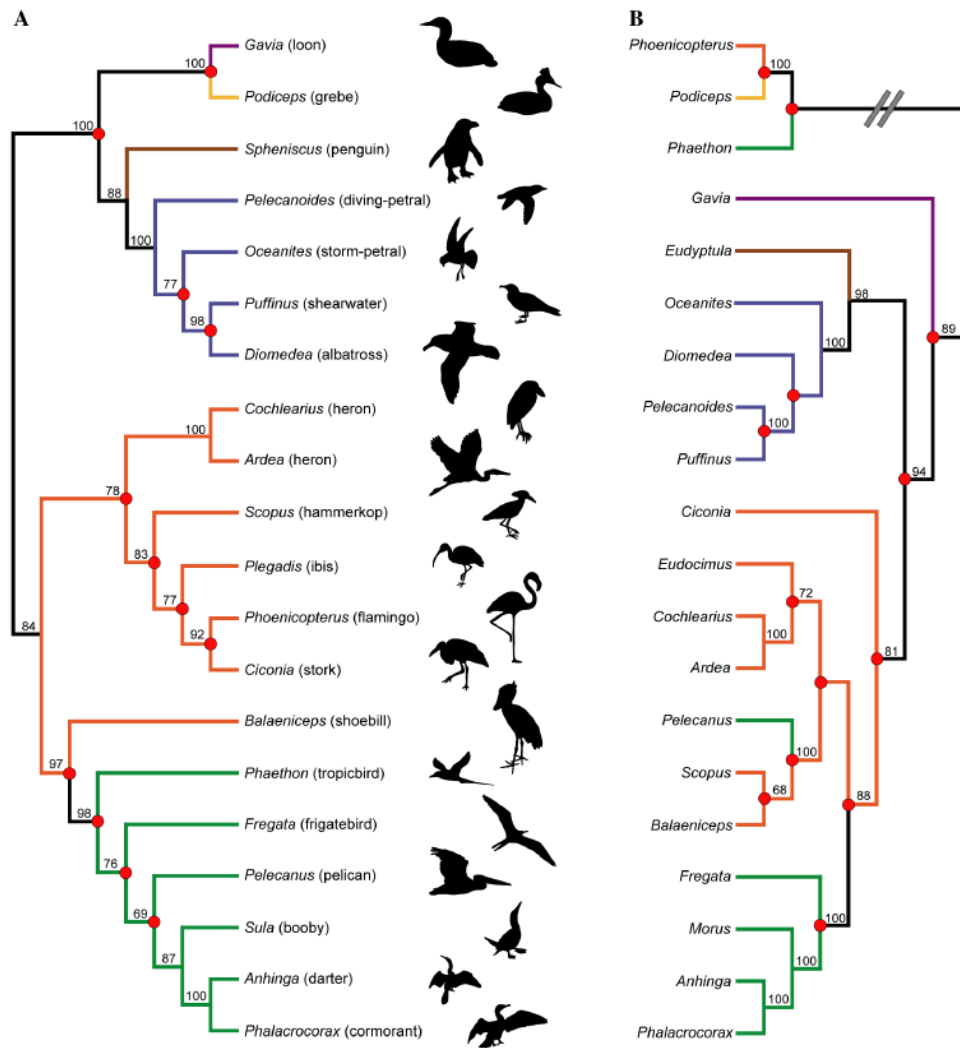
albatrosovití, buňňákovití, buňňíkovití a buňňáčkovití. Co se týče veslonohých (Pelecaniformes), jedná se o ptáky s tzv. veslovací nohou, kdy jsou všechny prsty spojeny plovací blánou. V tradičním pojetí, se mezi veslonohé řadí anhingovití (Anhingidae), faetonovití (Phaethontidae), fregatkovití (Fregatidae), kormoránovití (Phalacrocoracidae), pelikánovití (Pelecanidae) a terejovití (Sulidae) (Gaisler *et* Zima, 2007). V posledních letech byla zcela změněna koncepce tohoto řádu. Od tradičních veslonohých byli nejprve odděleni faetoni a nyní tvoří samostatnou skupinu, která je sesterská k Eurypygiformes, kam patří slunatec a kagu. Je však otázkou, zda faetoni, slunatec a kagu tvoří taxonomicky dohromady jednu skupinu nebo se jedná o dva samostatné řády - Phaethontiformes a k němu sesterský řád Eurypygiformes. Z tradičních veslonohých se dále oddělili anhingy, fregatky, kormoráni a terejové, nyní společně tvoří řád Suliformes. V tradičních veslonohých tak zůstali pouze pelikáni a ti nyní tvoří sesterskou skupinu s člunozobcem a kladivoušem. Další jim fylogeneticky blízké skupiny jsou čeledě volavkovití a ibisovití (Gaisler *et* Zima, 2018).

Hedges *et* Sibley (1994), pomocí metody DNA-DNA hybridizace prokázali příbuznost veslonohých a člunozobce. Dále se ve výsledcích jejich studie objevuje skupina obsahující mimo jiné také tučňáky, pelikány a buňňáky z řádu trubkonosí. Na základě DNA-DNA hybridizace byl prokázán společný původ těchto druhů, ačkoliv jsou mezi nimi patrné větší fylogenetické rozdíly.

Molekulární a morfologické studie řadí veslonohé do velké skupiny vodních ptáků, kdy tento klad zahrnuje mimo jiné také trubkonosé a tučňáky. Veslonozí jsou reprezentováni rozsáhlou sbírkou fosilií, na základě které lze předpokládat, že veslonozí a trubkonosí byli úzce příbuzní s čeledí Pelagornithidae, avšak přesné vztahy mezi těmito skupinami nebyly objasněny. Navíc podle poslední fylogenetické analýzy bylo zjištěno, že čeleď Pelagornithidae patří zcela mimo klad Neoaves (Smith *et al.*, 2010). Mayr (2005) ve svých studiích uvedl, že tučňáci mohou být příbuzní s vyhynulou čeledí bichirovití, která byla řazena do skupiny s tradičními veslonohými. Smith *et al.* (2010) studovali 59 taxonů vodních ptáků se 464 druhy a sestavili nový fylogenetický strom (obr. č. 1). Velká skupina zahrnující potápky, potáplice, tučňáky, trubkonosé a faetony je podobná rozdělení podle Livezey *et* Zusi (2007) na obr. č. 2.

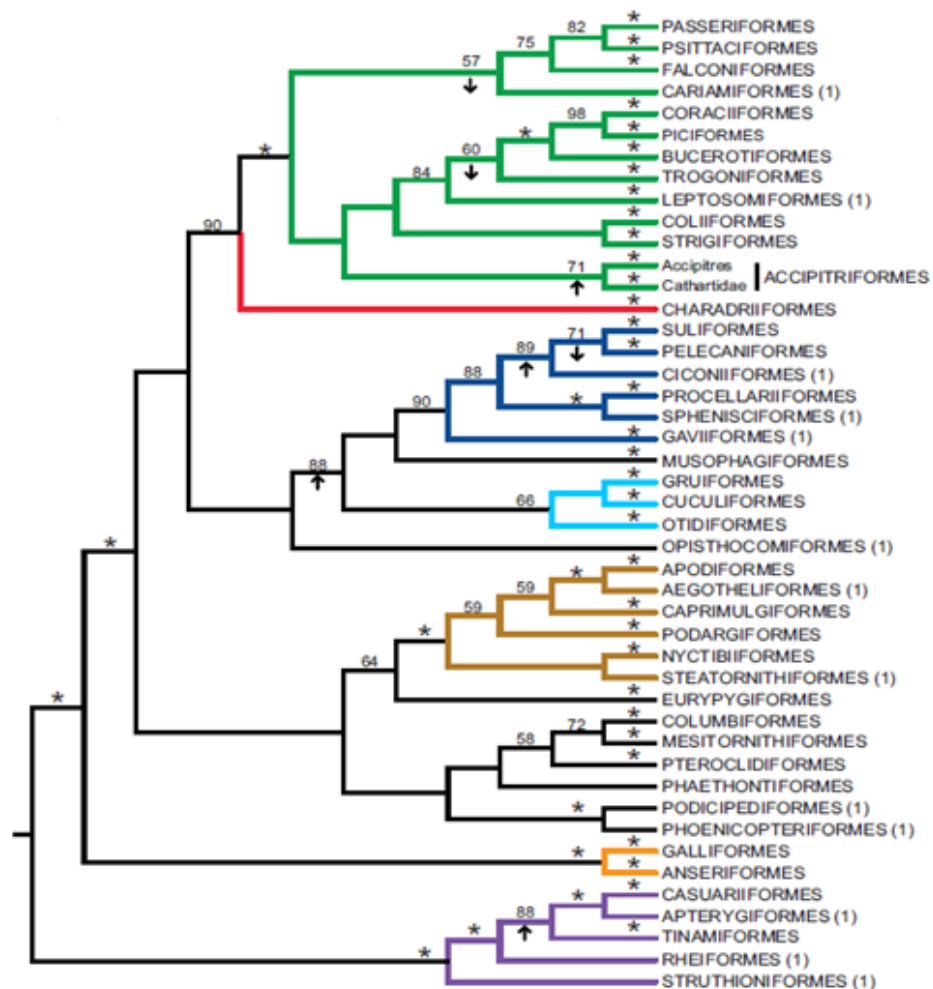


Obrázek č. 1: Vztahy mezi skupinami vodních ptáků podle Smith *et al.* (2010). Řád tučňáci označen hnědě, řád veslonoží (v tradičním pojetí) zeleně a řád trubkonosí modře.



Obrázek č. 2: Kladogram vodních ptáků podle Livezey *et* Zusi (2007) [A] a podle Hackett *et al.* (2008) [B]. Řád veslonozí (v tradičním pojetí) je vyznačen zeleně, řád tučňáci je vyznačen hnědě a řád trubkonosí je vyznačen modře.

Yuri *et al.* (2013) na základě studia analogických sekvencí DNA napříč jednotlivými skupinami ptáků zkoumali jejich fylogenezi. Pomocí těchto studií sestavili fylogenetický strom (viz obr. č. 3). Na základě tohoto schématu lze předpokládat, že tučňáci a trubkonosí spolu tvoří sesterskou skupinu a tato skupina je sesterská ke skupině, kterou tvoří tradiční veslonozí a brodiví. Veslonozí, zahrnující zde anhingu, kormorány, pelikány a fregatky, tvoří sesterskou skupinu s tereji.

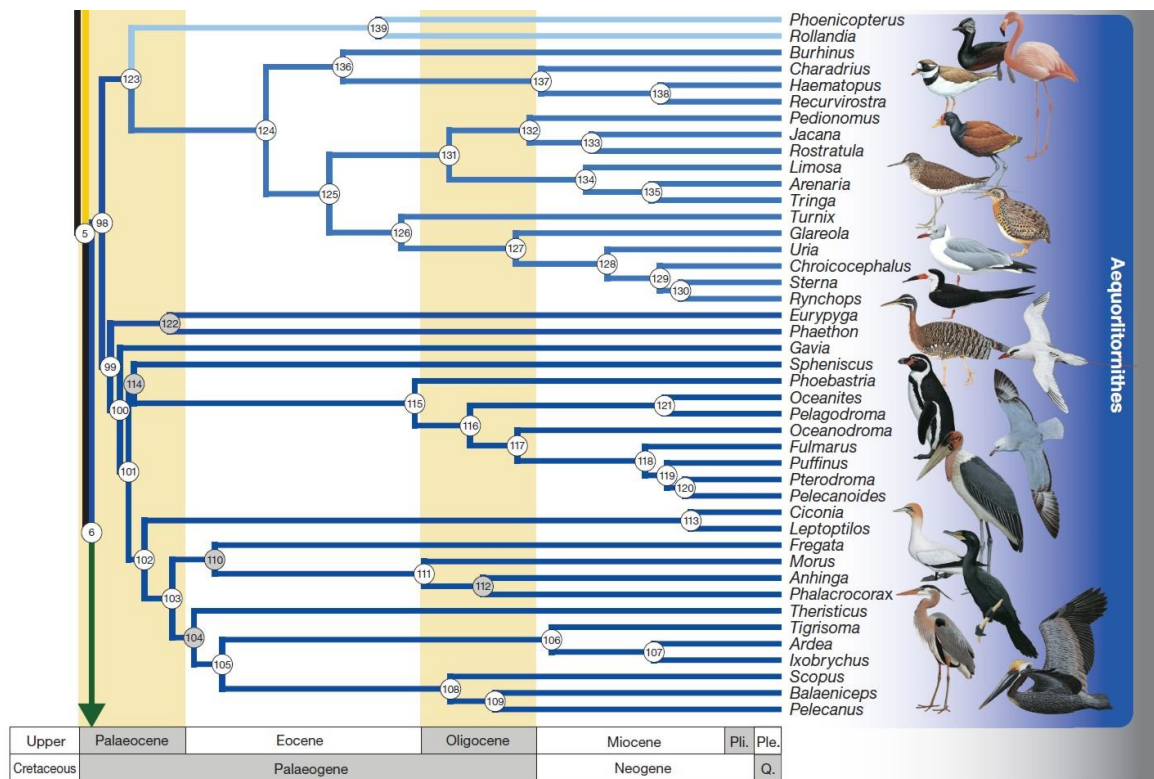


Obrázek č. 3: Fylogenetický strom podle Yuri *et al.* (2013). Řády vodních ptáků jsou vyznačeny tmavě modrou barvou.

V rámci předchozích molekulárních a současných morfologických studií byli ptáci rozdělováni na Paleognathae, Galloanseres a Neoaves. V rámci Neoaves byly navrženy nové klady, včetně kladu pro vodní ptáky, který zahrnuje mimo jiné také pelikány a tučňáky. Pomocí analýzy celých genomů bylo zkoumáno 48 ptačích druhů ze skupiny Neoaves. Při této analýze byly zkoumané druhy ze skupiny Neoaves rozděleny do 2 velkých skupin - Columbea a Passera. Součástí skupiny Passera je i klad Aequornithia, který zahrnuje mimo jiné i tučňáky, trubkonosé a veslonohé, do kterých jsou zde řazeni pelikáni, kormoráni, volavky a ibisové (Jarvis *et al.*, 2014).

Prum *et al.* (2015) popisují ve svých studiích nový klad Aequorlornithes, který zahrnuje všechny vodní ptáky, kromě vrubozobých. Klad Aequorlornithes zahrnuje také trubkonosé, tučňáky a pelikány. Tučňáci tvoří sesterskou skupinu s trubkonosými a tato celá skupina je sesterská k vzájemně promíchaným čeledím řádů brodiví a veslonoží

v tradičním pojetí (bez faetonů, kteří byli již dříve odděleni a nyní tvoří samostatnou skupinu). Rod pelikán tedy zůstal jako jediný v řádu veslonozí, zbytek veslonohých (anhingy, fregatky, kormoráni a terejové) tvoří řád Suliformes (obr. č. 4).



Obrázek č. 4: Fylogenetický strom vodních ptáků podle Prum *et al.* (2015).

3.3 Pelikáni

Pelecaniformes v novém pojetí obsahuje čeledě Ardeidae, Balaenicipitidae, Threskiornithidae, Scopidae a Pelecanidae, která zahrnuje jeden rod *Pelecanus* (Kennedy *et al.*, 2012). Většina pelikánů má převážně bílé peří s výraznými černými křídly. U dvou druhů se vyskytuje převážně hnědé peří s bílými skvrnami. Pelikáni mají dlouhá a široká křídla, krátký ocas a nohy a masivní tělo (Winkler *et al.*, 2015). Pelikánů je v současnosti 8 druhů, někteří starší autoři však uvádějí pouze 7 druhů, jelikož pelikán chilský byl až do roku 2007 považován za poddruh pelikána hnědého (del Hoyo *et al.*, 1992; Šťastný *et al.*, 1998; Jaramillo, 2007; Kennedy *et al.*, 2012). Mezi druhy pelikánů patří pelikán africký (*Pelecanus rufescens*), pelikán australský (*P. conscipitallus*), pelikán bílý (*P. onocrotalus*), pelikán hnědý (*P. occidentalis*), pelikán chilský (*P. thagus*), pelikán kadeřavý (*P. crispus*), pelikán severoamerický (*P. erythrorhynchos*) a pelikán skvrnozobý (*P. philippensis*) (Brown *et al.*, 1982). Pelikáni se vyskytují převážně v blízkosti vodních ploch včetně slaných jezer, močálů a na pobřeží. Živí se převážně

rybami, způsob lovu se u jednotlivých druhů pelikánů liší. Některé druhy se pro svou kořist potápějí, ty ostatní používají k chytání kořisti svoje mohutné zobáky, jejich kořisti bývají ryby od menších, jako jsou sardinky nebo ančovičky, až po ty větší, jako jsou kapři, okouni nebo štiky (Winkler *et al.*, 2015).

Pelikáni jsou monogamní ptáci. Hnízdí v koloniích, které mohou obsahovat až tisíce párů. Hnízda mohou být umístěna buď na zemi, kde mají velmi jednoduchou strukturu, nebo na stromech, ta už jsou složitější. Pelikáni kladou 1 až 6 vajec a mláďata se z nich líhnou po 30 až 36 dnech (Winkler *et al.*, 2015).

3.4 Pelikán africký

Pelikán africký je šedorůžově zbarvený pták, který hnízdí převážně v Africe (Svensson *et al.*, 2016). V některých afrických státech bývá tento druh přemnožený, jedná se např. o Senegal nebo Etiopii (Brown *et al.*, 1982). Oproti pelikánovi bílému je menší a má kratší zobák. V jarních měsících se u něj vyskytuje tmavá skvrna u oka (Svensson *et al.*, 2016). Samice bývají menší než samci. Stejně jako ostatní druhy pelikánů i pelikán africký žije v koloniích, hnízdí převážně na stromech. Hnízda staví především v blízkosti vodních ploch a toků nebo poblíž bažin. Potravou pelikána afrického jsou hlavně ryby, které loví ve skupinách, na rozdíl od ostatních druhů pelikánů nevyužívá koordinovaný styl lovu. Většinou klade dvě vejce, která mají světlemodrou skořápku. Líhnou se z nich holá mláďata, o která pečují oba rodiče během prvního měsíce jejich života. Pelikán africký se dožívá v průměru okolo 6 let (Brown *et al.*, 1982, del Hoyo *et al.*, 1992).

3.5 Mikrosatelity

Mikrosatelity nebo také simple sequence repeats (SSRs) jsou několikanukleotidové úseky DNA opakující se v několika až mnoha kopiích bezprostředně za sebou, tedy v tandemu. Opakující se úseky jsou tvořeny 1–6 páry bází (Tóth, *et al.*, 2000). Někteří další autoři uvádějí délku 1–5 nebo 2–8 bp (Kantartzi, 2013). Tyto repetice jsou přítomny u prokaryot i u eukaryot (Tóth *et al.*, 2000; Kantartzi, 2013). Mikrosatelity jsou víceméně rovnoměrně rozptýleny po celém genomu. Nejčastěji se v genomu vyskytují mikrosatelity, u kterých se nachází poly(A)/poly(T) opakování. Avšak tato sekvence není vhodná pro mapování nebo populační analýzu z důvodu nestability při PCR amplifikaci. Analýza tandemových repetit v genomech různých druhů ukázala, že repetice CA/TG jsou nejčastějšími dinukleotidovými repeticemi, které se vyskytují přibližně 2x častěji než repetice AT a 3x častěji než repetice AG/CT (Beckmann *et Webber*, 1992; Goldstein *et Schlötterer*, 1999). Speciální skupinu

mikrosatelitů tvoří tzv. trinukleotidové repetice, které hrají důležitou roli při vzniku některých lidských neurodegenerativních onemocnění. Jedná se například o syndrom fragilního X nebo Huntingtonovu chorobu (Tóth *et al.*, 2000). Mikrosatelity patří mezi nejrozšířenější molekulární markery, kterých se hojně využívá v genetických studiích, populační genetice nebo při studiu paternity. Tato škála využití je možná díky tomu, že mikrosatelity jsou kodominantní a vícealelové (Oliveira *et al.*, 2006). V mé diplomové práci se zabývám převážně mikrosatelity u ptáků. U nich se však mikrosatelity vyskytují mnohem méně než u jiných taxonů, jako jsou například savci a ryby (Primmer *et al.*, 1997). U ptáků jsou mikrosatelity používány především pro určování paternity, v populační genetice nebo při vazebném mapování. Hledání a izolace mikrosatelitů a následný návrh primerů pro jejich PCR amplifikaci je však časově náročný a zkušenosti vyžadující proces, který může trvat i týdny až měsíce (Dawson *et al.*, 2010).

3.6 Vznik a variabilita mikrosatelitů

Mikrosatelity mohou vznikat dvojím způsobem. Prvním je záměna nukleotidů, která se děje buď inzercí nebo delecí několika párů bází. Druhým způsobem, kterým mikrosatelity vznikají, je aktivita mobilních elementů (Buschiazzo *et Gemmell*, 2006). Mezi nejrozšířenější typy mikrosatelitů, které vznikají, patří di-, tri- a tetranukleotidové repetice. Nejčastější z nich jsou dinukleotidové, jejich četnost výskytu se liší v závislosti na druhu. U živočichů se nejčastěji vyskytuje CA opakování, u rostlin je to potom TA/GA opakování. Trinukleotidové repetice se často vyskytují v exonech, kde nenarušují čtecí rámec. Nejvíce se i trinukleotidových repetití vyskytuje opakování GTG. U tetranukleotidových repetití bývá nejčastější GATA/GACA opakování, která se vyskytují převážně u vyšších organismů. Tento typ repetití se v populačních studiích nepoužívá tak často, i když vykazují vysoký polymorfismus (Jarne *et Lagoda*, 1996).

Polymorfismus u mikrosatelitů vzniká tzv. sklouznutím polymerázy během DNA replikace neboli DNA *replication slippage*, kdy v místě repetice dojde k oddělení řetězců DNA a jejich následnému znovu spojení v jiném místě. Tímto procesem dochází ke vzniku chybného párování bází a k prodloužení nově vznikajícího vlákna (Oliveira *et al.*, 2006).

3.7 Hledání mikrosatelitů

Existují celkem tři metody izolace mikrosatelitů, jedná se o metodu *de novo*, *cross-species* PCR amplifikaci a *in silico* (Zane *et al.*, 2002; Dawson *et al.*, 2010).

Mikrosatelity, které jsou zkoumány poprvé, musí být izolovány tzv. *de novo*, což bývá považováno za jednu z nevýhod. Je tomu tak proto, že mikrosatelity se obvykle nacházejí v nekódujících oblastech genomu, kde je četnost výskytu nukleotidové substituce vyšší než v kódujících oblastech. Z tohoto důvodu je také problematické navrhování univerzálních primerů, které bylo velmi efektivní např. u mitochondriální DNA (Kocher *et al.*, 1989; Zane *et al.*, 2002).

Prvním krokem izolace při použití *de novo* metody bývá sestavení genomických knihoven a jejich následný *screening* s použitím vhodných hybridizačních sond, které tvoří oligonukleotidy obsahující danou repetici. Poté následuje osekvenování pozitivních klonů, návrh primerů a optimalizace podmínek PCR amplifikace. Celý tento postup bývá však velice časově náročný, a proto byly navrženy alternativní metody, které by dobu izolace zkrátily a zároveň zvýšily výtěžnost. Jedná se např. o metodu PCR amplifikace s použitím náhodně zvolených primerů, označovaných jako RAPD primery. Produkty PCR reakce jsou poté hybridizovány se sondami, které obsahují mikrosatelitové repetice. Bohužel ani alternativní metody nepřinesly o tolik vyšší výtěžek, proto se čím dál častěji přistupuje ke druhé metodě izolace, kterou je *cross-species* PCR amplifikace (Primmer *et al.*, 1996; Primmer *et al.*, 1997; Zane *et al.*, 2002).

Metoda *cross-species* PCR amplifikace je založena na hledání mikrosatelitů, pro které jsou používány primery, jež byly dříve navrženy pro jiné příbuzné druhy. Úspěch *cross-species* PCR amplifikace souvisí s evoluční vzdáleností mezi zdrojovým druhem a druhem, na jehož DNA se lokus amplifikuje. Studie prokázaly, že mikrosatelity izolované od různých druhů amplifikují polymorfní lokus u blízce příbuzných druhů, nikoliv však u těch vzdálenějších (Primmer *et al.*, 1996; Primmer *et al.*, 2005). Kromě příbuznosti jednotlivých druhů lze úspěšnost *cross-species* PCR amplifikace ovlivnit také optimalizací podmínek PCR, například snížením teploty annealingu.

Třetí možností používanou pro izolaci mikrosatelitních lokusů je metoda *in silico*. Tato metoda je rychlejší a levnější než metoda *de novo* a spočívá v prohledávání databází, které obsahují sekvence DNA (Dawson *et al.*, 2013) nebo cDNA (Dawson *et al.*, 2010). K prohledávání databází je nutné použít také správný vyhledávací nástroj. Dříve se k vyhledávání používal tzv. BLASTN (Basic Local Alignment Search Tool), jedná se o nástroj, který porovnává danou nukleotidovou sekvenci se sekvencí obsaženou v databázi. V dnešní době se používá např. software MISA (MicroSATellite), Tandem-Repats Finder nebo TROLL (Tandem Repeats Occurent Locator).

Tyto softwary detekují tandemové repetice na základě zadaných vstupních podmínek a vybírají repetice na základě motivu nebo počtu opakování (Sharma *et al.*, 2007).

3.8 Analýza mikrosatelitních lokusů

Při analýze mikrosatelitních lokusů bývá hojně využívána metoda PCR amplifikace se specifickými primery a následná elektroforetická separace produktů. V dnešní době se stále více používá multiplex PCR, která je časově úspornější. Jedná se o současnou amplifikaci několika mikrosatelitů v jedné reakci, kde je použito více párů primerů. Pro všechny primery je použita stejná teplota annealingu. Produkty PCR reakce jsou poté separovány pomocí kapilární elektroforézy. Lokusy, jejichž alely se nepřekrývají, jsou označeny stejným fluorescenčním barvivem, u překrývajících se alel se používá značení různými barvivy (Guichoux *et al.*, 2011).

Podle Guichoux *et al.* (2011) je pro PCR amplifikaci nutné použít mikrosatelity, u kterých se vyskytuje nejméně tzv. *stutter bandů* a nulových alel. *Stutter bands* jsou produkty PCR reakce, které se liší svojí délkou od hlavních produktů, což se projeví i při následné elektroforetické separaci. Při jednoduché PCR reakci může vzniknout chyba, kdy polymeráza vytvoří produkt delší či kratší o jednu nebo více repetice. A čím kratší je jednotka repetice, tím větší je pravděpodobnost přítomnosti *stutter bandů*. (Hosseinzadeh-Colagar *et al.*, 2016). Nulové alely jsou takové alely, které není možné amplifikovat pomocí PCR. Znemožnění amplifikace je způsobeno mutací v nukleotidové sekvenci tzv. *flanking region*. Tato mutace zabrání nasednutí primeru na templátovou DNA. Přítomnost nulových alel je možné zjistit srovnáním pozorovaných četností homozygotních a heterozygotních genotypů mikrosatelitů s četnostmi vypočítanými podle Hardy-Weinbergova zákona. Avšak některé jevy mohou vyvolat mylný dojem, že jsou nulové alely přítomny, jedním z nich je tzv. Wahlundův efekt, který způsobuje deficit heterozygotů ve vztahu k Hardy-Weinbergově rovnováze. Falešný výskyt nulové alely se projeví i v případě, že není v daném lokusu rozpoznána vazba na pohlaví, konkrétně na chromozom Z. U ptáků se rozlišují dva typy pohlavních chromozomů - W a Z. Samci mají dvě kopie chromozomu Z a u samic se nachází dvojice chromozomů Z a W. Samice jsou tedy pro lokusy na Z chromozomu tzv. hemizygotní (Dakin *et al.*, 2004).

3.9 Polymorfní mikrosatelity izolované *de novo* u pelikánů

Mikrosatelitní lokusy izolované *de novo* byly u pelikánů získány pouze od dvou druhů, jedná se o pelikána severoamerického (*P. erythrorhynchos*) (Hickman *et al.*, 2008) a pelikána bílého (*Pelecanus onocrotalus*) (de Ponte Machado *et al.*, 2009). U zbylých druhů pelikánů prozatím žádné lokusy *de novo* izolovány nebyly.

Hickman *et al.* (2008) izolovali 9 mikrosatelitních lokusů (PeEr 01–PeEr 09) od pelikána severoamerického. DNA byla extrahována z prsního svalu 23 jedinců, kteří pocházeli z východní a západní části Severní Ameriky. Následně byly navrženy primery pro PCR amplifikaci. Celkem bylo testováno 25 párů primerů, 9 z nich po amplifikaci poskytlo kvalitní produkt, který byl polymorfní u 23 jedinců. Nalezené polymorfní lokusy měly 2–8 alel.

De Ponte Machado *et al.* (2009) našli 10 mikrosatelitních lokusů (PEL086, PEL149, PEL175, PEL185, PEL188, PEL190, PEL207, PEL221, PEL265 a PEL304) u pelikána bílého. Nalezené lokusy měly 2–19 alel. Navržené primery pro PCR amplifikaci byly testovány s DNA 46 jedinců pocházejících ze dvou populací, 23 jedinců pocházelo z Namibie a 23 z oblasti jižní Afriky. Dva z deseti polymorfních lokusů vykazovaly nesoulad s Hardy-Weinbergovou rovnováhou, jeden u namibijské (PEL221) a druhý u jihoafrické populace (PEL185). Se všemi polymorfními lokusy byla poté provedena *cross-species* PCR amplifikace, která byla úspěšná u tří příbuzných druhů. Jednalo se o jednoho jedince pelikána afrického, pět jedinců pelikána hnědého a dva jedince pelikána severoamerického. U pelikána afrického bylo úspěšně amplifikováno 8 z 10 lokusů, které měly 2–7 alel, v případě lokusu PEL086 a PEL185 se amplifikace nezdařila.

3.10 Polymorfní mikrosatelity nalezené u pelikánů pomocí *cross-species*

PCR amplifikace

Reudink *et al.* (2011) zkoumali u pelikána severoamerického strukturu populace z genetického hlediska napříč Severní Amerikou. Ke zkoumání použili 10 mikrosatelitních lokusů. Sedm z nich bylo původně izolováno od pelikána severoamerického ve studii Hickman *et al.* (2008). Jednalo se o lokusy PeEr01, PeEr02, PeEr03, PeEr04, PeEr06, PeEr08 a PeEr09. Zbylé 3 lokusy byly odvozeny od pelikána bílého ve studii de Ponte Machado *et al.* (2009), jednalo se o lokusy PEL086, PEL149 a PEL304. Amplifikace těchto 10 lokusů byla provedena na 333 jedincích pocházejících z 19 kolonií. Počet alel se pohyboval v rozmezí 4–13 u mikrosatelitů původně

izolovaných od pelikána severoamerického a 7–19 alel u lokusů, které původně pocházely od pelikána bílého. Žádný z mikrosatelitů nevykazoval odchylku od Hardy-Weinbergovy rovnováhy.

Jeyasingham *et al.* (2013) testovali variabilitu populace a genový tok u pelikána chilského. K testování použili 7 mikrosatelitních lokusů. Pět z těchto lokusů (PeEr02, PeEr03, PeEr05, PeEr07 a PeEr09) bylo původně izolováno u pelikána severoamerického ve studii Hickmain *et al.* (2008), zbylé dva lokusy (PEL149 a PEL185) byly nalezeny u pelikána bílého ve studii de Ponte Machado *et al.* (2009). Pro analýzu byla použita DNA 83 jedinců pelikána chilského, kteří pocházeli ze tří různých kolonií. Počet alel se pohyboval v rozmezí 4–26 na lokus. V průměru bylo zjištěno 12 alel na lokus. Na lokusu PeEr05 se vyskytovaly nulové alely.

Cross-species PCR amplifikací mikrosatelitů v rámci kladu Aequorlitorornithes se dlouhodobě zabývá Laboratoř populační genetiky na Katedře buněčné biologie a genetiky Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého v Olomouci. Zaměřila jsem se na bakalářské a diplomové práce studentek, které se zabývaly testováním *cross-species* mikrosatelitů u pelikána afrického (*Pelecanus rufescens*).

Dvořáková (2010) se ve své bakalářské práci zabývala hledáním polymorfních mikrosatelitních lokusů, které by se dále daly využít k determinaci paternity u pelikána afrického. Pomocí *cross-species* PCR amplifikace otestovala celkem 221 párů primerů. Mikrosatelitní lokusy, pro které byly tyto primery navrženy původně, pocházely od zástupců řádů veslonozí (Pelecaniformes), tučňáci (Sphenisciformes), vrubozobí (Anseriformes), potáplice (Gaviiformes), plameňáci (Phoenicopteriformes), dlouhokřídlí (Charadriiformes) a brodiví (Ciconiiformes). Primery testovala na 6 nepříbuzných jedincích pelikána afrického. Z 221 testovaných párů primerů našla celkem 27 polymorfních mikrosatelitních lokusů se 2–5 alelami na lokus. Nejvíce polymorfních mikrosatelitů našla od zástupců z řádu veslonozí, a to celkem 15 (COR17, COR19, COR26, COR47, Dcco-05, Fmin13, PEL190, PEL265, Sn2A-36, Sn2B-83, Ss1b-16, Ss2b-48, Sv2A-26, Sv2A-47 a Sv2B-27). Dále našla 6 polymorfních lokusů od zástupců řádu brodiví (Ae26, CC3, Nn01, nycti41, nycti62 a PM2-28), 5 polymorfních lokusů od zástupců řádu plameňáci (PrA2, PrA110, PrD5, PrD7 a PrD117) a jeden polymorfní lokus od zástupce řádu dlouhokřídlí (Apy06). Od potápic, tučňáků a vrubozobých nenalezla žádný polymorfní lokus.

Chmelařová (2012) se ve své diplomové práci zabývala charakteristikou polymorfních *cross-species* mikrosatelitů u pelikána afrického a pelikána kadeřavého.

Pro testování použila polymorfní mikrosatelitní lokusy, které byly pro tyto dva druhy pelikánů nalezeny již dříve v diplomových pracích Ranochová (2008) a Mikulová (2010) a bakalářských pracích Dvořáková (2010) a Chmelařová (2010). Primery navržené pro vybrané polymorfní mikrosatelity testovala na 6 nepříbuzných jedincích pelikána afrického a na 6 nepříbuzných jedincích pelikána kadeřavého. Celkem testovala 47 párů primerů, které byly původně navrženy pro čápa východního (*Ciconia boyciana*), kormorána chocholatého (*Phalacrocorax aristotelis*), volavku červenou (*Egretta rufescens*) a faetona žlutozobého (*Phaethon lepturus*). Dále testovala 77 párů primerů pocházejících od různých druhů, které byly v předchozích pracích označeny jako monomorfní, ale vykazovaly polymorfismus u pelikána bílého a pelikána skvrnozobého. Všechny 75 polymorfních mikrosatelitů dále genotypovala na 12 nepříbuzných jedincích pelikána afrického a 41 jedincích pelikána kadeřavého pocházejících z chovné skupiny ZOO Dvůr Králové. Celkem vygenotypovala 51 polymorfních lokusů u pelikána afrického se 2–11 alelami na lokus a 24 polymorfních lokusů u pelikána kadeřavého se 2–8 alelami na lokus. Seznam polymorfních lokusů, které autorka našla ve své práci, je uveden v tab. č. 1. Autorka dále zjistila, že u lokusů Ah536, PEL185 a Wsu20 je vysoká pravděpodobnost výskytu nulových alel a lokusy Eru03 a Sn2A-36 jsou vázány na pohlaví na chromozom Z.

Tabulka č. 1: Seznam polymorfních mikrosatelitních lokusů nalezených v diplomové práci Chmelařová (2012) u pelikána afrického. V tabulce je uveden zdrojový druh a název mikrosatelitu.

Zdrojový druh	Lokus
Alkounek drobný (<i>Aethia pygmaea</i>)	Apy06
Čáp bílý (<i>Ciconia ciconia</i>)	CC9
Faeton žlutozobý (<i>Phaethon lepturus</i>)	P3F7
Fregatka obecná (<i>Fregata minor</i>)	Fmin13
Ibis rudý (<i>Eudocimus ruber</i>)	Eru03
Ibis čínský (<i>Nipponia nippon</i>)	Nn01, Nn04
Kachna divoká (<i>Anas platyrhynchos</i>)	APH12
Kolpík malý (<i>Platalea minor</i>)	PM2-28, PM3-31
Kormorán galapážský (<i>Phalacrocorax harrisi</i>)	PhB11
Kormorán ušatý (<i>P. auritus</i>)	COR17, COR19, COR26, COR41, COR47
Kormorán velký (<i>P. aristotelis</i>)	Phaari09
Kvakoš noční (<i>Nycticorax nycticorax</i>)	nycti26, nycti41, nycti62

Tabulka č. 1: Pokračování.

Zdrojový druh	Lokus
Nesyt lesní (<i>Mycteria americana</i>)	Wsu20
Pelikán bílý (<i>Pelecanus onocrotalus</i>)	PEL149, PEL185, PEL190, PEL221, PEL265, PEL304
Pelikán severoamerický (<i>P. erythrorhynchos</i>)	PeEr 02, PeEr 03, PeEr 04, PeEr 06, PeEr 08, PeEr 09
Plameňák růžový (<i>Phoenicopterus roseus</i>)	PrA2, PrA110, PrB1, PrD7, PrD117
Terej červenonohý (<i>Sula sula</i>)	Ss1b-16, Ss1b-106, Ss2b-48
Terej guánový (<i>S. varieagata</i>)	Sv2A-26, Sv2A-47, Sv2b-27
Terej modronohý (<i>S. nebouxii</i>)	Sn2A-36, Sn2B-83
Volavka červenavá (<i>Egretta rufescens</i>)	Er44
Volavka žlutozobá (<i>E. eulophotes</i>)	Ae26
Volavka velká (<i>Ardea herodias</i>)	Ah 536, Ah 630

V mé bakalářské práci (Kopečná, 2018) jsem otestovala celkem 213 párů primerů, které byly původně navrženy pro zástupce řádů trubkonosí (Procellariiformes), dlouhokřídlí (Charadriiformes) a pěvci (Passeriformes). Tyto páry primerů jsem testovala na 6 nepříbuzných jedincích pelikána afrického. Ze všech otestovaných párů primerů jsem našla 24 polymorfních (tab. č. 4), 184 monomorfních a 5 mikrosatelitů, které neposkytly produkt. U polymorfních mikrosatelitních lokusů se vyskytovaly 2–3 alely na lokus. Všechny 24 polymorfních mikrosatelitů pocházelo od zástupců řádu trubkonosí, od zástupců řádu dlouhokřídlí a pěvci nebyl nalezen žádný polymorfní lokus. Nejvíce polymorfních mikrosatelitů jsem našla od zástupců čeledi buňňákovití, a to celkem 13 (Paequ2, Paequ3, Paequ8, Cd3, Cd5, Pc A107, Pc B109, Bb25, Patbel 2, Patbel 3, Pacbel_00386, Pacbel_08988 a Pacbel_10033). Dále jsem našla 6 polymorfních lokusů původně pocházejících od zástupců čeledi buňňáčkovití, jednalo se o lokusy Ole21, Ole22, Ole26, Omn2, Omn8 a Omn23. Zbýlých 5 polymorfních mikrosatelitů pocházelo od zástupců čeledi albatrosovití, byly to lokusy De17, Dc9, STAL18, BFAL4 a LAAL7. Zjistila jsem také, že u pěti lokusů (BFAL4, Cd3, Ole26, Omn2 a Patbel3) by mohla být přítomna vazba na chromozom Z, všechny samice totiž vykazovaly homozygotní genotyp.

Adámková (2019) ve své bakalářské práci testovala 173 párů primerů na 6 nepříbuzných jedincích pelikána afrického, 113 párů primerů bylo původně navrženo pro zástupce řádu tučňáci (Sphenisciformes), u zbylých 60 párů se jednalo o univerzální ptačí

mikrosatelity. Otestováním všech párů primerů autorka našla celkem 12 polymorfních mikrosatelitních lokusů (tab. č. 3) se 2–5 alelami na lokus. Pouze jediný mikrosatelit (G2-1) neposkytl žádný produkt, zbylých 100 mikrosatelitních lokusů bylo monomorfních. Ze všech polymorfních mikrosatelitů jich 8 bylo původně navrženo pro zástupce řádu tučňáci, u zbylých 4 se jednalo o univerzální ptačí mikrosatelity. Nejvíce polymorfních lokusů pocházelo od tučňáka nejmenšího, a to celkem 4 (Emm 5, Emm 6, Emm 8 a Em 8). Dále našla jeden polymorfní mikrosatelitní lokus od tučňáka žlutorohého (Ech008), jeden od tučňáka žlutookého (Man13), jeden od tučňáka Humboldtova (Sh1Ca9) a jeden od tučňáka magellanského (M1-11). Zbylé 4 polymorfní lokusy patřily do skupiny univerzálních ptačích mikrosatelitů, v případě prvních dvou (CAM-07 a CAM-24) se jednalo o konzervované ptačí mikrosatelity, druhé dva (TG04-041 a TG11-011) se řadí mezi EST ptačí mikrosatelity.

4. Materiál a metody

4.1 Biologický materiál

Pro analýzu byla použita krev 12 nepříbuzných jedinců pelikána afrického (*Pelecanus rufescens*). Krev pocházela od jedinců chovaných v ZOO Dvůr Králové a byla odebrána tamními pracovníky. Izolaci genomické DNA z krve jedinců provedl vedoucí diplomové práce. K izolaci byla použita fenol-chloroformová metoda. Výsledná koncentrace DNA se po naředění pohybovala v rozmezí 4 až 10 µg/ml.

4.2 PCR amplifikace genomické DNA

K PCR amplifikaci byla použita DNA 12 nepříbuzných jedinců pelikána afrického. Celkem bylo použito ke genotypování 36 párů primerů a v každé reakci byl použit jeden pár. Složení PCR reakční směsi je uvedeno v tab. č. 2.

Tabulka č. 2: Složení PCR reakční směsi pro 12 vzorků.

Složka reakční PCR směsi	Objem [µl]
Deionizovaná voda	88,8
Reakční pufr pro PCR (10x)	13,4
Roztok MgCl ₂ (25 mmol/l)	8,0
Roztok dNTPs (20 mmol/l)	1,4
Primer R (10 µmol/l)	6,6
Primer F (10 µmol/l)	6,6
aTaq DNA polymeráza (5U/µl)	2,0

Postup při přípravě PCR mixu:

1. Složky PCR reakční směsi nechat rozmraznout, následně zvortexovat a zcentrifugovat. Poté do 1,5ml mikrozkušavky napipetovat jednotlivé složky PCR mixu o objemu uvedeném v tab. č. 2. Vzniklou PCR směs opět zvortexovat a zcentrifugovat.
2. Připravit 12 mikrozkušavek o objemu 0,2 ml. Do každé z nich přidat 1 µl genomické DNA od jednoho z 12 nepříbuzných jedinců pelikána afrického a následně napipetovat 9 µl připravené PCR reakční směsi. Celkový objem vzorku je 10 µl.
3. Uzavřené mikrozkušavky vložit do PCR termocykleru. Reakce probíhá podle

daného časového a teplotního profilu:

1. 94 °C: 5 min
2. 94 °C: 30 s
- T_A °C: 30 s
- 72 °C: 30 s
- } 35 cyklů
3. 72 °C: 7 min

Pro jednotlivé páry primerů byla použita teplota annealingu (T_A), která byla uvedena jako finální T_A v mé bakalářské práci (Kopečná, 2018) a bakalářské práci Veroniky Adámkové (Adámková, 2019). Pokud bylo potřeba, byla T_A upravena (viz Výsledky).

Ke *cross-species* PCR amplifikaci mikrosatelitů u 12 nepříbuzných jedinců pelikána afrického bylo celkem použito 36 párů primerů. Z těchto primerů bylo po jejich amplifikaci, v bakalářské práci Adámková (2019), 12 produktů označeno jako polymorfních u 6 nepříbuzných jedinců pelikána afrického (viz tab. č. 3). Primery pocházely od zástupců řádu tučňáci, kde amplifikovaly polymorfní mikrosatelity. Dále jsem z bakalářské práce Adámková (2019) použila čtyři polymorfní mikrosatelity, které patří do skupiny univerzálních ptačích mikrosatelitů. Jednalo se o lokusy CAM-07 a CAM-24 patřící mezi konzervované ptačí mikrosatelity (Dawson *et al.*, 2013) a lokusy TG04-041 a TG11-011, které se řadí mezi EST ptačí mikrosatelity (Dawson *et al.*, 2010). Zbylých 24 párů primerů bylo v rámci mé bakalářské práce Kopečná (2018) odvozeno od polymorfních mikrosatelitů u trubkonosých (viz tab. č. 4).

Tabulka č. 3: Seznam 8 mikrosatelitů, které byly odvozeny od zástupců řádu tučňáci a označeny jako polymorfní u pelikána afrického v bakalářské práci Adámková (2019).

Zdrojový druh	Lokus	Literární zdroj
Tučňák žltorohý (<i>Eudiptes chrysolophus</i>)	Ech008	Ahmed <i>et al.</i> , 2009
Tučňák nejmenší (<i>Eudiptula minor</i>)	Emm5, Emm6, Emm8	Billig <i>et al.</i> , 2007
	Em8	Grosser <i>et Waters</i> , 2015
Tučňák žlutooký (<i>Megadyptes antipodes</i>)	Man13	Boessenkool <i>et al.</i> , 2008
Tučňák Humboldtův (<i>Sphenicus humboldti</i>)	Sh1Ca9	Schlosser <i>et al.</i> , 2003
Tučňák magellanský (<i>S. magellanicus</i>)	M1-11	Akst <i>et al.</i> , 2002

Tabulka č. 4: Seznam 24 mikrosatelitů, které byly odvozeny od zástupců řádu trubkonosí. Tyto lokusy byly označeny jako polymorfní u pelikána afrického v mé bakalářské práci (Kopečná, 2018).

Čeď	Zdrojový druh	Lokus	Literární zdroj
Albatrosovití (Diomedidae)	Albatros stěhovavý (<i>Diomedea exulans</i>)	De17	Burg, 1999
	Albatros šedohlavý (<i>D. chrysostoma</i>)	Dc9	
	Albatros bělohřbetý (<i>Phoebastria albatrus</i>)	STAL18	Hernandez <i>et al.</i> , 2014
	Albatros černonohý (<i>P. nigripes</i>)	BFAL4	
	Albatros laysanský (<i>P. immutabilis</i>)	LAAL7	
Buřňáčkovití (Hydrobatida)	Buřňáček dlouhokřídlý (<i>Oceanodroma leucorhoa</i>)	Ole21, Ole22, Ole26	Bicknell <i>et al.</i> , 2011
	Buřňáček Monteirův (<i>O. monteiroi</i>)	Omn2, Omn8, Omn23	Bried <i>et al.</i> , 2012
Buřňákovití (Procellariidae)	buřňák bělobradý (<i>Procellaria aequinoctialis</i>)	Paequ2, Paequ3, Paequ8	Techow <i>et O’Ryan</i> , 2004
	Buřňák šedý (<i>Calonectris diomedea</i>)	Cd3, Cd5	Bried <i>et al.</i> , 2008
	Buřňák světlonohý (<i>Puffinus carneipes</i>)	Pc A107, Pc B109	Hardesty <i>et al.</i> , 2013
	Buřňák Bulwerův (<i>Bulweria bulwerii</i>)	Bb25	Andris <i>et al.</i> , 2010
	Buřňák útlozobý (<i>Pachyptila belcheri</i>)	Patbel2, Patbel3	Quilfeldt <i>et al.</i> , 2012
Pacbel_00386, Pacbel_08988, Pacbel_10033		Moodley <i>et al.</i> , 2015	

4.3 Zpracování produktů PCR amplifikace metodou elektroforetické separace

Po provedení *cross-species* PCR amplifikace následovala elektroforetická separace produktů za denaturujících podmínek. Byla použita sekvenační elektroforetická komůrka S2 Whatman Biometra a skla o rozměrech 330 x 390 mm a 330 x 420 mm. Byl použit 6% polyakrylamidový gel o tloušťce 0,4 mm. Jeho přípravu a proces vyvolávání vzorku je nutné provést v digestoři.

1. Obě skla omýt vodou a saponátem. Následně malé i velké sklo opláchnout deionizovanou vodou, osušit papírovou utěrkou, 2x opláchnout 96% ethanolem a opět osušit.
2. Na velké sklo použít přípravek Rain-off, který odpuzuje vodu. Ošetřit tu plochu skla, které se bude dotýkat gel. Poté celé sklo opláchnout deionizovanou vodou a osušit.
3. Na tu plochu malého skla, které se bude dotýkat gelu, nanést pomocí papírové utěrky roztok 3-methakryloxypropyltrimethoxysilanu a nechat zaschnout. Následně celé sklo 4x opláchnout 96% ethanolem. Po každém opláchnutí osušit papírovou utěrkou.
4. Velké sklo dát do digestoře na polystyrenovou desku a na jeho strany umístit dva spacers o tloušťce 0,4 mm. Na velké sklo položit malé sklo tak, aby plocha ošetřená roztokem 3-methakryloxypropyltrimethoxysilanu byla směrem k velkému sklu. Spacer zarovnat ke kraji skla a gumu spaceru natlačit na malé sklo tak, aby se spacer a malé sklo dotýkaly. Hrany obou skel by měly být na jedné straně v jedné linii a na straně druhé posunuty od sebe o cca 2,5 cm. Poté na každé straně v místě spacerů umístit dva klipsy.
5. V kádince připravit 6% polyakrylamidový gel. Roztok nalít mezi skla na té straně, kde jsou od sebe skla posunuta. Lehkým poklepáváním na sklo zabránit vzniku bublin.
6. Po zaplnění prostoru mezi skly gelem vložit hřebínek zoubky nahoru a zasunout cca 0,7 až 1 cm hluboko mezi skla. Následně skla v místě hřebínku sepnout k sobě čtyřmi klipsy. Gel nechat zatuhnout po dobu nejméně 1 hodiny.
7. Po uplynutí stanovené doby odstranit klipsy, omýt skla vodou a pomocí kartáčku odstranit zbytky gelu na okraji skel a v místě hřebínku. Sklo osušit papírovou utěrkou a vložit do elektroforetické komůrky tak, aby menší sklo bylo směrem k hliníkové desce a hřebínek směřoval nahoru.
8. Katodový i anodový prostor vyplnit 0,5x TBE pufrem. Vytáhnout hřebínek a vyčistit prostor mezi skly injekční stříkačkou. Oba elektrodové prostory uzavřít a připojit ke zdroji stejnosměrného elektrického proudu. Nastavit parametry zdroje na 90 W, 3000 V a 150 mA a nechat gel 30 minut nahřívat.
9. Před nanesením vzorků na gel ke každému vzorku přidat 5 μ l nanášecího pufru, následně vložit na 3 minuty do termocykleru a nechat denaturovat při 96 °C. Po ukončení procesu denaturace vzorky okamžitě přenést do nádoby s ledem, aby

nedošlo k renaturaci.

10. V průběhu denaturace odpojit od elektroforetické komůrky zdroj stejnosměrného elektrického proudu a elektrody. Injekční stříkačkou opětovně vyčistit prostor mezi skly a následně do něj zasunout hřebínek zoubky dolů cca 1 mm hluboko do gelu.
11. Osmikanálovou pipetou nanést vzorky o objemu 2 μ l do mezer mezi zoubky hřebínku. Po nanesení všech vzorků opět připojit elektrody a zdroj. Nastavit parametry na 70 W, 3000 V a 150 mA. Doba separace je závislá na relativní molekulové hmotnosti separovaných vzorků, následná délka separace je v rozmezí 90 až 180 min.
12. Během separace připravit vzorky k vyvolávání (Fix-stop, 1% HNO_3 , vývojka). Vývojku je třeba do doby použití uložit v chladničce.
13. Po skončení elektroforetické separace odpojit zdroj stejnosměrného elektrického proudu a elektrody. Následně vypustit pufr a vyjmout skla s gelem.
14. Skla položit na misku tak, aby menší sklo bylo směrem nahoru. Vytáhnout spacery i hřebínek a za použití nože skla od sebe odlepit.
15. Do fotomisky, umístěné na třepačce, přenést menší sklo plochou s gelem nahoru. Zalít roztokem Fix-stop a nechat působit cca 20 min.
16. Po uplynutí stanovené doby roztok slít zpět do baňky a gel 3x promýt v deionizované vodě.
17. Následně gel zalít 1% roztokem HNO_3 , umístit na třepačku a nechat působit 4 minuty. Poté roztok vylít do odpadu a sklo s gelem 4x propláchnout v deionizované vodě.
18. Gel opět ve fotomisce umístit na třepačku a zalít 0,1% roztokem AgNO_3 , do kterého bylo před použitím přidáno 1200 μ l formaldehydu. Roztok nechat působit 30 minut.
19. Po uplynutí stanovené doby slít roztok AgNO_3 zpět do lahve a sklo s gelem ponořit do předem nachystané misky s deionizovanou vodou na cca 3 vteřiny. Následně vložit do čisté fotomisky a zalít vývojkou, do které bylo před použitím přidáno 1200 μ l formaldehydu a 160 μ l 1% $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$.
20. Pozorovat vyvíjení stříbrem obarvených bandů, které mají na gelu hnědočernou barvu. Bandy značí jednotlivé PCR produkty. Pokud jsou bandy dostatečně zřetelné, zalít Fix-stop roztokem, aby došlo k zastavení vyvíjení.

21. Po cca 2 minutách roztok vylít do odpadu a sklo s gelem vložit do misky s deionizovanou vodou.
22. Následně sklo s gelem přenést do sušárny na cca 30 minut a 90 °C.
23. Vysušený gel vyhodnotit na negatoskopu.
24. Po vyhodnocení gel odlepit od skla pomocí roztoku NaOH o koncentraci 1 mol/l. Sklo je potřeba důkladně umýt vodou a saponátem, aby bylo možné jej znovu použít.

4.4 Softwarové vyhodnocení výsledků

Všechny genotypy polymorfních mikrosatelitních lokusů, které byly získány po PCR amplifikaci a následné elektroforetické separaci produktů byly převedeny do programu MS Office Excel 2016 a formátu .xlsx. Následně byly převedeny do formátu .csv a pomocí programu Cervus 3.0.7 (Kalinowski *et al.*, 2007) bylo provedeno jejich vyhodnocení. Byly získány informace o heterozygotnosti, odchylkách od Hardy-Weinbergovy rovnováhy a odhadované frekvence výskytu nulových alel. Následně byl použit program Genepop 4.7.5 (Rousset, 2008), pomocí kterého bylo u polymorfních mikrosatelitů zjišťováno, zda jsou lokusy ve vazbě.

4.5 Použité chemikálie

- Akrylamid (Sigma)
- *aTaq* DNA polymeráza (5 U/μl), M1241 (Promega)
- Bromfenolová modř (Serva)
- dNTPs (100 mmol/l, 400 μl každého), U1240 (Promega)
- Deionizovaná voda
- Dusičnan stříbrný (Sigma)
- Ethanol 96% roztok (Lihovar Vrbátky)
- Ethylendiaminotetraoctan sodný (Na₂EDTA) (Lachner)
- Formaldehyd (Lachner)
- Formamid (Lachner)
- Hydroxid sodný (Lachner)
- Chlorid sodný (Lachema)
- Kyselina boritá (Lachner)
- Kyselina dusičná - 65% roztok (Lachner)
- Kyselina octová (Lachner)

- 3-methakryloxypropyltrimethoxysilan (Serva)
- Močovina (Lachner)
- N,N-methylenbisakrylamid (AppliChem)
- N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin (TEMED) (AppliChem)
- Peroxodisíran amonný (Lachner)
- Rain-off - tekuté stěrače (Sheran)
- Thiosíran sodný (Lachema)
- Trishydroxymethylaminomethan (Tris) (AppliChem)
- Uhličitan sodný (Lachner)
- Xylenová modř (Xylencyanol FF) (AppliChem)

4.6 Použité roztoky

1. Akrylamid, 6% zásobní roztok:

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

2. Dusičnan stříbrný, 0,1% roztok:

- 0,8 g dusičnanu stříbrného
- 800 ml deionizované vody
- před použitím přidat 1200 µl formaldehydu

3. Fix/stop roztok:

- 80 ml ledové kyseliny octové
- 800 ml deionizované vody

4. Kyselina dusičná, 1% roztok:

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

5. Nanášecí pufr pro elektroforetickou separaci:

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

6. Peroxodisíran amonný, 10% roztok:

- 1 g peroxodisíranu amonného
- rozpustit v 8 ml deionizované vody, poté doplnit objem na 10 ml
- uchovávat v chladničce

7. Polyakrylamidový gel, 6% roztok:

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

8. Reakční pufr pro PCR, 10x

- 80 ml deionizované vody
- 1,211 g trishydroxymethylaminomethanu
- 3,73 g chloridu draselného
- 1 ml Triton X-100
- pH upravit pomocí kyseliny chlorovodíkové na hodnotu 9
- po rozpuštění doplnit na 100 ml

9. Roztok hydroxidu sodného o koncentraci 1 mol/l:

- 40 g hydroxidu sodného
- rozpustit v 800 ml deionizované vody, poté doplnit objem na 1 l

10. Roztok 3-methakryloxypropyltrimethoxysilanu:

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

11. TBE pufr, 10x zásobní roztok:

- 55 g kyseliny borité
- 108 g trishydroxymethylaminomethanu
- 40 ml roztoku disodné soli ethylendiamintetraoctové kyseliny 0,5 mol/l, pH 8
- rozpustit v 800 ml deionizované vody, poté doplnit objem na 1 l

12. Vývojka:

- 24 g uhličitanu sodného
- 800 ml deionizované vody
- uložit do chladničky
- před použitím přidat 1200 µl formaldehydu a 160 µl thiosíranu sodného

4.7 Použité laboratorní přístroje

- Elektroforetický zdroj EV232 (Consort)
- Hybridizační pec HB-2D (Techne)
- Chladnička kombinovaná (Whirlpool)
- Laboratorní váhy Mark S622 (BEL Engineering)
- Magnetická míchačka MR Hei-Combi (Heidolph)
- Mikropipety Finnpiquette - 0,5 až 10 μ l (osmikanálová) a 0,3 μ l až 1 ml (Thermo Labsystems)
- Mikropipety Nichipet EX 0,5 μ l až 1 ml (Nichiryo)
- Minicentrifuga CLE CSQSP (Clever Scientific)
- Minicentrifuga Prism mini (Labnet International)
- Spektrofotometr NanoDrop ND-1000 (Thermo Scientific)
- Negatoskop NEGA1 (Maneko)
- Sekvenační elektroforetická komůrka S2 (Whatman Biometra)
- Sušárna CAT 8050 (Contherm)
- PCR termocykler GenePro (BIOER)
- PCR termocykler PTC 100-96 VHB (MJ Research)
- PCR termocykler TC XP (BIOER)
- Třepačka Orbit 1 900 (Labnet International)
- Vortex mixer (Labnet International)
- Vortex MS2 (Ika)
- Výrobník deionizované a ultračisté vody typ 02 (AquaOsmotic)
- Výrobník ledové tříště (Brema Ice Makers)

5. Výsledky

V experimentální části diplomové práce bylo mým úkolem analyzovat a charakterizovat *cross-species* mikrosatelity, které jsem ve své bakalářské práci (Kopečná, 2018) označila jako polymorfní u pelikána afrického (*Pelecanus rufescens*). Dále jsem rovněž analyzovala a charakterizovala *cross-species* mikrosatelitní lokusy, které jako polymorfní u pelikána afrického nalezla ve své bakalářské práci Adámková (2019). Ve své bakalářské práci (Kopečná, 2018) jsem nalezla celkem 24 polymorfních mikrosatelitních lokusů u 6 nepříbuzných jedinců pelikána afrického, které pocházely od zástupců řádu trubkonosí. Adámková (2019) ve své bakalářské práci nalezla celkem 12 polymorfních lokusů u 6 nepříbuzných jedinců pelikána afrického. Tyto lokusy pocházely od zástupců řádu tučňáci (8) nebo se jednalo o univerzální ptačí mikrosatelity (4). V rámci diplomové práce jsem tedy genotypovala celkem 36 mikrosatelitních lokusů na 12 nepříbuzných jedincích pelikána afrického.

Při *cross-species* PCR amplifikaci těchto lokusů jsem použila takovou teplotu annealingu (T_A), která byla uvedena jako finální u jednotlivých mikrosatelitních lokusů v mé bakalářské práci (Kopečná, 2018) nebo v bakalářské práci Adámková (2019). U některých lokusů byla pro genotypizaci nutná úprava T_A , protože některé produkty PCR amplifikace byly buď moc silné, nebo moc slabé, a tudíž obtížně hodnotitelné. Finální T_A se pohybovaly od 46 do 65 °C. Následná elektroforetická separace produktů PCR probíhala rovněž při finální délce separace uvedené v bakalářských pracích Kopečná (2018) a Adámková (2019) pro jednotlivé polymorfní lokusy. U některých lokusů byla nutná optimalizace délky separace. Nejkratší délka elektroforetické separace v 6% polyakrylamidovém gelu za denaturujících podmínek činila 90 minut a nejdelší 180 minut.

Všech 36 testovaných mikrosatelitních lokusů při *cross-species* PCR amplifikaci u 12 nepříbuzných jedinců pelikána afrického poskytlo produkt. U 34 mikrosatelitů jsem produkt označila jako polymorfní. Seznam těchto mikrosatelitů je uveden v tab. č. 6. Při genotypizaci těchto lokusů u 12 nepříbuzných jedinců pelikána afrického bylo detekováno 2 až 5 alel na lokus. Dva mikrosatelity, Dc9 (Burg, 1999), který původně pocházel od albatrosa šedohlavého z čeledi albatrosovití a Pc A107 (Hardesty *et al.*, 2013), který původně pocházel od buňňáka světlonohého z čeledi buňňákovití, jsem označila jako monomorfní, což znamená, že v mé bakalářské práci (Kopečná, 2018) byly na 6 nepříbuzných jedincích pelikána afrického chybně označeny za polymorfní. Oba tyto

mikrosatelity měly původně mít 2 alely, při testování na větším počtu jedinců se však ukázalo, že se jednalo pouze o výskyt artefaktů, nikoli o polymorfní mikrosatelit. Tyto artefakty mohly vzniknout při PCR nebo při elektroforetické separaci produktů.

Ze všech 386 mikrosatelitů testovaných v bakalářských pracích (Kopečná, 2018; Adámková, 2019) bylo dohromady vybráno 36 polymorfních, z nichž jsem u 34 z nich polymorfismus v této diplomové práci prokázala. Nejvíce mikrosatelitů bylo odvozeno od zástupců z řádu trubkonosí, a to celkem 22, což odpovídá 10,3% úspěšnosti nalezení. Z toho nejvíce od 5 zástupců čeledi buňňákovití, a to celkem 12 ze 100 testovaných, což odpovídá úspěšnosti 12 %. Od čeledi buňňáčkovití pocházelo celkem 6 nalezených polymorfních mikrosatelitů od 2 druhů z celkových 54 testovaných lokusů. Úspěšnost zde tedy byla 11,1 %. A nejméně polymorfních lokusů (4) bylo nalezeno od 4 zástupců čeledi albatrosovití. Celkem bylo od albatrosovitých otestováno 53 lokusů a nalezení 4 polymorfních lokusů odpovídá úspěšnosti 7,5 %.

V případě mikrosatelitů, které byly původně odvozeny od zástupců řádu tučňáci, jich ze 113 mikrosatelitů poskytlo polymorfní produkt 8, což odpovídá 7% úspěšnosti. Tyto polymorfní mikrosatelity byly nalezeny celkem od 5 druhů. Nejvíce jich pocházelo od tučňáka nejmenšího (4). Od tučňáka žltorohého, žltookého, magellanského a Humboldtova bylo nalezeno po 1 polymorfním lokusu. Zbylé 4 polymorfní lokusy patřily mezi univerzální ptačí mikrosatelity a sice u dvou se jednalo o konzervované ptačí mikrosatelity, kterých bylo celkem otestováno 24 a u dvou o EST ptačí mikrosatelity, kterých bylo původně otestováno 36. U univerzálních ptačích mikrosatelitů poskytly u pelikána afrického z celkových 60 polymorfní proudků 4 páry primerů. To odpovídá 6,7% úspěšnosti. V případě konzervovaných ptačích mikrosatelitů byla pak úspěšnost stanovení 8,3 % a u EST ptačích mikrosatelitů 5,6 %. V grafu č. 1 jsou uvedeny všechny polymorfní lokusy u pelikána afrického, které byly nalezeny v této práci. Jsou rozděleny podle druhů, od kterých byly původně izolovány.

Tabulka č. 5: Charakteristika 34 polymorfních mikrosatelitních lokusů, testovaných u 12 nepříbuzných jedinců pelikána afrického. V tabulce je uveden vždy název lokusu i s kódem z databáze GenBank, dále zdrojový druh, jednotka repetice, sekvence primerů, počet alel (N), teplota anelingu (T_A), délka elektroforetické separace (ELFO), pravděpodobnost výskytu nulových alel a případná odchylka od Hardy-Weinbergovy rovnováhy (HW) (ND - netestováno, NS - v souladu, ** - signifikantní odchylka na hladině 1 %).

Název lokusu (GenBank Accession no.)	Zdroj	Jednotka repetice	Sekvence primerů (5' → 3')	N	T_A [°C]	ELFO [min]	Nulové alely	HW
De17 (AF096798)	Albatros stěhovavý	CA	F: TCTCAGGCCCTTGTCTAAC R: AAAATGGTCCCACAGAGCAC	2	46	90	0,06	ND
STAL18 (neuveďeno)	Albatros bělohřbetý	ATG	F: CAGTTCCAAAGAAGGAAAACC R: GTTTGGAGTGGTCTTGGGTACAGC	2	58	90	0,14	ND
BFAL4 (neuveďeno)*	Albatros černonohý	TC	F: TGGGTCAGTTTACCTCTCAGC R: GTTTGCCATTTAAACTGTCATTGGC	2	58	90	1,00	**
LAAL7 (neuveďeno)	Albatros laysanský	AGC	F: CAGCATGACCAAATCCATCC R: GTTTGGACACAAATGCCGTTCTTG	2	59	120	-	ND
Ole21 (FR696397)	Buňáček dlouhokřídý	GA/A/GAAA	F: CCACGAGAAATGGACATACAAC R: TGAAGAACTTCCGAAATAACTGTG	2	60	90	-	ND
Ole22 (FR696398)		CT	F: AGCAGAGGCCACTACATCAC R: AAATATCATAGGGGAGTAAAGAGC	2	55	180	-	ND
Ole26 (FR696402)		TG	F: TCAGCTTCTGGTGCAGTTATG R: TCCTGCTGATGGATAGGTTATG	2	52	90	1,00	**
Omn2 (JQ303227)	Buňáček Monteirův	AC/AT	F: ATTTTCGTCTTGCTTCCAAA R: ACAAATAACCAGGATTGATAATA	2	55	120	0,14	NS
Omn8 (JQ303232)		AC	F: TGCAACCTTAGCATTACCTAGC R: GGGGCGAGCATTACATTAATA	4	55	110	0,11	NS
Omn23 (JQ303240)		TTG	F: GGAAAAGGAGACTAGATCTTGTGAA R: AAACCTACTTTGTTATTTCCATATGTTT	2	52	90	0,25	ND

* lokus byl z další analýzy vyřazen.

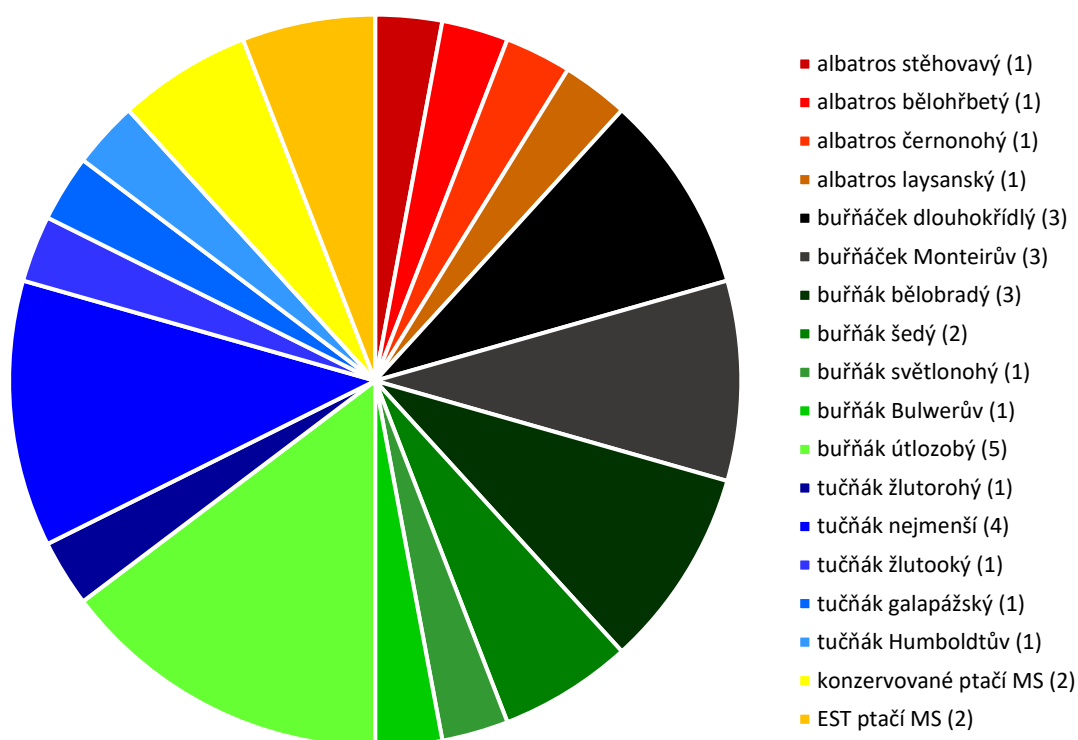
Tabulka č. 5: Pokračování 1.

Název lokusu (GenBank Accession no.)	Zdrojový	Jednotka repetice	Sekvence primerů (5' → 3')	N	T _A [°C]	ELFO [min]	Nulové alely	HW
Paequ2 (AY371070)	Buňák bělobradý	CA	F: GCCTACTCCATCTTAATTGTG R: GGTTCATACAGTTTCCTAGGTC	4	55	120	0,03	ND
Paequ3 (AY371071)		GA	F: TGTGGGTGCAGTAGAGCA R: CAATAAGAAGATCAGCAGAACAGAC	3	56	120	-	NS
Paequ8 (AY371074)		CA	F: TATTCTGAGACTTGC GTTATCC R: GTGATCCATTAGTTGATGTCTACTG	3	51	180	0,29	NS
Cd3 (EU029085)	Buňák šedý	GT/CT	F: TTGCCTCTTTTACAGGACTGC R: TCCCTGTGGCTAAGGATCTG	2	57	120	-	NS
Cd5 (EU029087)		GT/AT	F: CTGCACAGACTGAGAGTATAAGATTC R: GGCTTAAAGGGTAAATACACATGG	2	50	90	-	ND
Pc B109 (JX435475)	Buňák světlonohý	CAA	F: CTCAGAGCGATCACACTGTACT R: AAAGCATTTCAGGATGTAGGTTTC	2	60	120	0,14	NS
Bb25 (HM171901)	Buňák Bulwerův	AC	F: GCATCCCTGGA ACTCTGATT R: GAATGAACCAGCCAGAAGGT	3	64	120	0,07	ND
Patbel2 (JF288776)	Buňák útlozobý	CT/AT	F: GGTGTCATGCAACTGACTGAA R: CAATGGGAATGGCAGAGACT	2	52	90	-	NS
Patbel3 (JF288777)		CT/AT	F: CCTTCCCTAGAGCAATGGAG R: TGCACACACTGAAAGAGGACA	4	51	90	0,02	NS
Pacbel_00386 (neuveдено)		AC	F: CATGTCTACAAACAAGCACG R: TCACTGGAAACCAGAGTAGGC	2	58	90	-	NS
Pacbel_08988 (neuveдено)		CT	F: CTGATCGGTTGTGCTCTGTG R: GCGGAAAGATCCTAACAAGCC	2	51	90	-	ND
Pacbel_10033 (neuveдено)		TG	F: CAACGCGCTTTTGGTTTIGC R: GGCCACTCACCACAATACAAG	4	47	90	-	NS

Tabulka č. 5: Pokračování 2.

Název lokusu (GenBank Accession no.)	Zdroj	Jednotka repetice	Sekvence primerů (5' → 3')	N	T _A [°C]	ELFO [min]	Nulové alely	HW
Ech008 (FM878339)	Tučňák žlutorohý	CA	F: TGGGAAGCGTAACGGCCTAA R: TCAGTCACTCTCCCATTTGTAGGG	2	59	90	-	NS
Emm5 (DQ837733)	Tučňák nejmenší	CTTT	F: ATTAACTTGGCCTTGGGTTC R: TTTATGCTCCCTCATTCCAC	3	47	90	-	ND
Emm6 (DQ837734)		CT	F: TTGTTGGTCTGTATCACAAGG R: CAGGGAAGTGTGAGTAAATGG	2	55	90	0,30	NS
Emm8 (DQ852599)		CA/CT	F: TGCACACTAGCAGATACGG R: GACAAATTGTGCTTGTGTCAGC	2	56	180	-	ND
Em8 (KM272226)		AGAT	F: GGTGCTGGGAGATGGCTTC R: ACGAAATGGTTTGGCTGGTG	5	65	120	0,20	NS
Man13 (EU267111)		Tučňák žlutooký	GT	F: AACACATTTGACAGCCTG R: GTTATTCCAACACCAAGC	3	55	90	0,15
Sh1Ca9 (AF540006)	Tučňák Humboldtův	T/GT	F: AGCAGATGTGGGGGTTGTAG R: AAGTCAGTGTTATGCCAAGATACG	2	48	90	-	NS
M1-11 (neuveдено)	Tučňák magellanský	TG	F: CTCGTTCTAGCCTTCTGTTC R: AGCCCAGTCTTCACTGC	2	46	90	-	NS
CAM-07 (neuveдено)	Konzervované ptačí mikrosatelity	CT	F: AAATGATGARTCTGGGTGAG R: CCATTTCCAAGWGATTTGC	2	57	120	0,25	ND
CAM-24 (neuveдено)		CA	F: CCCACTTCAGTCTTCAGAGC R: TGGAGTATTTGGGATTGGAG	3	61	90	-	ND
TG04-041 (CK316380)	EST ptačí mikrosatelity	AG/TG	F: CTGAATTGTTGACCTTTGCTTAC R: GTCCTTTTAGAAAGCAGCACAG	2	64	120	-	NS
TG11-011 (CK308096)		AT/AA	F: ACAAATAAGTACATCTATATCTGAAG R: TAAATACAGGCAACATTGG	3	60	120	-	NS

Graf č. 1: Rozdělení 34 mikrosatelitních lokusů, které byly označeny jako polymorfní, při genotypizaci na 12 nepříbuzných jedincích pelikána afrického. V závorce je vždy uveden počet polymorfních lokusů, které byly izolovány od jednotlivých zástupců z čeledi buřňákovití, buřňáčkovití, albatrosovití, řádu tučňáci a dále pak počet polymorfních lokusů ze skupiny EST ptačích mikrosatelitů a konzervovaných ptačích mikrosatelitů.



U 34 polymorfních mikrosatelitů bylo nalezeno 2–5 alel na lokus. V případě 22 mikrosatelitních lokusů byly nalezeny 2 alely. U 7 mikrosatelitů se vyskytovaly 3 alely. Dále u čtyř lokusů byly nalezeny 4 alely a jeden lokus vykazoval 5 alel. V případě procentuálního rozdělení se 2 alely vyskytovaly u 64,7 % mikrosatelitů. Mikrosatelity se třemi alelami tvoří 20,6 % z celku, se čtyřmi alelami 11,8 % a s pěti alelami 2,9 %. Všechny polymorfní mikrosatelity nalezené u 12 nepříbuzných jedinců pelikána afrického byly vygenotypovány. Přehled získaných genotypů je uveden v tab. č. 6.

Tabulka č. 6: Přehled získaných genotypů 34 polymorfních mikrosatelitů, které byly nalezeny u 12 nepříbuzných jedinců pelikána afrického metodou *cross-species* PCR amplifikace. V tabulce je vždy uveden název lokusu, zdrojový druh, počet alel (A) a genotyp každého jedince.

Lokus	Zdroj	A	Genotyp jedince č.											
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
De17	Albatros stěhovavý	2	1/1	1/1	1/1	1/2	1/2	1/1	1/2	1/1	2/2	1/2	1/1	1/1
STAL18	A. bělohřbetý	2	2/2	1/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	1/2	1/1	2/2	1/2
BFAL4	A. černonohý	2	1/1	2/2	1/1	2/2	1/1	1/1	1/1	2/2	2/2	1/1	2/2	1/1
LAAL7	A. laysanský	2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	1/2	2/2	1/2	2/2	1/2	2/2	2/2
Ole21	Buřňáček dlouhokřídlý	2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	1/2	2/2	2/2	2/2	2/2
Ole22		2	1/1	1/2	1/1	1/2	1/1	1/2	1/1	1/1	1/1	1/2	1/2	1/2
Ole26		2	2/2	1/1	2/2	1/1	2/2	2/2	2/2	1/1	1/1	2/2	1/1	2/2
Omn2	B. Monteirův	2	1/1	1/2	2/2	2/2	1/2	1/2	2/2	2/2	1/1	2/2	1/2	2/2
Omn8		4	2/3	1/2	2/2	3/3	2/2	3/4	2/2	3/3	2/3	2/3	2/2	1/3
Omn23		2	1/1	2/2	2/2	1/2	2/2	2/2	2/2	1/2	2/2	2/2	2/2	2/2
Paequ2	Buřňák bělobradý	4	2/3	2/2	2/2	1/4	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/3	2/4	2/4
Paequ3		3	1/1	1/3	3/3	1/2	1/3	3/3	2/3	3/3	1/3	3/3	1/3	1/3
Paequ8		3	1/1	1/1	3/3	2/3	1/1	1/2	2/2	1/2	1/1	1/2	3/3	1/1
Cd3	B. šedý	2	1/1	1/2	2/2	1/2	1/2	1/2	1/2	1/1	1/2	1/1	1/2	2/2
Cd5		2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	1/2
Pc B109	B. světlonohý	2	1/2	2/2	1/1	1/2	1/2	2/2	2/2	1/1	2/2	1/2	2/2	2/2
Bb25	B. Bulwerův	3	3/3	2/3	3/3	3/3	1/3	3/3	3/3	1/1	3/3	1/3	1/3	3/3
Patbel2	B. útlozobý	2	2/2	1/2	1/2	1/2	2/2	1/2	1/2	1/2	1/2	1/2	1/1	2/2
Patbel3		4	3/4	3/3	1/2	2/3	3/4	1/2	3/4	4/4	3/4	3/3	2/3	2/2
Pacbel_00386		2	1/2	1/2	1/2	1/2	1/1	1/1	1/2	1/1	1/2	1/2	1/2	1/1
Pacbel_08988		2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	1/2	2/2	2/2
Pacbel_10033		4	1/3	2/3	2/3	2/3	1/2	1/3	1/2	3/3	3/4	1/2	2/3	2/3

Tabulka č. 6: Pokračování 1.

Lokus	Zdroj	A	Genotyp jedince č.											
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Ech008	Tučňák žlutorohý	2	1/1	1/2	1/1	1/2	1/2	1/2	1/2	1/1	1/2	2/2	1/1	1/1
Emm5	T. nejmenší	3	1/2	1/1	1/1	1/2	1/3	1/2	1/1	1/1	1/1	1/2	1/2	1/1
Emm6		2	2/2	1/1	1/2	2/2	1/1	1/2	1/1	2/2	1/2	1/1	1/1	1/1
Emm8		2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	1/2
Em8		5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	2/5	5/5	1/2	3/5	4/5	5/5	3/3
Man13	T. žlutooký	3	3/3	3/3	3/3	2/3	3/3	3/3	3/3	3/3	1/1	1/3	3/3	2/3
Sh1Ca9	T. Humboldtův	2	1/2	2/2	1/1	1/2	1/2	1/2	1/1	1/1	1/2	1/1	1/2	1/2
M1-11	T. magellanský	2	1/1	1/2	1/2	1/2	1/1	1/2	1/1	1/2	1/1	1/1	2/2	1/2
CAM-07	Konzervované ptačí MS	2	1/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	1/1	1/2	2/2
CAM-24		3	2/2	1/2	2/3	2/3	2/2	2/2	2/2	2/2	1/2	2/2	1/2	2/2
TG04-041	EST ptačí MS	2	1/2	1/2	2/2	2/2	1/1	1/2	1/2	1/2	1/2	1/2	1/2	1/1
TG11-011		3	2/3	2/3	1/2	1/3	2/2	2/2	2/2	1/2	2/3	3/3	1/3	1/3

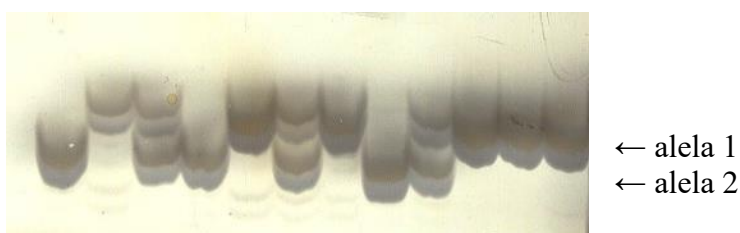
Analýzou výsledků v programu Genepop 4.7.5 (Rousset, 2008) bylo zjišťováno, zda jsou některé lokusy ve vazbě. Byla zjištěna vazba mezi lokusy BFAL4, který byl původně izolován od albatrosa černonohého a Ole26, který původně pocházel od buňáčka dlouhokřídlého. Z těchto lokusů byl pro další analýzu vybrán lokus Ole26, který byl lépe hodnotitelný. Ze všech 34 polymorfních lokusů charakterizovaných v této práci jich bylo 33 vyhodnoceno jako vzájemně nezávislých.

Pro všech 33 vzájemně nezávislých nalezených polymorfních lokusů byla dále provedena analýza v programu Cervus 3.0.7 (Kalinowski *et al.*, 2007). Průměrný počet alel na lokus se rovnal 2,545 a očekávaná heterozygotnost byla 0,4242. Dále byla zjištěna pravděpodobnost chybného provedení paternitní analýzy za předpokladu, že je přiřazováno mládě, u kterého není znám ani jeden rodič, která činí $3,102 \cdot 10^{-2}$. Pokud je znám pouze jeden rodič, je pravděpodobnost chybného přiřazení druhého rodiče rovna $7,815 \cdot 10^{-4}$. Pravděpodobnost chybného přiřazení celého rodičovského páru k mláděti je $6,38 \cdot 10^{-6}$. Dále byla zjištěna hodnota $1,346 \cdot 10^{-13}$, která odpovídá pravděpodobnosti výskytu dvou jedinců se stejnou alelovou variantou pro všech 33 lokusů a hodnota

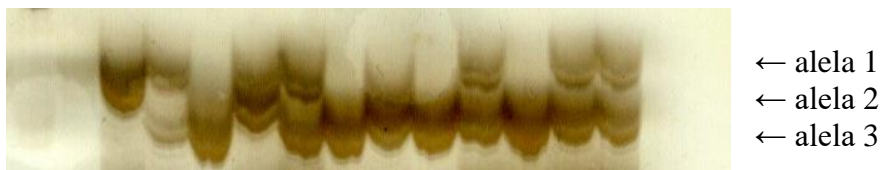
$5,5 \cdot 10^{-7}$, která odpovídá pravděpodobnosti výskytu dvou mláďat, která se svými genotypy shodují ve všech 33 lokusech.

Ze všech 33 vzájemně nezávislých lokusů jich 17 bylo v souladu s Hardy-Weinbergovou rovnováhou. U lokusu Ole26 byla zjištěna výrazná odchylka od Hardy-Weinbergovy rovnováhy (stejnou odchylku vykazoval i lokus BFAL4, ale ten byl kvůli vazbě s lokusem Ole26 vyřazen - viz výše). U zbylých 15 z nich program Cervus 3.0.7 (Kalinowski *et al.*, 2007) nedokázal tento soulad vypočítat. Co se týče pravděpodobnosti výskytu nulových alel, byla tato skutečnost zjištěna u 15 lokusů. Vysoká pravděpodobnost frekvence výskytu nulových alel byla zjištěna u lokusu Ole26, kdy vypočítané hodnoty činily téměř 100 %. Stejné parametry byly zjištěny i u lokusu BFAL4, který však byl z analýzy vyřazen z důvodu vazby s lokusem Ole26. Dále u 4 lokusů byla pravděpodobnost výskytu nulových alel vyšší než 20 %, u 5 lokusů vyšší než 10 % a u 2 lokusů vyšší než 5 %. U zbylých 3 lokusů byla frekvence výskytu nulových alel nižší než 5 %.

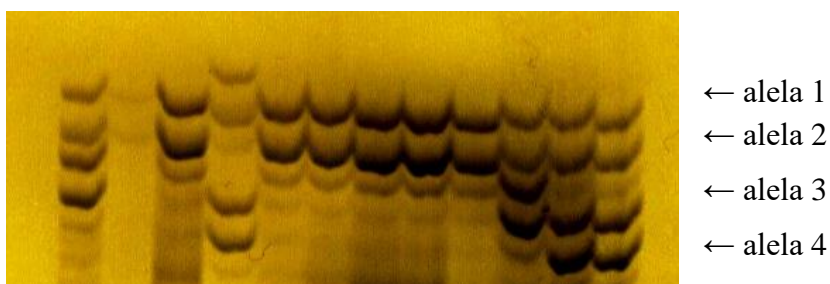
Při hodnocení výsledků byly pořízeny skeny všech gelů. Vybrané mikrosatelitní lokusy jsou viditelné na následujících obrázcích. Na jednotlivých elektroforetogramech mohou být pozorovány jednotlivé lokusy po provedení *cross-species* PCR amplifikace na 12 nepříbuzných jedincích pelikána afrického. Jedná se o mikrosatelity Emm5 (obr. č. 5), Paequ3 (obr. č. 6) a Paequ2 (obr. č. 7).



Obrázek č. 1: Elektroforetogram mikrosatelitu Emm5 genotypovaného na 12 nepříbuzných jedincích pelikána afrického. *Cross-species* PCR amplifikace proběhla při T_A 47 °C a doba elektroforetické separace byla 90 min. Pro tento mikrosatelit byly nalezeny 2 alely.



Obrázek č. 2: Elektroforetogram mikrosatelitu Paequ3 genotypovaného na 12 nepříbuzných jedincích pelikána afrického. *Cross-species* PCR amplifikace proběhla při T_A 56 °C a doba elektroforetické separace byla 120 min. Pro tento mikrosatelit byly nalezeny 3 alely.



Obrázek č. 3: Elektroforetogram mikrosatelitu Paequ2 genotypovaného na 12 nepříbuzných jedincích pelikána afrického. *Cross-species* PCR amplifikace proběhla při T_A 55 °C a doba elektroforetické separace byla 120 min. Pro tento mikrosatelit byly nalezeny 4 alely.

Mikrosatelity, které měly větší počet alel, byly mnohdy velice obtížně hodnotitelné. Jednalo se například o lokus Em8 s 5 alelami nebo Pacbel_10033 se čtyřmi alelami. U obtížně hodnotitelných mikrosatelitů byla nutná optimalizace podmínek PCR amplifikace, konkrétně T_A . Tyto hůře hodnotitelné mikrosatelitní lokusy nejsou vhodné ke studiu paternity, jelikož by mohly poskytovat nedůvěryhodné výsledky. Naopak lokusy s menším počtem alel, byly hodnotitelné velmi dobře, např. Emm5 se dvěma alelami nebo Paequ3 se třemi alelami.

6. Diskuze

Všechny mikrosatelitní lokusy charakterizované v této diplomové práci byly označeny jako polymorfní v bakalářské práci Kopečná (2018) a Adámková (2019) při testování na 6 nepříbuzných jedincích pelikána afrického. Celkem 24 mikrosatelitů pocházelo od zástupců řádu trubkonosí, 10 od zástupců řádu tučňáci a u 4 se jednalo o univerzální ptačí mikrosatelity. V této diplomové práci jsem pomocí metody *cross-species* PCR amplifikace genotypovala celkem 36 lokusů na 12 nepříbuzných jedincích pelikána afrického (*Pelecanus rufescens*), u 34 lokusů byl polymorfismus potvrzen a bylo u nich detekováno 2–5 alel na lokus. U dvou lokusů se po testování na větším počtu jedinců ukázalo, že jsou monomorfní. Jednalo se o lokusy Dc9 a Pc A107, které byly původně odvozeny od zástupců řádu trubkonosí. Analýzou v programu Genepop 4.7.5 (Rousset, 2008) jsem zjistila, že dva ze 34 polymorfních lokusů jsou ve vzájemné vazbě. Jednalo se o lokusy BFAL4 od albatrosa černonohého a Ole26 od buňňáčka dlouhokřídlého. Pro další analýzu byl vybrán lokus Ole26, který byl lépe hodnotitelný. Celkem jsem tedy pro pelikána afrického charakterizovala celkem 33 polymorfních a vzájemně nezávislých lokusů.

Od zástupců čeledi albatrosovití bylo testováno celkem 53 mikrosatelitních lokusů, z nichž byly celkem 4 označeny jako polymorfní u pelikána afrického. Jednalo se o lokus De17 původně navržený pro albatrosa stěhovavého (*Diomedea exulans*), STAL18, který původně pocházel od albatrosa bělohřbetého (*Phoebastria albatrus*), BFAL4 od albatrosa černonohého (*P. nigripes*) a LAAL7 od albatrosa laysanského (*P. immutabilis*). U všech čtyř mikrosatelitů byly nalezeny 2 alely na lokus.

Burg (1999) našla celkem 26 mikrosatelitních lokusů od albatrosa stěhovavého a šedohlavého. Mezi nimi je i lokus De17, který byl původně izolován od albatrosa stěhovavého a v mé diplomové práci genotypován na 12 nepříbuzných jedincích pelikána afrického metodou *cross-species* PCR amplifikace. Autorka použila rovněž metodu PCR amplifikace, při které aplikovala 2 různé teploty annealingu (T_A), jednu pro prvních 7 cyklů PCR reakce a druhou pro zbylých 25 cyklů. Nalezené mikrosatelity testovala na 90 jedincích albatrosa stěhovavého a 50 jedincích albatrosa šedohlavého. U lokusu De17 autorka použila teploty annealingu T_{A1} 48 °C a T_{A2} 52 °C a testovala je na 90 jedincích albatrosa stěhovavého, avšak nenalezla žádnou polymorfní oblast. V mé diplomové práci jsem u toho mikrosatelitu použila T_A 46 °C a při charakterizaci na 12 nepříbuzných

jedincích pelikána afrického jsem detekovala 2 alely. Autorka dále otestovala pomocí *cross-species* PCR amplifikace všech 26 lokusů na 50 jedincích albatrosa černobrvého a 50 jedincích albatrosa šedohlavého. Pro lokus De17 našla u albatrosa černobrvého 4 alely a u albatrosa šedohlavého 3 alely.

Hernandez *et al.* (2014) našli celkem 15 mikrosatelitů pro albatrosa černonohého, laysanského a bělohřbetého. Já jsem při genotypování těchto mikrosatelitů na 12 nepříbuzných jedincích pelikána afrického našla 3 polymorfní lokusy (BFAL4, LAAL7 a STAL18). U všech tří mikrosatelitů byly detekovány 2 alely na lokus. Lokus BFAL4 byl původně izolován od albatrosa černonohého, lokus LAAL7 od albatrosa laysanského a lokus STAL18 od albatrosa bělohřbetého. Všechny tyto 3 lokusy byly primárně otestovány na druhu, od něhož byly odvozeny a poté na dalších dvou druhích metodou *cross-species* PCR amplifikace. Testování autoři prováděli na 36 jedincích albatrosa černonohého, 12 jedincích albatrosa laysanského a 3 jedincích albatrosa bělohřbetého. Přehled nalezených alel a použitých T_A je uveden v tab. č. 7.

Tabulka č. 7: Přehled nalezených polymorfních mikrosatelitů u 12 nepříbuzných jedinců pelikána afrického (tato práce), 36 jedinců albatrosa černonohého, 12 jedinců albatrosa laysanského a 3 jedinců albatrosa bělohřbetého (Hernandez *et al.*, 2014). V tabulce je uveden název lokusu, teplota annealingu (T_A) a počet nalezených alel (A).

Lokus	Pelikán africký		Albatros černonohý		Albatros laysanský		Albatros bělohřbetý	
	T_A [°C]	A	T_A [°C]	A	T_A [°C]	A	T_A [°C]	A
BFAL4	58	2	60	8	60	4	60	2
LAAL7	59	2		4		4		2
STAL18	58	2		7		7		M*

* monomorfní

Pro zástupce čeledi buřňáčkovití bylo otestováno 54 mikrosatelitů. Při testování těchto mikrosatelitů na 12 nepříbuzných jedincích pelikána afrického jsem charakterizovala celkem 6 polymorfních mikrosatelitů se 2–4 alelami na lokus. Konkrétně se jednalo o mikrosatelity Ole21, Ole22 a Ole26, které byly izolovány od buřňáčka Monteirova (*Oceanodroma monteiroi*) a dále o lokusy Omn2, Omn8 a Omn23, které původně pocházely od buřňáčka dlouhokřídlého (*O. leucorhoa*).

Bicknell *et al.* (2011) našli celkem 26 mikrosatelitních lokusů u buňáčka dlouhokřídleho. Tyto mikrosatelity autoři otestovali na 24 jedincích tohoto druhu. Při testování těchto mikrosatelitů metodou *cross-species* PCR amplifikace na 12 nepříbuzných jedincích pelikána afrického jsem našla celkem 3 polymorfní lokusy. Porovnání nalezených alel a použitých teplot annelingu je uvedeno v tab. č. 8.

Tabulka č. 8: Přehled nalezených polymorfních mikrosatelitů u 12 nepříbuzných jedinců pelikána afrického (tato práce) a 24 jedinců buňáčka dlouhokřídleho (Bicknell *et al.*, 2011). V tabulce je uveden název lokusu, použitá teplota annelingu (T_A) a počet nalezených alel (A).

Lokus	Pelikán africký		Buňáček dlouhokřídleý	
	T_A [°C]	A	T_A [°C]	A
Ole21	60	2	60	21
Ole22	55	2		3
Ole26	52	2		2

Bried *et al.* (2012) našli celkem 18 mikrosatelitů u buňáčka Monteirova. Testování autoři prováděli na 125 jedincích tohoto druhu a ve všech případech použili stejnou T_A 58 °C. V mé diplomové práci jsem z těchto 18 mikrosatelitů našla 3, které vykazovaly polymorfismus při testování metodou *cross-species* PCR amplifikace na 12 nepříbuzných jedincích pelikána afrického. Srovnání použitých teplot annelingu a nalezených alel uvádím v tab. č. 9.

Tabulka č. 9: Přehled nalezených polymorfních mikrosatelitů u 12 nepříbuzných jedinců pelikána afrického (tato práce) a 125 jedinců buňáčka Monteirova (Bried *et al.*, 2012). V tabulce je uveden název lokusu, použitá teplota annelingu (T_A) a počet nalezených alel (A).

Lokus	Pelikán africký		Buňáček Monteirov	
	T_A [°C]	A	T_A [°C]	A
Omn2	55	2	58	7
Omn8	55	4		10
Omn23	52	2		4

Pro zástupce čeledi buňňákovití bylo otestováno 100 mikrosatelitních lokusů. V rámci mé diplomové práce jsem charakterizovala 12 polymorfních mikrosatelitů se 2–4 alelami na lokus. Jednalo se o lokusy Paequ2, Paequ3 a Paequ8, které byly původně navrženy pro buňňáka bělobradého (*Procellaria aequinoctialis*), Cd3 a Cd5 pro buňňáka šedého (*Calonectris diomedea*), Pc B109 pro buňňáka světlonohého (*Puffinus carneipes*), Bb25 pro buňňáka Bulwerova (*Bulweria bulwerii*), Patbel2, Patbel3, Pacbel_00386, Pacbel_08988 a Pacbel_10033 pro buňňáka útlozobého (*Pachyptila belcheri*).

Techow *et al.* (2004) navrhli celkem 7 mikrosatelitů pro buňňáka bělobradého. Ve své diplomové práci jsem charakterizovala celkem 3 polymorfní mikrosatelity při testování metodou *cross-species* PCR amplifikace u pelikána afrického. Prvním z nich byl lokus Paequ2, pro který jsem použila T_A 55 °C a detekovala 4 alely. Autoři tento lokus testovali na 94 jedincích buňňáka bělobradého při T_A 54 °C a našli rovněž 4 alely. Dále jsem jako polymorfní označila lokus Paequ3, pro který jsem našla 3 alely při T_A 56 °C. Autoři tento lokus testovali na 93 jedincích zdrojového druhu a našli 9 alel, použitá T_A byla 55 °C. Posledním nalezeným polymorfním lokusem byl lokus Paequ8, u kterého jsem detekovala 3 alely při T_A 51 °C. Autoři použili pro tento lokus T_A 58 °C a testovali ho na 77 jedincích zdrojového druhu, našli u něj rovněž 3 alely.

Bried *et al.* (2008) popsali celkem 11 lokusů u buňňáka šedého. Testování prováděli na 45 jedincích zdrojového druhu a použili ve všech případech stejnou teplotu annealingu T_A 58 °C. Ve své diplomové práci jsem charakterizovala celkem 2 polymorfní lokusy z 11. Jednalo se o lokus Cd3, který měl při použité T_A 57 °C 2 alely. Autoři pro tento lokus našli 5 alel. Druhým polymorfním lokusem byl mikrosatelit Cd5, u kterého jsem použila T_A 50 °C a našla 2 alely. Autoři pro tento lokus našli celkem 6 alel.

Hardesty *et al.* (2013) našli 11 mikrosatelitů u buňňáka světlonohého. Tyto lokusy testovali na celkem 84 jedincích. V mé diplomové práci jsem genotypovala pouze jeden polymorfní lokus - Pc B109, u kterého jsem detekovala 2 alely při T_A 60 °C. Autoři tento lokus testovali při T_A 57 °C a našli 5 alel.

Andris *et al.* (2010) navrhli celkem 11 mikrosatelitních lokusů pro buňňáka Bulwerova. Při genotypování na 12 nepříbuzných jedincích pelikána afrického metodou *cross-species* PCR amplifikace jsem potvrdila jeden polymorfní lokus - Bb25. Pro tento

lokus jsem použila T_A 64 °C a detekovala 3 alely. Autoři u 91 jedinců našli celkem 6 alel na lokus při 58 °C.

Quilfeldt *et al.* (2012) charakterizovali 7 mikrosatelitů u buřňáka útlozobého. Tyto mikrosatelity autoři testovali na 68 jedincích. Z těchto sedmi mikrosatelitů jsem ve své diplomové práci genotypovala 2 z nich. Jednalo se o lokus Patbel2, pro který jsem našla 2 alely při T_A 52 °C a Patbel3, který měl 4 alely a použitá T_A byla 51 °C. Autoři pro lokus Patbel2 našli celkem 16 alel a pro lokus Patbel3 uvádějí 10 alel. Hodnoty T_A autoři neuvádějí.

Moodley *et al.* (2015) popsali celkem 25 mikrosatelitů u buřňáka útlozobého. Tyto lokusy autoři testovali na 77 jedincích zdrojového druhu a použili stejnou T_A 56 °C. Ve své práci jsem charakterizovala celkem 3 polymorfní mikrosatelity, jednalo se o Pacbel_00386, Pacbel_08988 a Pacbel_10033. Porovnání nalezených alel a použitých teplot annealingu je uvedeno v tab. č. 10.

Tabulka č. 10: Přehled nalezených polymorfních mikrosatelitů u 12 nepříbuzných jedinců pelikána afrického (tato práce) a 77 jedinců buřňáka útlozobého (Moodley *et al.*, 2015). V tabulce je uveden název lokusu, použitá teplota annealingu (T_A) a počet nalezených alel (A).

Lokus	Pelikán africký		Buřňák útlozobý	
	T_A [°C]	A	T_A [°C]	A
Pacbel_00386	58	2	56	11
Pacbel_08988	51	2		17
Pacbel_10033	47	4		19

Pro zástupce řádu tučňáci bylo otestováno celkem 113 mikrosatelitů. Tyto mikrosatelity byly testovány na 6 nepříbuzných jedincích pelikána afrického v bakalářské práci Adámková (2019), kde je popsáno celkem 8 polymorfních lokusů ze 113, které jsem já charakterizovala v rámci své diplomové práce na 12 nepříbuzných jedincích pelikána afrického. Jednalo se o lokus Ech008, který byl původně navržen pro tučňáka žltorohého (*Eudyptes chrysolophus*), lokusy Emm5, Emm6 a Emm8 původně navržené pro tučňáka nejmenšího (*Eudyptula minor*), lokus Em8, který rovněž pocházel od tučňáka nejmenšího, dále lokus Man13 navržený pro tučňáka žlutookého (*Megadyptes antipodes*), lokus Sh1Ca9 od tučňáka Humboldtova (*Spheniscus humboldti*) a lokus M1-11, který byl

původně navržen pro tučňáka magellanského (*S. magellanicus*). Pro tyto mikrosatelity jsem metodou *cross-species* PCR amplifikace našla 2–5 alel na lokus.

Ahmed *et al.* (2009) našli celkem 25 mikrosatelitů pro tučňáka žlutorohého. Tyto lokusy autoři testovali na 28 jedincích. Já jsem ve své práci genotypovala jeden polymorfní lokus Ech008, který měl 2 alely při použité T_A 59 °C. Autoři pro tento lokus našli 4 alely, teplotu annealingu však neuvádějí.

Bilig *et al.* (2007) popsali 8 mikrosatelitních lokusů pro tučňáka nejmenšího. Tyto mikrosatelity testovali na jedincích pocházejících ze dvou populací a sice z Filipova a Troubridgeova ostrova. Při testování na 12 nepříbuzných jedincích pelikána afrického jsem charakterizovala 3 polymorfní mikrosatelity (Emm5, Emm6 a Emm8). Porovnání použitých teplot annealingu a detekovaných alel je uvedeno v tab. č. 11.

Tabulka č. 11: Přehled nalezených polymorfních mikrosatelitů u 12 nepříbuzných jedinců pelikána afrického (tato práce) a jedinců tučňáka nejmenšího (Bilig *et al.*, 2007). V tabulce je uveden název lokusu, použitá teplota annealingu (T_A), počet nalezených alel (A) a v případě tučňáka nejmenšího i počet jedinců z daných populací (n).

Lokus	Pelikán africký		Tučňák nejmenší				
			Populace Filipova ostrova		Populace Troubridgeova ostrova		
	T_A [°C]	A	T_A [°C]	A	n	A	n
Emm5	47	3	58	11	28	3	28
Emm6	55	2	56	3	21	8	15
Emm8	56	2	56	3	26	3	5

Grosser *et Waters* (2015) našli 20 mikrosatelitů pro tučňáka nejmenšího. V mé diplomové práci jsem genotypovala jeden polymorfní lokus - Em8, u kterého jsem detekovala 5 alel při T_A 65 °C. Autoři pro tento lokus uvádějí 10 alel a T_A 60 °C.

Boessenkol *et al.* (2008) popsali 12 mikrosatelitů u tučňáka žlutookého. Autoři tyto lokusy testovali na 43 jedincích. Při testování na 12 nepříbuzných jedincích pelikána afrického jsem genotypovala jeden polymorfní mikrosatelit - Man13. U tohoto lokusu jsem detekovala 3 alely a použila T_A 55 °C. Autoři u tohoto lokusu našli 2 alely a použili T_A 48 °C.

Schlosser *et al.* (2003) charakterizovali celkem 7 mikrosatelitů u tučňáka Humboldtova. Tyto lokusy testovali na 24 jedincích. Z těchto 7 mikrosatelitů jsem ve své diplomové práci genotypovala jeden polymorfní, jednalo se o lokus Sh1Ca9. Při *cross-species* PCR amplifikaci jsem použila T_A 48 °C a našla 2 alely. Autoři tento lokus testovali při T_A 56 °C a detekovali 5 alel.

Akst *et al.* (2002) našli 6 mikrosatelitů pro tučňáka magellanského a tučňáka galapážského. Lokus M1-11, který původně pocházel od tučňáka magellanského autoři však označili jako monomorfní při použité T_A 56 °C. Já jsem však tento mikrosatelit ve své práci označila jako polymorfní, jelikož jsem u něj při T_A 46 °C detekovala 2 alely.

Ve své bakalářské práci Adámková (2019) dále testovala 60 mikrosatelitních lokusů, které byly navrženy pro univerzální ptačí mikrosatelity, na 6 nepříbuzných jedincích pelikána afrického. Celkem našla 4 polymorfní lokusy, které jsem já dále analyzovala v mé diplomové práci na 12 nepříbuzných jedincích pelikána afrického. Jednalo se o lokusy CAM-07 a CAM-24 patřící mezi EST ptačí mikrosatelity a TG04-041 a TG11-011, které patří mezi konzervované ptačí mikrosatelity.

Dawson *et al.* (2010) charakterizovali celkem 35 mikrosatelitních lokusů pro konzervované ptačí mikrosatelity. Pro tyto lokusy navrhli celkem 36 párů primerů. Ve své diplomové práci jsem genotypovala 2 polymorfní lokusy - TG04-41 a TG11-011. Pro lokus TG04-041 jsem našla 2 alely a použila T_A 64 °C. Autoři tento lokus testovali na 4 jedincích zebřičky pestré a našli celkem 2 alely při T_A 58 °C. U lokusu TG11-011 jsem detekovala 3 alely při T_A 60 °C. Autoři lokus TG11-011 testovali také na 4 jedincích zebřičky pestré a uvádějí T_A 52 °C a 2 alely.

Dawson *et al.* (2013) našli celkem 24 párů primerů pro EST ptačí mikrosatelity. Tyto primery použili k amplifikaci u zebřičky pestré (*Taeniopygia guttata*) a kura bankivského (*Gallus gallus*). Ve své diplomové práci jsem genotypovala celkem 2 polymorfní mikrosatelity, CAM-07 a CAM-24. Přehled použitých T_A a nalezených alel je uveden v tab. č. 12.

Tabulka č. 12: Přehled nalezených polymorfních mikrosatelitů u 12 nepříbuzných jedinců pelikána afrického (tato práce) a jedinců zebřičky pestré a kura bankivského (Dawson *et al.*, 2013). V tabulce je uveden název lokusu, použitá teplota annelingu (T_A), počet nalezených alel (A) a počet jedinců daných druhů (n).

Lokus	Pelikán africký		Zebřička pestrá			Kur bankivský		
	T_A [°C]	A	T_A [°C]	A	n	T_A [°C]	A	n
CAM-07	57	2	56	6	12	56	M*	3
CAM-24	61	3	56	6	12	56	M*	4

*monomorfní

Laboratoř populační genetiky KBB Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého v Olomouci se zabývá převážně testováním mikrosatelitů metodou *cross-species* PCR amplifikace. Testování je zaměřeno na jednotlivé druhy z kladu Aequorlornithes (Prum *et al.*, 2015). Svě výsledky jsem srovnala s dalšími bakalářskými a diplomovými pracemi studentek, které rovněž testovaly mikrosatelity původně pocházející od zástupců řádu trubkonosí nebo tučňáci a univerzální ptačí mikrosatelity. Tyto mikrosatelity testovaly na dalších druzích ptáků z kladu Aequorlornithes.

Jednalo se o druhy: potápka roháč (*Podiceps cristatus*), u kterého byly dané mikrosatelity testovány v bakalářských pracích Janušová (2015) a Filipová (2016) a genotypovány v diplomové práci Janušová (2017), dále nesyt indomalajský (*Mycterie leucocephala*), který byl testovaným druhem v bakalářské práci Pechová (2014) a diplomové práci Nedvědová (2015). Také byly zde v laboratoři populační genetiky testovány 2 druhy plameňáků, plameňák karibský (*Phoenicopterus ruber*), u kterého byly dané mikrosatelity testovány v bakalářských pracích Strejčková (2016) a Zlochová (2017) a charakterizovány v diplomových pracích Strejčková (2018) a Šuláková (2019), a plameňák růžový (*Phoenicopterus roseus*), který byl testovaným druhem v bakalářských pracích Kůrová (2017) a Klaclová (2018) a charakterizován v diplomové práci Zlochová (2019). Otestovány byly také tři další druhy pelikánů, jednalo se o pelikána kadeřavého (*Pelecanus crispus*), u kterého mikrosatelity, které byly izolovány od trubkonosých, testovala v bakalářské práci Verešová (2018). Dále pelikán bílý (*Pelecanus onocrotalus*), který byl testovaným druhem v bakalářských pracích Hudzieczková (2019) a Kremlová (2019). Posledním druhem byl pelikán skvrnozobý,

u kterého byly otestovány mikrosatelity původně navržené pro zástupce řádu tučňáci a univerzální ptačí mikrosatelity v bakalářské práci Šuláková (2017).

Přehled nalezených polymorfních mikrosatelitů napříč vybranými druhy vodních ptáků z kladu Aequorlitorornithes je uveden v tab. č. 13 a tab. č. 14.

Tabulka č. 13: Seznam nalezených polymorfních mikrosatelitů u pelikána afrického, původně navržených pro zástupce řádu trubkonosí. Výsledky jsou porovnány s dalšími 6 druhy z kladu Aequorlitorornithes, u kterých byly tyto mikrosatelity rovněž testovány. V závorce u testovaného druhu je uveden počet testovaných jedinců, číslem je vyjádřen počet alel a písmenem M jsou označeny monomorfní lokusy.

Lokus	Testovaný druh						
	Pelikán africký (12)	Potápka roháč (13)	Nesyt indomalajský (6)	Plameňák karibský (30)	Plameňák růžový (22)	Pelikán kadeřavý (6)	Pelikán bílý (6)
De17	2	M	M	M	M	M	M
STAL18	2	M	2	M	M	M	M
LAAL7	2	M	M	6	4	2	M
Ole21	2	M	M	M	4	M	M
Ole22	2	M	M	M	M	M	M
Ole26	2	M	3	M	M	M	2
Omn2	2	M	2	M	M	M	M
Omn8	4	9	4	7	8	M	4
Omn23	2	M	M	M	M	M	M
Paequ2	4	M	M	M	M	M	2
Paequ3	3	M	2	3	3	2	3
Paequ8	3	M	4	3	M	M	2
Cd3	2	M	M	M	M	M	3
Cd5	2	M	M	2	2	M	2
Pc B109	2	12	M	4	3	M	3
Bb25	3	M	M	3	4	M	M
Patbel2	2	6	5	M	M	M	4
Patbel3	4	M	M	M	M	M	6
Pacbel_00386	2	M	M	5	3	M	M
Pacbel_08988	2	M	M	3	3	M	M
Pacbel_10033	4	M	M	2	2	M	M

Tabulka č. 14: Seznam nalezených polymorfních mikrosatelitů u pelikána afrického, původně navržených pro zástupce řádu tučňáci a pro univerzální ptačí mikrosatelity. Výsledky jsou porovnány s dalšími 6 druhy z kladu Aequorlitorornithes, u kterých byly tyto mikrosatelity rovněž testovány. V závorce u testovaného druhu je uveden počet testovaných jedinců, číslem je vyjádřen počet alel a písmenem M jsou označeny monomorfní lokusy.

Lokus	Testovaný druh						
	Pelikán africký (12)	Potápka roháč (13)	Nesyt indomalajský (6)	Plameňák karibský (30)	Plameňák růžový (6)	Pelikán bílý (6)	Pelikán skvrnozobý (6)
Ech008	2	M	M	M	M	2	3
Emm5	3	3	M	3	4	2	2
Emm6	2	M	M	M	M	2	2
Emm8	2	M	M	M	M	M	2
Em8	5	M	netestován	M	4	5	3
Man13	3	M	2	M	M	M	4
Sh1Ca9	2	M	M	M	M	M	M
M1-11	2	M	M	M	M	2	M
CAM-07	2	M	M	M	3	M	M
CAM-24	3	5	M	4	6	M	2
TG04-041	2	M	M	M	2	M	M
TG11-011	3	2	M	M	M	M	3

Ani jeden z uvedených mikrosatelitních lokusů nebyl polymorfní u všech testovaných druhů. Jako nejúspěšnější je možné označit lokusy Omn8, Paequ3 a Emm5, které byly polymorfní u 6 ze 7 testovaných druhů. Dále byly nalezeny 2 lokusy, které byly polymorfní u 5 druhů, 5 lokusů polymorfních u 4 druhů, 8 lokusů polymorfních u 3 druhů a 11 lokusů, které byly polymorfní u 2 ze 7 testovaných druhů. Dále jsem našla 4 mikrosatelitní lokusy, které byly polymorfní pouze u pelikána afrického, jednalo se o mikrosatelity De17, Ole22, Omn23 a Sh1Ca9.

Doposud bylo nalezeno celkem 83 polymorfních vzájemně nezávislých mikrosatelitů pro pelikána afrického z celkem 771 otestovaných. Tyto mikrosatelity byly testovány v bakalářských pracích (Dvořáková, 2010; Chmelařová, 2010; Kopečná, 2018 a Adámková, 2019) a diplomových pracích (Ranochová, 2008 a Mikulová, 2010). Všechny polymorfní lokusy pro pelikána afrického byly nalezeny metodou *cross-species* PCR amplifikace. Pro tento druh pelikána nebyl prozatím izolován žádný lokus *de novo*.

Všechny nalezené polymorfní lokusy byly charakterizovány na 12 nepříbuzných jedincích pelikána afrického a byla u nich provedena analýza, pomocí které byla ověřena vzájemná nezávislost všech lokusů (Chmelařová, 2012; tato práce).

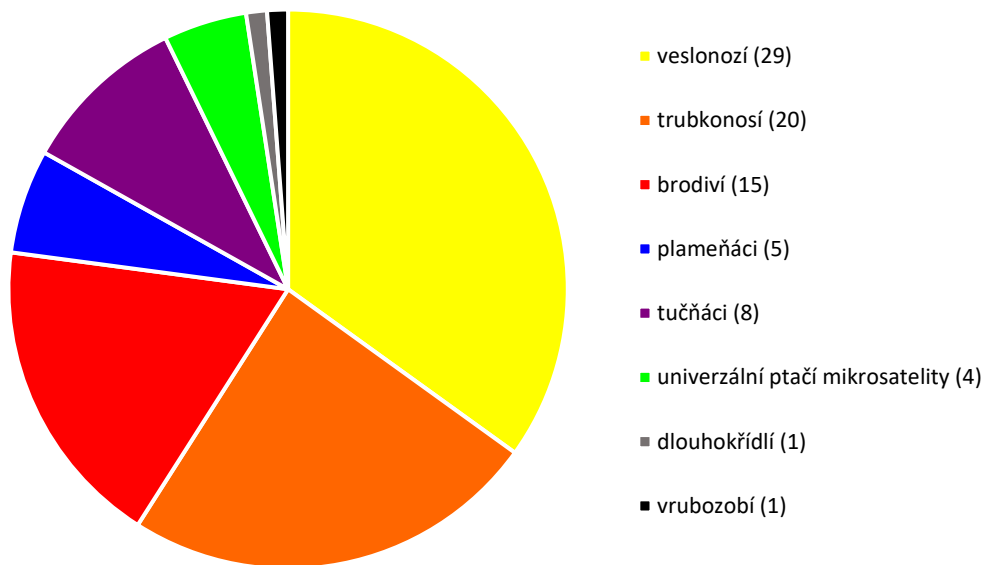
U všech 83 nalezených polymorfních vzájemně nezávislých mikrosatelitů byla provedena analýza v programu Cervus 3.0.7 (Kalinowski *et al.*, 2007). Na základě analýzy bylo zjištěno, že průměrný počet alel na lokus činí 3,169 a hodnota očekávané heterozygotnosti činí 0,4889. V případě výpočtu odchylky od Hardy-Weinbergovy rovnováhy bylo celkem 54 lokusů v souladu s touto rovnováhou a u zbylých 29 mikrosatelitů software nedokázal provést výpočet odchylky. Do této analýzy nebyl zahrnut lokus Ole26, u kterého byla v programu Genepop 4.7.5 (Rousset, 2008) zjištěna vzájemná vazba s lokusy BFAL4 (již dříve vyřazen) a Sn2A-36. Pro další analýzu byl jako finální lokus vybrán právě Sn2A-36, který byl nejlépe hodnotitelný a ve své práci ho charakterizovala Chmelařová (2012). Dále byla u všech 83 lokusů stanovena pravděpodobnost chybného provedení studie paternity za předpokladu, že je přiřazováno mládě, u kterého není znám ani jeden rodič, tato pravděpodobnost činí $1,38 \cdot 10^{-6}$. Pokud je známý pouze jeden rodič tak pravděpodobnost chybného přiřazení druhého rodiče bude $6,184 \cdot 10^{-12}$. Pravděpodobnost, že by byl chybně přiřazen rodičovský pár k mláděti je rovna $1,526 \cdot 10^{-19}$. Pravděpodobnost, že by se vyskytli dva jedinci se stejnou alelovou kombinací pro všech 83 lokusů je $5,168 \cdot 10^{-42}$ a pravděpodobnosti výskytu dvou mláďat, která by měla u všech 83 lokusů identické alely je $1,652 \cdot 10^{-19}$.

Přítomnost nulových alel je předpokládána u 33 lokusů a u 2 lokusů nebyla tato hodnota pravděpodobnosti programem vypočítána. U jednoho mikrosatelitu je odhadovaná frekvence výskytu nulových alel vyšší než 30 %, u 7 lokusů vyšší než 20 %, u 11 lokusů vyšší než 10 % a u 5 lokusů vyšší než 5 %. U zbylých 9 mikrosatelitů je odhadovaná frekvence výskytu nulových alel menší než 5 %.

Ze všech 83 nalezených polymorfních vzájemně nezávislých mikrosatelitů jich bylo 78 odvozeno od zástupců kladu Aequorlitorניתhes. Tento klad zahrnuje všechny vodní ptáky kromě vrubozobých, od kterých byl u pelikána afrického polymorfni jeden lokus. Zbylé 4 polymorfni lokusy nalezené pro pelikána afrického patřily mezi univerzální ptačí mikrosatelity. Všechny tyto lokusy jsou vzájemně nezávislé na základě charakteristiky v programech Cervus 3.0.7 (Kalinowski *et al.*, 2007) a Genepop 4.7.5

(Rousset, 2008). Přehled všech doposud nalezených *cross-species* mikrosatelitů pro pelikána afrického vzhledem k jejich původu je znázorněn v grafu č. 2.

Graf č. 2: Rozdělení 83 polymorfních mikrosatelitních lokusu, nalezených pro pelikána afrického metodou *cross-species* PCR amplifikace. Lokusy jsou rozděleny podle řádů v tradičním pojetí systému ptáků (Gaisler *et* Zima, 2007). U každého řádu je v závorce uveden počet nalezených polymorfních lokusů. V grafu je také znázorněn počet nalezených polymorfních mikrosatelitů, které patří mezi univerzální ptačí mikrosatelity, počet nalezených lokusů je rovněž uveden v závorce.



Prozatím bylo nalezeno celkem 83 polymorfních vzájemně nezávislých *cross-species* mikrosatelitů pro pelikána afrického. Z těchto lokusů jich bylo vybráno 5 pro paternitní studie (Chmelařová, 2012). Jednalo se o lokus P3F7, který původně pocházel od faetona žlutozobého (*Phaethon lepturus*), PeEr02 a PeEr04 od pelikána severoamerického (*Pelecanus erythrorhynchos*), PEL304 od pelikána bílého (*P. onocrotalus*) a PrD7 od plameňáka růžového (*Phoenicopterus roseus*). V mé diplomové práci jsem nenalezla žádné vhodné lokusy pro paternitní studie, z důvodu nízkého počtu alel. Je však možné mnou nalezené mikrosatelity využít při jiných populačních studiích u pelikána afrického. Pro získání dalších polymorfních lokusů by bylo vhodné otestovat nově popsané primery od řádů z kladu Aequorlitorornithes, např. i z řádů, které doposud nebyly otestovány, což jsou slunatci a dlouhokřídli.

7. Závěr

V této diplomové práci jsem metodou *cross-species* PCR amplifikace charakterizovala celkem 36 mikrosatelitních lokusů na 12 nepříbuzných jedincích pelikána afrického (*Pelecanus rufescens*). Tyto mikrosatelity označené jako polymorfní u 6 nepříbuzných jedinců pelikána afrického v bakalářských pracích Kopečná (2018) a Adámková (2019) původně pocházely od zástupců řádu trubkonosí nebo tučňáci, anebo se jednalo o univerzální ptačí mikrosatelity. Celkem 24 mikrosatelitů bylo původně izolováno od zástupců řádu trubkonosí a sice 5 z nich původně pocházelo od zástupců čeledi albatrosovití, 6 z nich od čeledi buňáčkovití a 13 od čeledi buňákovití. Dalších 8 mikrosatelitů bylo původně izolováno od zástupců řádu tučňáci. U 4 lokusů se ve dvou případech jednalo o EST ptačí mikrosatelity a u zbylých dvou o konzervované ptačí mikrosatelity.

Testováním 36 mikrosatelitů jsem u 34 z nich potvrdila polymorfismus. Zbylé dva mikrosatelity se při testování na větším počtu jedinců ukázaly jako monomorfní. Jednalo se o lokus Dc9 od albatrosa šedohlavého a Pc A107 od buňáka světlonohého. Při analýze v programu Genepop 4.7.5 byla zjištěna vazba mezi lokusy BFAL4 od albatrosa černonohého a Ole26 od buňáčka dlouhokřídlého. Z těchto dvou byl ponechán pro další analýzu lokus Ole26. Dále se také ukázalo, že jsou tyto dva lokusy ve vzájemné vazbě i s lokusem Sn2A-36, který byl genotypován v diplomové práci Chmelařová (2012). Pro další analýzu byl finálně ponechán lokus Sn2A-36, který byl nejlépe hodnotitelný. U všech 33 vzájemně nezávislých polymorfních lokusů jsem detekovala 2–5 alel. Programem Cervus 3.0.7 byla u těchto mikrosatelitů zjištěna očekávaná hodnota heterozygtnosti, která činila 0,424 a průměrný počet alel na lokus byl 2,545.

Celkem bylo i s přispěním této diplomové práce pro pelikána afrického nalezeno a charakterizováno 83 vzájemně nezávislých polymorfních mikrosatelitů na 12 nepříbuzných jedincích pelikána afrického. Na základě analýzy programem Cervus 3.0.7 mají tyto lokusy v průměru 3,169 alely na lokus a očekávaná hodnota heterozygotnosti činí 0,4889.

8. Použitá literatura

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

Ahmed, S., Hart, T., Dawson, D.A., Horsburgh, G.J., Trathan, P.N., Rogers, A.D. (2009): Isolation and characterization of macaroni penguin (*Eudyptes chrysolophus*) microsatellite loci and their utility in other penguin species (Spheniscidae, AVES). *Molecular Ecology Resources*, 9, 1530–1535.

Akst, E., Boersma, P., Fleischer, R. (2002): A comparison of genetic diversity between the Galapagos Penguin and the Magellanic Penguin. *Conservation Genetics*, 3, 375–383.

Altschul, S.F., Madden, T.L., Schäffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D.J. (1997): Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acid Research*, 25, 3389–3402.

Andris, M., Dubois, M.P., Jarne, P., Bonadonna, F., Bried, J. (2010): Eleven polymorphic microsatellite markers in Bulwer's petrel, *Bulweria bulwerii*, and cross-species amplification in three other Procellariiformes. *Molecular Ecology Resources*. Manuskript. Publikováno online na stránce: <https://www.yumpu.com/en/document/view/42427025/eleven-polymorphic-microsatellite-markers-in-bulwers-petrel>, navštíveno dne 20. 2. 2020.

Beckmann, J.S., Weber, J.L. (1992): Survey of human and rat microsatellites. *Genomics*, 12, 627–631.

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

Billing, T.M., Guay, P.J., Peucker, A.J., Mulder, R.A. (2007): Isolation and characterization of polymorphic microsatellite loci for the study of paternity and population structure in the little penguin *Eudyptula minor*. *Molecular Ecology Notes*, 7, 425–427.

- Boessenkool, S., King, T.M., Seddon, P.J., Waters, J.M. (2008): Isolation and characterization of microsatellite loci from the yellow-eyed penguin (*Megadyptes antipodes*). *Molecular Ecology Resources*, 8, 1043–1045.
- Bried, J., Andris, M., Dubois, M.P., Jarne, P. (2012): Eighteen polymorphic microsatellite markers in Monteiro's storm-petrel, *Oceanodroma monteiroi*, and cross-species amplification in three other Procellariiformes. *Molecular Ecology Resources*, 9, 913–915.
- Bried, J., Dubois, M.P., Jouventin, P., Santos, R.S. (2008): Eleven polymorphic microsatellite markers in Cory's shearwater, *Calonectris diomedea*, and cross-species amplification on threatened Procellariiformes. *Molecular Ecology Resources*, 8, 602–604.
- Brown, L.H., Urban, E.K., Newman, K. (1982): *The birds of Africa, Volume I*, Academic Press Limited, London.
- Burg, T.M. (1999): Isolation and characterization of microsatellites in albatrosses. *Molecular Ecology*, 8, 338–341.
- Buschiazzo, E., Gemmill, N.J. (2006): The rise, fall and renaissance of microsatellites in eukaryotic genomes. *BioEssays*, 28, 1040–1050.
- Dakin, E.E., Avise, J.C. (2004): Microsatellite null alleles in parentage analysis. *Heredity*, 93, 504–509.
- Dawson, D.A., Ball, A.D., Spurgin, L.G., Martín-Gálvez, D., Stewart, I.R., Horsburgh, G.J., Potter, J., Molina-Morales, M., Bicknell, A.W.J., Preston, S.A.J., Ekblom, R., Slate, J., Burke, T. (2013): High-utility conserved avian microsatellite markers enable parentage and population studies across a wide range of species. *BMC Genomics*, 14, 176.
- Dawson, D.A., Horsburgh, G.J., Küpper, C., Stewart, I.R.K., Ball, A.D., Durrant, K.L., Hansson, B., Bacon, I., Bird, S., Klein, 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.

- de Ponte Machado, M., Feldheim, K.A., Sellas, A.B., Bowie, R.C.K. (2009): Development and characterization of microsatellite loci from the Great White Pelican (*Pelecanus onocrotalus*) and widespread application to other members of the Pelecanidae. *Conservation Genetics*, 10, 1033–1036.
- del Hoyo, J., Elliott, A., Sargatal, J., Imboden, C. (1992): *Handbook of the Birds of the World. Volume 1. Ostrich to Ducks.* Lynx Editions, Barcelona.
- Dvořáková, B. (2010): Analýza polymorfních *cross-species* mikrosatelitů pro determinaci paternity u pelikána afrického (*Pelecanus rufescens*). Bakalářská práce. Depon in: Knihovna biologických oborů PřF UPOL Olomouc.
- Filipová, K. (2016): *Cross-species* amplifikace mikrosatelitů z řádu tučňáci a konzervovaných ptačích mikrosatelitů u potápky roháče (*Podiceps cristatus*). Bakalářská práce. Depon in: Knihovna biologických oborů PřF UPOL, Olomouc.
- Gaisler, J., Zima, J. (2007): *Zoologie obratlovců.* Academia - nakladatelství Akademie věd České republiky, Praha.
- Gaisler, J., Zima, J. (2018): *Zoologie obratlovců. 3., přepracované vydání.* Academia - nakladatelství Akademie věd České republiky, Praha.
- Goldstein, D., Schlotterer, C. (1999): *Microsatellites, evolution and applications.* Oxford University Press, Oxford.
- Grosser, S., Waters, J.M. (2015): Development and characterisation of 20 novel microsatellite markers for the little blue penguin (*Eudyptula minor*) using next-generation sequencing. *Conservation Genetics Resources*, 7, 143–145.
- Guichoux, E., Lagache, L., Wagner, S., Chaumeil, P., Léger, P., Lepais, O., Lepoittevin, C., Malausa, T., Revardel, E., Salin, F., Petit, R.J. (2011): Current trends in microsatellite genotyping. *Molecular Ecology Resources*, 11, 591–611.
- Hardesty, B.D., Metcalfe, S.S., Wilcox, C. (2013): Genetic variability and population diversity as revealed by microsatellites for Flesh-footed shearwaters (*Puffinus carneipes*) in the southern hemisphere. *Conservation Genetics Resources*, 5, 27–29.
- Hedges, S.B., Sibley, C.G. (1994): Molecules vs. morphology in avian evolution: the case

of the "pelecaniform" birds. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 91, 9861–9865.

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

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.

Hosseinzadeh-Colagar, A., Haghghatnia, M.J., Amiri, Z., Mohadjerani, M., Tafrihi, M. (2016): Microsatellite (SSR) amplification by PCR usually led to polymorphic bands: Evidence which shows replication slippage occurs in extend or nascent DNA strands. Molecular Biology Research Communications, 5, 167–174.

Hudzieczková, A. (2019): *Cross-species* amplifikace mikrosatelitů z řádu trubkonosí u pelikána bílého (*Pelecanus onocrotalus*). Bakalářská práce. Depon in: Knihovna biologických oborů PřF UPOL, Olomouc.

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

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

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

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

Jaramillo, A. (2007): Proposal (#271) to South American Classification Committee: Separate *Pelecanus thagus* from *P. occidentalis*. SACC, Louisiana Museum of Natural History, Baton Rouge, Louisiana, USA. Publikováno online na stránce: <http://www.museum.lsu.edu/~Remsen/SACCprop271.htm>, navštíveno dne 9. 3. 2020.

Jarne, P., Lagoda, P.J. (1996): Microsatellites, from Molecules to Populations and Back. *Trends in Ecology and Evolution*, 11, 424–429.

Jarvis, E.D., Mirarab, S., Aberer, A.J., Li, B., Houde, P., Li, C., Ho, S.Y.W., Faircloth, B.C., Nabholz, B., Howard, J.T., Suh, A., Weber, C.C., da Fonseca, R.R., Li, J., Zhang, F., Li, H., Zhou, L., Narula, N., Liu, L., Ganapathy, G., Boussau, B., Bayzid, S., Zavidovych, V., Subramanian, S., Gabaldón, T., Capella-Gutiérrez, S., Huerta-Cepas, J., Rekepalli, B., Munch, K., Schierup, M., Lindow, B., Warren, W.C., Ray, D., Green, R.E., Bruford, M.W., Zhan, X., Dixon, A., Li, S., Li, N., Huang, Y., Derryberry, E.P., Bertelsen, M.F., Sheldon, F.H., Brumfield, R.T., Mello, C.V., Lovell, P.V., Wirthlin, M., Schneider, M.P.C., Prosdocimi, F., Samaniego, J.A., Velazquez, A.M.V., Alfaro- Núñez, A., Campos, P.F., Petersen, B., Sicheritz-Ponten, T., Pas, A., Bailey, T., Scofield, P., Bunce, M., Lambert, D.M., Zhou, Q., Perelman, P., Driskell, A.C., Shapiro, B., Xiong, Z., Zeng, Y., Liu, S., Li, Z., Liu, B., Wu, K., Xiao, J., Yinqi, X., Zheng, Q., Zhang, Y., Yang, H., Wang, J., Smeds, L., Rheindt, F.E., Braun, M., Fjeldsa, J., Orlando, L., Barker, F.K., Jønsson, K.A., Johnson, W., Koepfli, K.P., O'Brien, S., Haussler, D., Ryder, O.A., Rahbek, C., Willerslev, E., Graves, G.R., Glenn, T.C., McCormack, J., Burt, D., Ellegren, H., Alström, P., Edwards, S.V., Stamatakis, A., Mindell, D.P., Cracraft, J., Braun, E.L., Warnow, T., Jun, W., Gilbert, M.T.P., Zhang, G. (2014): Whole-genome analyses resolve early branches in the tree of life of modern birds. *Science*, 346, 1320–1331.

Jeyasingham, W.S., Taylor, S.A., Zavalaga, C.B., Simeone, A., Friesen, V.L. (2013): Specialization to cold-water upwellings may facilitate gene flow in seabirds: new evidence from the Peruvian pelican *Pelecanus thagus* (Pelecaniformes: Pelecanidae). *Journal of Avian Biology*, 44, 297–304.

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.

- Kantartzi, S.K. (2013): *Microsatellites: methods and protocols*. Methods in molecular biology, v. 1006. Humana Press, Springer, New York.
- Kennedy, M., Taylor, S.A., Nádvorník, P., Spencer, H.G. (2012): The phylogenetic relationships of the extant pelicans inferred from DNA sequence data. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 66, 215–222.
- Kláclová, 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, Olomouc.
- Kocher, T.D., Thomas, W.K., Meyer, A., Edwards, S.V., Pääbo, S., Villablanca, F.X., Wilson, A.C. (1989): Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: amplification and sequencing with conserved primers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 86, 6196–6200.
- Kopečná, K. (2018): *Cross-species* amplifikace mikrosatelitů z řádu trubkonosí u pelikána afrického (*Pelecanus rufescens*). Bakalářská práce. Depon in: Knihovna biologických oborů PřF UPOL, Olomouc.
- Kremlová, H. (2019): *Cross-species* amplifikace mikrosatelitů z řádu tučňáci a konzervovaných ptačích mikrosatelitů u pelikána bílého (*Pelecanus onocrotalus*). Bakalářská práce. Depon in: Knihovna biologických oborů PřF UPOL, Olomouc.
- Kůrová, V. (2017): *Cross-species* amplifikace mikrosatelitů z řádu trubkonosí u plameňáka růžového (*Phoenicopterus roseus*). Bakalářská práce. Depon in: Knihovna biologických oborů PřF UPOL, Olomouc.
- Livezey, B.C., Zusi, R.L. (2007): Higher-order phylogeny of modern birds (Theropoda, Aves: Neornithes) based on comparative anatomy. II. Analysis and discussion. *Zoological Journal of the Linnean Society*, 149, 1–95.
- Mayr, G. (2005): Tertiary pterosaurs (Aves, Pterosauridae) and a novel hypothesis on the phylogenetic relationships of penguins (Spheniscidae). *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*, 10, 1–11.
- Mikulová, V. (2010): Mikrosatelitové lokusy pro determinaci paternity u vybraných

druhů pelikánů (*Pelecanus* spp.). Diplomová práce. Depon in: Knihovna biologických oborů PřF UPOL, Olomouc.

Moodley, Y., Masello, J.F., Cole, T.L., Calderon, L., Munimanda, G.K., Thali, M.R., Alderman, R., Cuthbert, R.J., Marin, M., Massaro, M., Navarro, J., Phillips, R.A., Ryan, P.G., Suazo, C.G., Cherel, Y., Weimerskirch, H., Quillfeldt, P. (2015): Evolutionary factors affecting the cross-species utility of newly developed microsatellite markers in seabirds. *Molecular Ecology Resources*, 15, 1046–1058.

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

Oliveira, E.J., Pádua, J.G., Zucchi, M.I., Vencovsky, R., Vieira, L.C. (2006): Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. *Genetics and Molecular Biology*, 29, 294–307.

Pechová, A. (2004): *Cross-species* amplifikace mikrosatelitů z řádu tučňáci a konzervovaných ptačích mikrosatelitů u nesyta indomalajského (*Mycteria leucocephala*). Bakalářská práce. Depon in: Knihovna biologických oborů PřF UPOL, Olomouc.

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.T., Palo, J.U., Merilä, J. (2005): Factors affecting avian cross-species microsatellite amplification. *Journal of Avian Biology*, 36, 348–360.

Primmer, C.R., Raudsepp, T., Chowdhary, B.P., Møller, A.P., Ellegren, H. (1997): Low frequency of microsatellites in the avian genome. *Genome Research*, 7, 471–482.

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

Quillfeldt, P., Masello, J.F., Segelbacher, G. (2012): Extra-pair paternity in seabirds: a review and case study of Thin-billed Prions *Pachyptila belcheri*. *Journal of Ornithology*, 153, 367–373.

Ranochová, A. (2008): Analýza mikrosatelitových lokusů pro determinaci paternity u vybraných druhů pelikánů. Diplomová práce. Depon in: Knihovna biologických oborů PřF UPOL, Olomouc.

Rousset, F. (2008): GENEPOP 007: a complete re-implementation of the GENEPOP software for Windows and Linux. *Molecular Ecology Resources*, 8, 103–106.

Reudink M.W., Kyle, C.J., Nocera, J.J., Oomen, R.A., Green, M.C., Somers, C.M. (2011): Panmixia on a continental scale in a widely distributed colonial waterbird. *Biological Journal of the Linnean Society*, 102, 583–592.

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

Sharma, P.C., Grover, A., Kahl, G. (2007): Mining microsatellites in eukaryotic genomes. *Trends in Biotechnology*, 25, 490–498.

Sibley, C.G., Ahlquist, J.E. Monroe, B.L. (1988): A Classification of the Living Birds of the World Based on DNA-DNA Hybridization Studies. *The Auk*, 105, 409–423.

Smith, N.D. (2010): Phylogenetic Analysis of Pelecaniformes (Aves) Based on Osteological Data: Implications for Waterbird Phylogeny and Fossil Calibration Studies. *PLoS ONE*, 5, e13354.

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

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, Olomouc.

Svensson, L., Mullarney, K., Zetterström, D. (2016): Ptáci Evropy, severní Afriky a blízkého východu. 2. české vydání, nakladatelství Ševčík, Plzeň.

Šťastný, K., Bejček, V., Hudec, K. (1998): Svět zvířat IV. Ptáci 1. Albatros, Praha.

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

Šuláková, M. (2019): Analýza a charakteristika vybraných polymorfních *cross-species* mikrosatelitů z řádu tučňáci a konzervovaných ptačích mikrosatelitů u plameňáka karibského (*Phoenicopterus ruber*). Diplomová práce. Depon in: Knihovna biologických oborů PřF UPOL, Olomouc.

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.

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

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

Winkler, D.W., Billerman, S.M., Lovette, I.J. (2015): Bird families of the world: an invitation to the spectacular diversity of birds. Lynx Editions, Barcelona.

Yuri, T., Kimball, R.T., Harshman, J., Bowie, R.C.K., Braun, M.J., Chojnowski, J.L., Han, K.L., Hackett, S.J., Huddleston, C.J., Moore, W.S., Reddy, S., Sheldon, F.H., Steadman, D.W., Witt, C.C., Braun, E.L. (2013): Parsimony and model-based analyses of indels in avian nuclear genes reveal congruent and incongruent Phylogenetic Signals. *Biology*, 2, 419–444.

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

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

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

9. Přílohy

Příloha č. 1: Charakteristika 33 nezávislých polymorfních *cross-species* u 12 nepříbuzných jedinců pelikána afrického. Analýza byla provedena programem Cervus 3.0.7. V tabulce je uveden název lokusu, počet alel (k), počet jedinců (N), pozorovaná heterozygotnost (HObs), očekávaná heterozygotnost (HExp), obsah polymorfní informace (PIC), pravděpodobnost chybného provedení studie paternity, pokud není známý ani jeden rodič (NE-1P), pokud je známý jeden z rodičů (NE-2P), pokud je přiřazován celý rodičovský pár (NE-PP), pravděpodobnost, že existují dva identičtí jedinci pro daný lokus (NE-I), pravděpodobnost, že existují dvě identická mláďata pro daný lokus (NE-SI), soulad s Hardy-Weinbergovou rovnováhou (HW; NS - v souladu, ND - nelze vyhodnotit, ** - signifikantní odchylka na hladině 1 %), pravděpodobná frekvence nulových alel (F(Null)).

Lokus	k	N	HObs	HExp	PIC	NE-1P	NE-2P	NE-PP	NE-I	NE-SI	HW	F (Null)
De17	2	12	0,333	0,391	0,305	0,930	0,848	0,761	0,461	0,678	ND	0,0588
STAL18	2	12	0,250	0,344	0,275	0,946	0,862	0,779	0,503	0,711	ND	0,1377
LAAL7	2	12	0,250	0,228	0,195	0,976	0,903	0,833	0,634	0,799	ND	-0,0620
Ole21	2	12	0,083	0,083	0,077	0,997	0,962	0,928	0,850	0,923	ND	-0,0122
Ole22	2	12	0,500	0,391	0,305	0,930	0,848	0,761	0,461	0,678	ND	-0,1423
Ole26	2	12	0,000	0,507	0,368	0,882	0,816	0,723	0,382	0,603	**	0,9993
Omn2	2	12	0,333	0,464	0,346	0,901	0,827	0,737	0,407	0,630	NS	0,1429
Omn8	4	12	0,500	0,627	0,524	0,812	0,677	0,523	0,237	0,509	NS	0,1062
Omn23	2	12	0,167	0,290	0,239	0,961	0,880	0,803	0,560	0,751	ND	0,2499
Paequ2	4	12	0,417	0,431	0,386	0,911	0,769	0,618	0,372	0,636	ND	0,0263
Paequ3	3	12	0,583	0,565	0,460	0,853	0,735	0,600	0,292	0,552	NS	-0,0318
Paequ8	3	12	0,333	0,627	0,533	0,820	0,674	0,523	0,227	0,506	NS	0,2866
Cd3	2	12	0,583	0,518	0,373	0,877	0,813	0,720	0,377	0,596	NS	-0,0804
Cd5	2	12	0,083	0,083	0,077	0,997	0,962	0,928	0,850	0,923	ND	-0,0122
Pc B109	2	12	0,333	0,464	0,346	0,901	0,827	0,737	0,407	0,630	NS	0,1429

Příloha 1: Pokračování.

Lokus	k	N	HObs	HExp	PIC	NE-1P	NE-2P	NE-PP	NE-I	NE-SI	HW	F (Null)
Bb25	3	12	0,333	0,409	0,341	0,923	0,814	0,699	0,420	0,659	ND	0,0720
Patbel2	2	12	0,667	0,507	0,368	0,882	0,816	0,723	0,382	0,603	NS	-0,1566
Patbel3	4	12	0,667	0,725	0,639	0,733	0,566	0,394	0,149	0,440	NS	0,0181
Pacbel_00386	2	12	0,667	0,464	0,346	0,901	0,827	0,737	0,407	0,630	NS	-0,1999
Pacbel_08988	2	12	0,083	0,083	0,077	0,997	0,962	0,928	0,850	0,923	ND	-0,0122
Pacbel_10033	4	12	0,917	0,699	0,606	0,761	0,604	0,441	0,173	0,458	NS	-0,1600
Ech008	2	12	0,500	0,464	0,346	0,901	0,827	0,737	0,407	0,630	NS	-0,0588
Emm5	3	12	0,500	0,409	0,341	0,923	0,814	0,699	0,420	0,659	ND	-0,1358
Emm6	2	12	0,250	0,489	0,359	0,890	0,821	0,729	0,392	0,614	NS	0,3043
Emm8	2	12	0,083	0,083	0,077	0,997	0,962	0,928	0,850	0,923	ND	-0,0122
Em8	5	12	0,333	0,493	0,446	0,878	0,719	0,544	0,305	0,590	NS	0,1973
Man13	3	12	0,250	0,366	0,322	0,939	0,819	0,695	0,450	0,687	ND	0,1544
Sh1Ca9	2	12	0,583	0,489	0,359	0,890	0,821	0,729	0,392	0,614	NS	-0,1089
M1-11	2	12	0,500	0,464	0,346	0,901	0,827	0,737	0,407	0,630	NS	-0,0588
CAM-07	2	12	0,167	0,290	0,239	0,961	0,880	0,803	0,560	0,751	ND	0,2499
CAM-24	3	12	0,417	0,366	0,322	0,939	0,819	0,695	0,450	0,687	ND	-0,1077
TG04-041	2	12	0,667	0,522	0,375	0,875	0,813	0,719	0,375	0,594	NS	-0,1429
TG11-011	3	12	0,667	0,663	0,561	0,798	0,654	0,505	0,207	0,484	NS	-0,0132

Number of individuals:	12
Number of loci:	33
Mean number of alleles per locus:	2,545
Mean proportion of loci typed:	1,0000
Mean expected heterozygosity:	0,4242
Mean polymorphic information content (PIC):	0,3417
Combined non-exclusion probability (first parent):	0,03101616
Combined non-exclusion probability (second parent):	0,00078154
Combined non-exclusion probability (parent pair):	0,00000638
Combined non-exclusion probability (identity):	1,346E-0013
Combined non-exclusion probability (sib identity):	0,00000055