

Univerzita Palackého v Olomouci

Diplomová práce

Olomouc 2021

Hana Kremlová

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



**Analýza a charakteristika vybraných polymorfních
mikrosatelitů z řádu tučňáci a konzervovaných ptačích
mikrosatelitů u pelikána bílého (*Pelecanus onocrotalus*)**

Bc. Hana Kremlová

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2021

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

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Akademický rok: 2019/2020

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: Hana KREMLOVÁ
Osobní číslo: R190061
Studijní program: N1501 Biologie
Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie
Téma práce: Analýza a charakteristika vybraných polymorfních mikrosatelitů z řádu tučňáci a konzervovaných ptačích mikrosatelitů u pelikána bílého (*Pelecanus onocrotalus*).
Zadávající katedra: Katedra buněčné biologie a genetiky

Zásady pro vypracování


1. Vypracování řešerše na téma diplomové práce.
2. Shromáždění dostupných literárních zdrojů.
3. Amplifikace a charakteristika vybraných mikrosatelitových lokusů na DNA 21 nepříbuzných jedinců pelikána bílého; jedná se o mikrosatelity označené jako polymorfni v bakalářské práci studentky.

Rozsah pracovní zprávy:
Rozsah grafických prací:
Forma zpracování diplomové práce: tištěná

Seznam doporučené literatury:

1. Prum, R.O. *et al.* (2015): A comprehensive phylogeny of birds (*Aves*) using targeted next-generation DNA sequencing. *Nature*, 526, 569-573.
2. Dawson, D.A. *et al.* (2013): High-utility conserved avian microsatellite markers enable parentage and population studies across a wide range of species. *BMC Genomics*, 14, 176.
3. Dawson, D.A. *et al.* (2010): New methods to identify conserved microsatellite loci and develop primer sets of high cross-species utility? as demonstrated for birds. *Molecular Ecology Resources*, 10, 475-494.
1. Ahmed, S. *et al.* (2009): Isolation and characterization of macaroni penguin (*Eudyptes chrysolophus*) microsatellite loci and their utility in other penguin species (Spheniscidae, AVES). *Molecular Ecology Resources*, 9, 1530-1535.
2. Vianna, J.A. *et al.* (2017): Comparative genome-wide polymorphic microsatellite markers in Antarctic penguins through next generation sequencing. *Genetics and Molecular Biology*, 840, 676-687.

Vedoucí diplomové práce: RNDr. Petr Nádvořník, Ph.D.
Katedra buněčné biologie a genetiky



Datum zadání diplomové práce: 12. října 2019
Termín odevzdání diplomové práce: 31. července 2021

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA
KATEDRA BUNĚČNÉ BIOLOGIE A GENETIKY
Šlechtitelů 27, 783 71 Olomouc – Holice
tel.: +420 585 631 111

L.S.

01-11-2019

doc. RNDr. Martin Kubala, Ph.D.
děkan

prof. RNDr. Zdeněk Dvořák, DrSc.
vedoucí katedry

Bibliografické údaje

Jméno a příjmení autora: Bc. Hana Kremlová

Název práce: Analýza a charakteristika vybraných polymorfních mikrosatelitů z řádu tučňáci a konzervovaných ptačích mikrosatelitů u pelikána bílého (*Pelecanus onocrotalus*)

Typ práce: Diplomová

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

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

Rok obhajoby práce: 2021

Souhrn:

Tato diplomová práce se věnuje analýze a charakteristice vybraných polymorfních mikrosatelitů nalezených prostřednictvím *cross-species* PCR amplifikace u pelikána bílého (*Pelecanus onocrotalus*).

Teoretická část této práce se zabývá převážně vztahy mezi jednotlivými čeleděmi v řádu Pelecaniformes, které se v průběhu několika let mnohokrát měnily. Další kapitoly jsou zaměřené na mikrosatelity, jejich charakteristiku, vznik, mezidruhové testování a možné problémy vznikající v průběhu jejich PCR amplifikace. V neposlední řadě je popsáno *cross-species* PCR testování mikrosatelitů u pelikánů, respektive u pelikána bílého.

Experimentální část je zaměřená na PCR amplifikaci vybraných polymorfních mikrosatelitů, původně nalezených u zástupců z řádu tučňáci a univerzálních ptačích mikrosatelitů, které byly v mé bakalářské práci (Kremlová, 2019) vyhodnocené jako polymorfní. Celkem 32 párů primerů amplifikovalo na DNA 21 nepříbuzných jedinců pelikána bílého 34 polymorfních lokusů, u kterých jsem dále analyzovala jejich parametry a zjišťovala výskyt vazby mezi dvojicemi lokusů či vazby na pohlaví.

Klíčová slova: *Cross-species* PCR amplifikace, mikrosatelit, pelikán bílý, *Pelecanus onocrotalus*, univerzální ptačí mikrosatelity, tučňáci

Počet stran: 67

Počet příloh: 1

Jazyk: Český

Bibliographical identification

Author's name and surname: Bc. Hana Kremlová

Title: The analysis and characterization of selected polymorphic microsatellites from order Sphenisciformes and conserved avian microsatellites in Great White Pelican (*Pelecanus onocrotalus*).

Type of thesis: Master

Department: Department of Cell Biology and Genetics, Faculty of Science, Palacky University, Olomouc

Supervisor: RNDr. Petr Nádvorník, Ph.D.

The year of presentation: 2021

Summary:

This master thesis deals with the analysis and characterization of selected polymorphic microsatellites found by cross-species PCR amplification in Great White Pelican (*Pelecanus onocrotalus*).

The theoretical part of this thesis I described the phylogeny of individual families in the order Pelecaniformes, which has changed many times over the years. The next chapters are focused on microsatellites, their characteristics, origin, cross-species testing and possible problems during their PCR amplification. In the last section of the theoretical part is described cross-species PCR testing of microsatellites in pelicans, respectively in Great White Pelicans.

The experimental part is focused on PCR amplification of selected polymorphic microsatellites, originally found in penguins and universal avian microsatellites, which were evaluated as polymorphic in my bachelor thesis (Kremlová, 2019). A total of 32 primer pairs amplified on DNA 21 unrelated individuals of the Great White Pelican 34 polymorphic loci. Using two population-genetic programmes, I analyzed their parameters and determined the occurrence of linkage between pairs of loci or linkage to sex chromosomes.

Keywords: Cross-species PCR amplification, microsatellite, Great White Pelican, *Pelecanus onocrotalus*, universal avian microsatellites, penguins

Number of pages: 67

Number of appendices: 1

Language: Czech

Prohlašuji, že jsem svou diplomovou práci vypracovala samostatně pod vedením RNDr. Petra Nádvorníka, Ph.D. a veškerou použitou literaturu jsem uvedla v kapitole Literární zdroje na konci této práce.

V Olomouci dne 30. 4. 2021

.....

Ráda bych touto cestou poděkovala RNDr. Petru Nádvorníkovi, Ph.D. za jeho čas, vstřícnost, ochotu a motivaci k práci. Dále pak děkuji za cenné rady i materiály, které mi věnoval při zpracování teoretické, ale zejména praktické části mé diplomové práce.

Tato diplomová práce vznikla v rámci projektu PrF_2021_005 za finanční podpory Interní grantové agentury Univerzity Palackého v Olomouci (IGA UPOL).

Obsah

1	Úvod	1
2	Cíle práce	2
3	Literární přehled	3
3.1	Vývojové vztahy mezi čeleděmi řádu Pelecaniformes	3
3.2	Mikrosatelity	11
3.2.1	Obecná charakteristika mikrosatelitů.....	11
3.2.2	Mezidruhová PCR amplifikace mikrosatelitů.....	12
3.2.3	Vznik a variabilita mikrosatelitů.....	13
3.2.4	Problémy vznikající v průběhu amplifikace	14
3.2.5	Mikrosatelity u pelikánů	15
3.2.5.1	Polymorfní mikrosatelity popsané <i>de novo</i>	16
3.2.5.2	Polymorfní mikrosatelity nalezené prostřednictvím <i>cross-species</i> PCR amplifikace.....	16
3.2.5.3	<i>Cross-species</i> testování mikrosatelitů u vybraných druhů rodu pelikán	17
4	Materiál a metody	20
4.1	Biologický materiál.....	20
4.2	Mikrosatelitní lokusy charakterizované u pelikána bílého	20
4.3	PCR amplifikace DNA	22
4.4	Elektroforetická separace PCR produktů.....	23
4.5	Použité chemikálie	26
4.6	Použité roztoky a jejich příprava	27
4.7	Použité laboratorní přístroje.....	29
5	Výsledky	30
6	Diskuse	39
7	Závěr	55
8	Literární zdroje	56
9	Příloha	65

Seznam obrázků

Obrázek č. 1: Vývojové vztahy mezi podřády (fialově) a čeleděmi (modře) řádu Pelecaniformes včetně zahrnutí několika vyhynulých čeledí označených † (podle Lanham <i>et al.</i> , 1947).	4
Obrázek č. 2: Vývojové vztahy mezi podřády (fialově) a čeleděmi (modře) řádu Pelecaniformes, řádem trubkonosí a čeledí člunozobcovití (podle Cracraft <i>et al.</i> , 1985).	5
Obrázek č. 3: Vývojové vztahy (část B + C) mezi řády (žlutě) a vybranými čeleděmi (modře) kladu vodních ptáků a vyčleněnou čeledí faetonovití (zeleně) (podle Hackett <i>et al.</i> , 2008). Vývojové vztahy (část A + C) mezi čeleděmi řádu Pelecaniformes (modře) a jemu sesterskými řády (žlutě) kladu Aequornithia (podle Dickinson <i>et Remsen</i> , 2013).	7
Obrázek č. 4: Vývojové vztahy mezi čeleděmi (modře) a řády (žlutě) kladu “Core Waterbirds” a Phaethontimorphae (zeleně) (podle Jarvis <i>et al.</i> , 2014).	8
Obrázek č. 5: Vývojové vztahy řádů (žlutě) a vybraných čeledí (modře) kladu Aequorlitor-nithes (podle Prum <i>et al.</i> , 2015).	9
Obrázek č. 6: Srovnání vztahů tří rodů řádu Pelecaniformes	10
Obrázek č. 7: Vývojové vztahy mezi řády (žlutě) a vybranými čeleděmi (modře) kladu “Aquatic and Semiaquatic Birds” (podle Kuhl <i>et al.</i> , 2020).....	10
Obrázek č. 8: Mechanismus replikačního sklouznutí (Ellegren, 2000).	14
Obrázek č. 9: Dvoualelový mikrosatelitní lokus TG01-148 genotypovaný na 21 vzorcích DNA pelikána bílého.	38
Obrázek č. 10: Pětialelový mikrosatelitní lokus Ech008 genotypovaný na 21 vzorcích DNA pelikána bílého	38
Obrázek č. 11: Pětialelový mikrosatelitní lokus Ech039 genotypovaný na 21 vzorcích DNA pelikána bílého	38
Obrázek č. 12: Srovnání počtu (uvedeného v závorkách) párů primerů amplifikujících polymorfni mikrosatelity u čtyř druhů pelikánů.	45
Obrázek č. 13: Rozložení všech 138 /42/ doposud nalezených párů primerů amplifikujících již charakterizované polymorfni mikrosatelity alespoň u jednoho ze čtyř druhů pelikánů.....	47
Obrázek č. 14: Přibližné schématické znázornění vzájemné pozice pohlavně vázaných mikrosatelitních lokusů Ech113, TG13-016, Eru03, PeEr05 a mikrosatelitů	

CAM11 a TG04-012, které jsou s velkou pravděpodobností také vázané na pohlavní chromozom Z.	52
Obrázek č. 15: Rozložení 159 párů primerů amplifikujících polymorfni mikrosatelitní lokusy u pelikána bílého vzhledem k jejich zdrojové čeledi	53

Seznam tabulek

Tabulka č. 1: Seznam 18 mikrosatelitních lokusů odvozených od zástupců z řádu tučňáci, které byly v mé bakalářské práci (Kremlová, 2019) u pelikána bílého vyhodnocené jako polymorfní.	20
Tabulka č. 2: Seznam 9 EST ptačích mikrosatelitních lokusů a 8 konzervovaných ptačích mikrosatelitních lokusů, které byly v mé bakalářské práci (Kremlová, 2019) u pelikána bílého vyhodnocené jako polymorfní včetně CAM24, který byl vyhodnocen jako monomorfní	21
Tabulka č. 3: Složení PCR reakční směsi pro 21 vzorků DNA pelikána bílého (včetně připočítaných rezerv).	22
Tabulka č. 4: Teplotní a časový profil PCR reakce.....	22
Tabulka č. 5: Charakteristika 34 polymorfních lokusů (amplifikovaných 32 páry primerů) genotypovaných u 21 nepříbuzných jedinců pelikána bílého	32
Tabulka č. 6: Srovnání mikrosatelitních lokusů původně nalezených u tučňáka žlutorohého (Ahmed <i>et al.</i> , 2009) s výsledky <i>cross-species</i> testování 21 nepříbuzných jedinců pelikána bílého (tato práce)	40
Tabulka č. 7: Srovnání mikrosatelitních lokusů původně nalezených u tučňáka nejmenšího (Grosser <i>et Waters</i> , 2015) s výsledky <i>cross-species</i> testování 21 nepříbuzných jedinců pelikána bílého (tato práce)	41
Tabulka č. 8: Srovnání EST ptačích mikrosatelitních lokusů (Dawson <i>et al.</i> , 2010) s výsledky <i>cross-species</i> testování u 21 nepříbuzných jedinců pelikána bílého (tato práce)	43
Tabulka č. 9: Srovnání konzervovaných ptačích mikrosatelitních lokusů (Dawson <i>et al.</i> , 2013) s výsledky <i>cross-species</i> testování u 21 nepříbuzných jedinců pelikána bílého (tato práce)	44
Tabulka č. 10: Přehled nalezených polymorfních mikrosatelitů u pelikána bílého původně navržených pro zástupce z řádu tučňáci a univerzální ptačí mikrosatelity a srovnání s výsledky testování u dalších devíti druhů z kladu Aequorlitorornithes..	49
Tabulka č. 11: Hodnoty <i>p</i> -value vybraných mikrosatelitních lokusových párů dle klesající síly vazby.	52

1 Úvod

Mikrosatelity jsou krátké sekvence DNA sestavené z tandemově se opakujících jednotek obvykle dlouhých do deseti nukleotidů. Díky jejich variabilitě v počtu opakování patří k nejpůvodnějším a nejuniverzálnějším genetickým markerům. Mikrosatelity jsou kodominantní, vysoce polymorfní a snadno detekovatelné, což jsou vlastnosti, na základě kterých se využívají pro studium genetické struktury populací nebo testování paternity. V populační genetice se dále používají k určení úrovně příbuzenského vztahu nebo k detekci rozdílů mezi blízkými příbuznými druhy.

Mikrosatelity je možné získat třemi způsoby: izolací *de novo*, identifikací *in silico* nebo *cross-species* testováním. *De novo* mikrosatelity pro pelikány byly popsány pouze u dvou druhů (pelikána severoamerického a bílého). *Cross-species* testováním mikrosatelitů původně nalezených u zástupců kladu Aequorlithornithes se na Katedře buněčné biologie a genetiky Univerzity Palackého v Olomouci věnuje Laboratoř populační genetiky. V této diplomové práci navážu na výsledky své bakalářské práce (Kremlová, 2019), ve které jsem prostřednictvím *cross-species* testování hledala polymorfní lokusy u pelikána bílého (*Pelecanus onocrotalus*). Tyto vybrané lokusy zanalyzuji u 21 jedinců tohoto druhu a charakterizuji za použití populačně genetických programů Cervus a Genepop.

2 Cíle práce

1. Vypracování rešerše na téma diplomové práce.
2. Shromáždění dostupných literárních zdrojů.
3. Amplifikace a charakteristika vybraných mikrosatelitních lokusů na DNA 21 nepříbuzných jedinců pelikána bílého; jedná se o mikrosatelity označené jako polymorfní v mé bakalářské práci (Kremlová, 2019).

3 Literární přehled

3.1 Vývojové vztahy mezi čeleděmi řádu Pelecaniformes

Fylogenetický vývoj řádu Pelecaniformes je intenzivně studován již několik desetiletí, avšak s postupem nových poznatků se mnohokrát měnil a pravděpodobně ani dnešní znalosti ohledně systému a fylogeneze jednotlivých čeledí tohoto řádu nejsou definitivní (Cracraft *et al.*, 1986; Prum *et al.*, 2015 a Kuhl *et al.*, 2020).

Tradičně se do řádu Pelecaniformes, dříve česky nazývaného jako řád veslonozí, z důvodu přítomnosti veslovací nohy, řadilo šest čeledí (anhingovití, faetonovití, fregatkovití, kormoránovití, pelikánovití a terejovití) (Lanham *et al.*, 1947). Na základě použití různých typů metod (morfologických, anatomických, oologických, osteologických, etologických a v neposlední řadě i molekulárních) docházelo s postupem času k vyčlenění většiny čeledí spadajících do tohoto řádu (faetonovitých, fregatkovitých, anhingovitých, kormoránovitých i terejovitých). Mezi blízké příbuzné tomuto řádu patří řády trubkonosí (Procellariiformes) a čápi (Ciconiiformes).

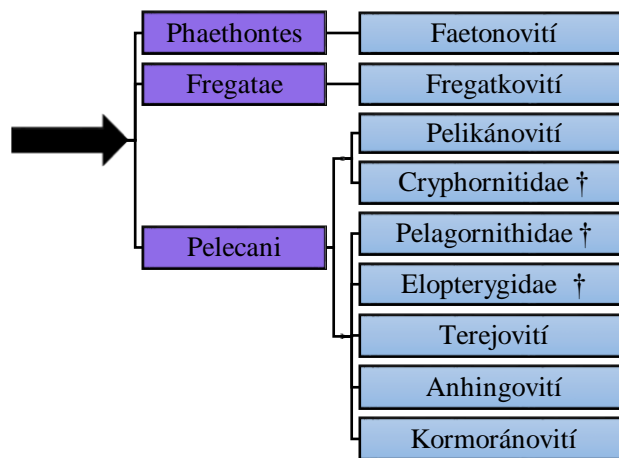
Dnes se do řádu Pelecaniformes řadí pouze jedna původní čeleď, pelikánovití. Někteří systematici zahrnují do tohoto řádu také kladivouše a člunozobce (dříve zástupci řádu brodiví, Ciconiiformes) (Prum *et al.*, 2015), jiní dokonce rozšiřují tento řád o volavky a ibisy (Kuhl *et al.*, 2020).

Většina vyřazených čeledí, dříve spadajících do řádu Pelecaniformes, je nyní součástí řádu Suliformes (český název tohoto řádu však ještě není vytvořen). Čeleď faetonovití nyní spadá do řádu faetoni (Phaethontiformes), jehož sesterským řádem je řád slunatci (Eurypygiformes), do kterého se řadí dva druhy: slunatec nádherný (jediný zástupce čeledi slunatcovití) a kagu chocholatý (jediný zástupce čeledi kaguovití) (Kuhl *et al.*, 2020). O příbuzenském vztahu dvou morfologicky odlišných čeledí, faetonovití (Phaethontidae) a slunatcovití (Eurypygidae), informovali jako první McCormack *et al.* (2013), ti však do své studie nezahrnuli kagu, ale určili, že může taktéž nést určitou podobnost s faetony. Faetonovití jsou mořští ptáci s převážně bílým zbarvením, krátkýma nohama a protáhlým středním ocasním peřím. Slunatci žijí v nížinných a podhorských lesích Jižní Ameriky a jejich peří je krypticky zbarvené do šedo-hnědo-černa. Kagu je suchozemský pták žijící na ostrově Nová Kaledonie a svým vzhledem částečně připomíná faetona i slunatce (McCormack *et al.*, 2013). Dříve byli zástupci obou zmíněných řádů umístěni v rámci fylogenetického stromu na různých místech. Faetoni byli dříve součástí

řádu Pelecaniformes a kagu se slunatcem se řadili do řádu krátkokřídlí (Gruiformes) (Livezey *et* Zusi, 2007).

Správnost fylogenetických stromů se odvíjela od počtu analyzovaných znaků a jejich proměn během evoluce. V případě molekulárních dat se jejich spolehlivost stanovila na základě toho, zda se jednalo o intronové či exonové sekvence, kolik bazí se porovnávalo a také kolik zástupců, respektive zástupců z různých čeledí, bylo analyzováno. Analýzou velkého počtu ptačích čeledí, ale pouze vybraných molekulárních sekvencí, se zabývali například Ericson *et al.* (2006), Hackett *et al.* (2008) nebo Prum *et al.* (2015). Naopak Jarvis *et al.* (2014) nebo Suh *et al.* (2015) se zabývali analýzou omezeného počtu ptačích genomů a jejich výsledky tak limitují pohled do hlubších evolučních vztahů mezi ptačími čeleděmi. Rozdílné sestavení fylogenetického stromu třídy ptáci závisí také na poměru použitých kódujících nebo nekódujících sekvencí jaderného genomu nebo na použití genomu mitochondriálního, použité metodice a softwaru, pomocí kterého se získaná data zpracovávají (Hackett *et al.*, 2008; Jarvis *et al.*, 2014; Prum *et al.*, 2015; Reddy *et al.*, 2017).

Lanham *et al.* (1947) provedli fylogenetickou analýzu založenou především na podobnostech v kosterní stavbě ptáků a došli k závěru, že řád Pelecaniformes je monofyletickou skupinou rozdělenou do tří podřádů (viz Obrázek č. 1). Fregatkovité (Fregatidae) a faetonovité (Phaethontidae) označili jako sesterské skupiny k linii složené ze všech zbývajících čeledí. Tuto linii dále rozdělili na dvě skupiny, první tvořila čeleď pelikánovití (Pelecanidae) a Cryphornitidae (dnes již vyhynulá čeleď), druhou skupinu tvořily čeledě terejovití (Sulidae), kormoránovití (Phalacrocoracidae), anhingovití (Anhingidae) a dvě vyhynulé čeledě - Pelagornithidae a Elopterygidae.

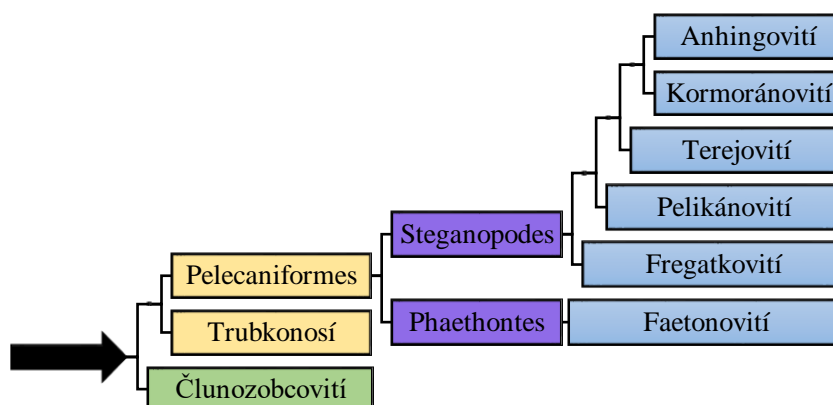


Obrázek č. 1: Vývojové vztahy mezi podřády (fialově) a čeleděmi (modře) řádu Pelecaniformes včetně zahrnutí několika vyhynulých čeledí označených † (podle Lanham *et al.*, 1947).

Autoři ve své analýze shrnuli hlavní anatomické znaky řádu Pelecaniformes a následně poukázali na rozdíly oddělující faetonovité a fregatkovité od zbývajících čeledí tohoto řádu (Lanham *et al.*, 1947). Wetmore (1960) souhlasil s rozdělením pelikánů, terejů, kormoránů a anhing, rozpor však nastal, pokud šlo o fylogenetické umístění fregatek a faetonů. Zatímco Lanham *et al.* (1947) je chápali jako samostatné podřády, Wetmore (1960) je spojil do jednoho podřádu. Faetoni a fregatky mají sice zachovanou totipalpickou nohu, kterou lze považovat za základní znak, avšak v jiných ohledech (vnitřní anatomie) jsou od ostatních zástupců řádu Pelecaniformes odlišní natolik, že je Wetmore (1960) spojil do jedné společné větve.

Cracraft *et al.* (1985) analyzovali v řádu Pelecaniformes 52 znaků a došli k závěru, že 12 z nich je synapomorfních, čímž potvrdili monofylii tohoto řádu. Na základě těchto synapomorfii rozdělili řád Pelecaniformes na dva sesterské podřády (viz Obrázek č. 2): Phaethontes, zahrnující faetonovité a Steganopodes, který je rozdělen do dvou větví. První větev tvoří fregatkovité a druhou pak pelikánovité, terejovité, kormoránovité a anhingovité. Dřívější hypotézy (Lanham *et al.*, 1947) o tom, že v rámci řádu Pelecaniformes jsou fregatkovité s faetonovými nejbližšími čeleděmi, byla vyvrácena a za nejpříbuznější čeledě byli označeni kormoránovité s anhingovými.

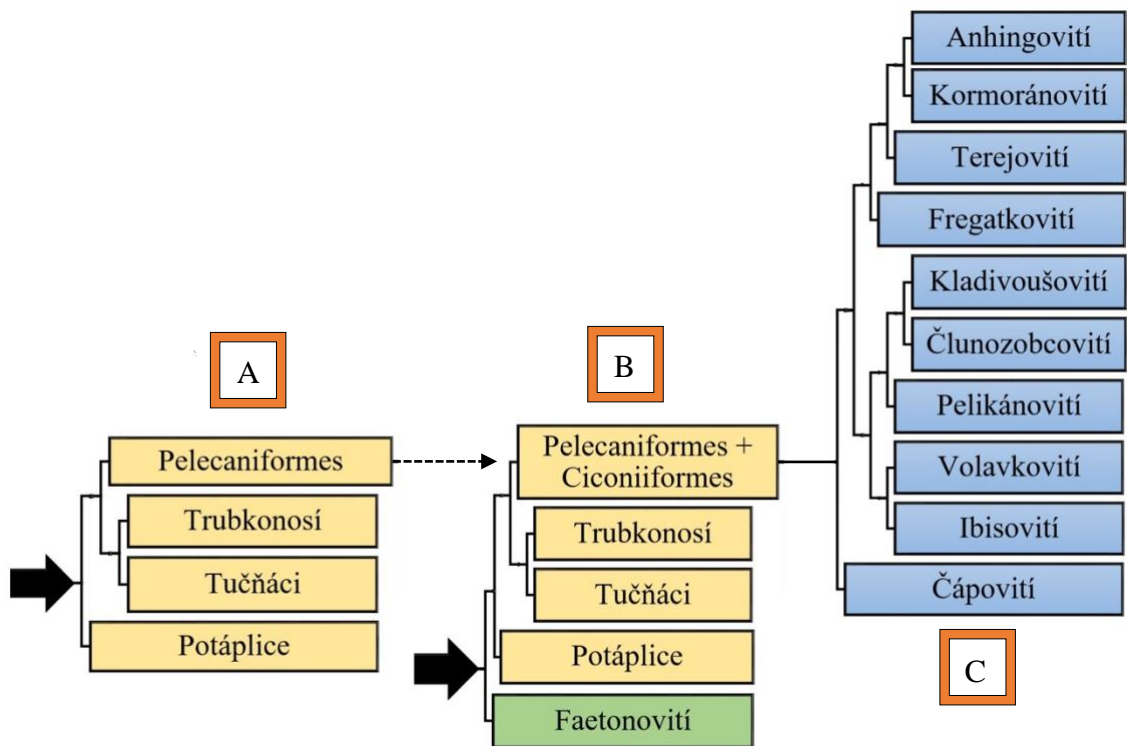
Sesterským taxonem k řádu Pelecaniformes je podle Cracraft *et al.* (1985) řád trubkonosí (Procellariiformes), autoři dokonce vyloučili jakýkoliv vztah Pelecaniformes s řádem Ciconiiformes (dříve řád brodiví). Na základě podobností v chování při krmení zkoumali také příbuznost zástupců řádu Pelecaniformes s člunozobcem africkým (*Balaeniceps rex*), nakonec však došli k závěru, že se jedná pouze o konvergenci, nikoli o příbuzenský vztah.



Obrázek č. 2: Vývojové vztahy mezi podřády (fialově) a čeleděmi (modře) řádu Pelecaniformes, řádem trubkonosí a čeledí člunozobcovití (podle Cracraft *et al.*, 1985).

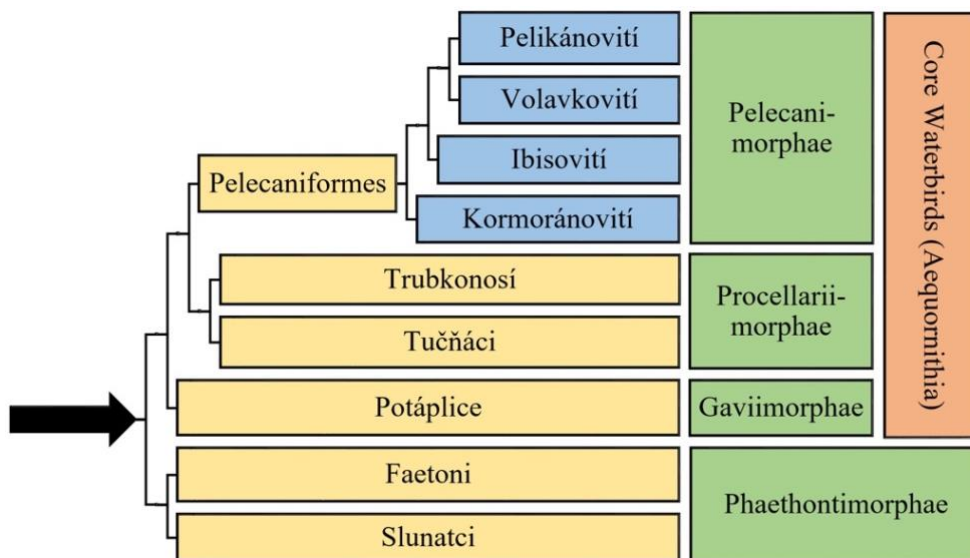
Monofylie řádu Pelecaniformes byla zajištěna jedním typickým znakem, a to totipalpickou nohou jedinců neboli nohou se čtyřmi prsty spojenými plovací blánou. O tom, zda je tento řád monofyletický, však pochybovalo mnoho systematiků, např.: Sibley *et* Ahlquist (1990), kteří na základě DNA-DNA hybridizace usoudili, že fregatkovití jsou příbuznější zástupcům z řádu trubkonosí. Rozhodli se proto seskupit 29 čeledí do jednoho komplexního řádu nazvaného „Ciconiiformes“. Rod člunozobec (pták podobný čápovi) označili jako nejpříbuznější rod k rodu pelikán a oba tyto rody seskupili do společné čeledě pelikánovití. Závěrem uvedli, že totipalpická noha se v minulosti mohla vyvinout více než jednou, nebo naopak byla u některých zástupců tohoto komplexního řádu ztracena. Alternativní hypotézu o tom, že řád Pelecaniformes je polyfyletický, podpořili také Hedges *et* Sibley (1994), kteří poskytli důkazy na základě porovnání sekvencí mitochondriálních genů 12S rRNA a 16S rRNA pocházejících od 16 druhů ptáků s totipalpickou nohou. Polyfyletismus řádu Pelecaniformes však většina systematiků odmítla, a proto byly všechny čeledi tohoto řádu nakonec vždy řazeny pospolu.

Zařazením 169 druhů ptáků do fylogenetického stromu se zabývali Hackett *et al.* (2008), kteří z 19 nezávislých lokusů seřadili přibližně 32 kbp dlouhou sekvenci jaderné DNA, na základě které mimo jiné vyčlenili z řádu Pelecaniformes čeleď faetonovití, která tvořila jednu z tradičních čeledí tohoto řádu. Dále vytvořili „směsný“ řád, ve kterém seskupili zbývající čeledi tradičních Pelecaniformes (ptáci s totipalpickou nohou) a Ciconiiformes (čápi a jejich příbuzní), Dickinson *et* Remsen (2013) ovšem nazývají tento řád jako Pelecaniformes, ale uvědomují si jeho polyfyletismus. A společně s řády trubkonosí (Procellariiformes), tučňáci (Sphenisciformes) a potáplice (Gaviiformes) jej zařadili do kladu vodních ptáků (viz Obrázek č. 3). Takovéto seskupení vodních a na vodu vázaných ptáků později nazvali Mayer *et al.* (2010) Aequornithes a Dickinson *et* Remsen, (2013) jej poté upravili na Aequornithia. Hackett *et al.* (2008) také obnovili sesterský vztah mezi monospecifickými rody kagu (*Rhynochetos*) a slunatec (*Eurypyga*) a vyčlenili je mimo řád krátkokřídlí (Gruiformes), kam byli doposud tradičně řazeni.



Obrázek č. 3: Vývojové vztahy (část B + C) mezi řády (žlutě) a vybranými čeleděmi (modře) kladu vodních ptáků a vyčleněnou čeledí faetonovití (zeleně) (podle Hackett *et al.*, 2008). Vývojové vztahy (část A + C) mezi čeleděmi řádu Pelecaniformes (modře) a jemu sesterskými řády (žlutě) kladu Aequornithia (podle Dickinson *et Remsen*, 2013).

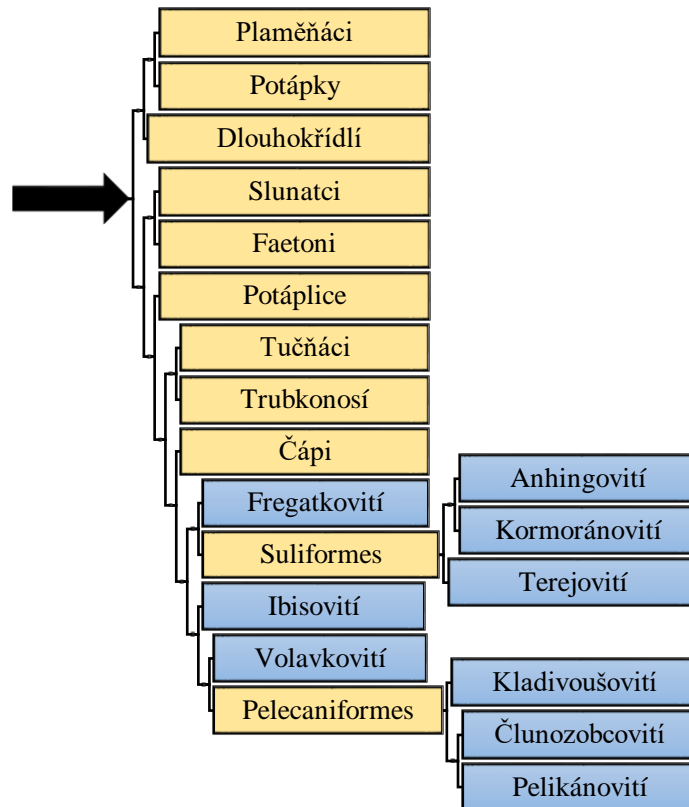
Mezitím provedli Jarvis *et al.* (2014) fylogenetickou analýzu celých genomů 48 ptáků spadajících do Neoaves. Výsledky analýzy v rámci Neoaves jednak potvrdily správnost zařazení mnoha kladů a zároveň vedly k návrhu nového fylogenetického větvení. Z každé známé čeledi vodních ptáků osekvenovali pouze jeden druh, výjimku tvořila čeleď tučňákovití, ze které osekvenovali druhy dva, do analýzy ovšem nezahrnuli žádného zástupce čeledi čáповití. Autoři, na základě získaných výsledků, označili klad vodních ptáků (“Core Waterbirds”) dříve nazývaný jako Aequornithia za monofyletický a rozdělili jej do tří větví: Pelecanimorphae, Procellariimorphae a Gaviimorphae. Řád tučňáci (Sphenisciformes) je v rámci Procellariimorphae sesterským řádem řádu trubkonosí (Procellariiformes). Zástupce řádů faetoní a slunatci seskupili Jarvis *et al.* (2014) do jedné společné větve, kterou nazvali Phaethontimorphae. Tuto větev označili sesterskou větví ke třem výše zmiňovaným, a to i přesto, že oba zástupci Phaethontimorphae mají podobný způsob života jako zástupci „Core Waterbirds“ (viz Obrázek č. 4).



Obrázek č. 4: Vývojové vztahy mezi čeleděmi (modře) a řády (žlutě) kladu “Core Waterbirds” a Phaethontimorphae (zeleně) (podle Jarvis *et al.*, 2014).

K vyřešení fylogenetických vztahů mezi hlavními liniemi v rámci Neoaves a k otestování monofylie jednotlivých subkladů Neoaves však byla genomická analýza 48 druhů ptáků nedostatečná a mohla tak obsahovat chybně určené fylogenetické vztahy. Proto Prum *et al.* (2015) osekvenovali, za použití sekvenování nové generace, genom 198 druhů ptáků, který analyzovali prostřednictvím dvou typů analýz: Bayesiánské analýzy a analýzy maximální pravděpodobnosti. Obě analýzy rozdělily zástupce Neoaves do pěti hlavních kladů, které přinesly téměř identické fylogenetické stromy.

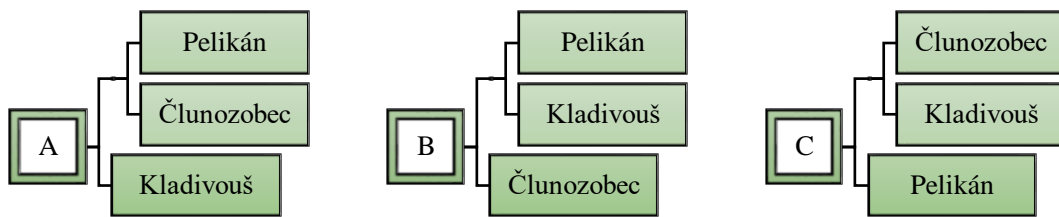
Výsledky analýzy prováděné Prumem *et al.* (2015) jednak identifikují mnoho nových kladů, ale zároveň také podporují fylogenetické vztahy navrhované již v předchozích studiích. Mimo jiné navrhují také existenci nového komplexního kladu vodních ptáků, který je podobný kladům sestaveným Ericsonem *et al.* (2006), Hackettem *et al.* (2008) a také Jarvisem *et al.* (2014). Tento klad nazvali Aequornithes a zahrnuli do něj všechny vodní a na vodu vázané ptáky, s výjimkou vrubozobých (viz Obrázek č. 5). Stejně jako Ericson *et al.* (2006), Hackett *et al.* (2008) a Jarvis *et al.* (2014) potvrdili také Prum *et al.* (2015) monofylii tohoto kladu. Dále také potvrdili správnost označení kladu Aequornithia jako sesterské větve Phaethontimorphae (slunatci a faetoni). Jelikož však nebyli schopni získat DNA kagu, nemohli otestovat hypotézu navrženou Hackettem *et al.* (2008), že kagu je sesterskou skupinou slunatců. Autoři dále poukázali na nové vztahy v rámci řádu trubkonosí oproti těm, které navrhovali Hackett *et al.* (2008).



Obrázek č. 5: Vývojové vztahy řádů (žlutě) a vybraných čeledí (modře) kladu Aequorlornithes (podle Prum *et al.*, 2015).

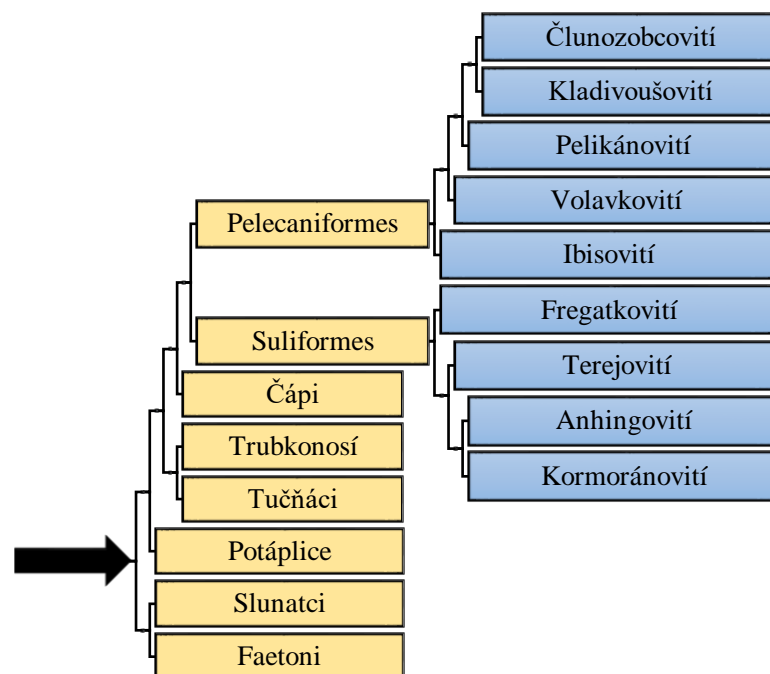
Větev zahrnující fregatkovité, terejovité, anhingovité a kormoránovité se svým zastoupením čeledí i jejich typologií shoduje se stromem Hacketta *et al.* (2008). Sesterská skupina k této větvi má také stejné zastoupení čeledí v obou stromech (strom Bayesiánské analýzy i strom analýzy maximální pravděpodobnosti) jako strom Hacketta *et al.* (2008), avšak s určitými rozdíly v jejich vzájemné typologii. Bayesiánský strom umísťuje ibisovité jako sesterskou skupinu k čeledím volavkovítí, kladivoušovítí, člunozobcovítí a pelikánovítí. Kdežto strom maximální pravděpodobnosti a strom Hacketta *et al.* (2008) řadí ibisovité jako nejpříbuznější skupinu k čeledi volavkovítí (Prum *et al.*, 2015).

Vzájemné vztahy rodů pelikán (*Pelecanus*), člunozobec (*Balaeniceps*) a kladivouš (*Scopus*) nejsou ještě zcela jasné, a proto různé typy analýz dávají všechny možné kombinace. Prum *et al.* (2015) uvedli, že každý ze tří stromů (Bayesiánské analýzy, maximální pravděpodobnosti a Hacketta *et al.* (2008)) určuje vztahy mezi rody člunozobec, pelikán a kladivouš rozdílně (viz Obrázek č. 6).



Obrázek č. 6: Srovnání vztahů tří rodů řádu Pelecaniformes. A: vztah dle Bayesiánské analýzy, B: vztah dle analýzy maximální pravděpodobnosti, C: vztah dle Hackett *et al.* (2008):

Kuhl *et al.* (2020) představili fylogenetický strom složený z 221 ptačích čeledí (viz Obrázek č. 7), který je založen na transkriptomových sekvencích nebo jejich genomových ortolozích. Prostřednictvím tohoto nového přístupu tak sestavili vysoce stabilní strom vykazující vztahy mezi všemi ptačími řády a příslušnými čeleděmi.



Obrázek č. 7: Vývojové vztahy mezi řády (žlutě) a vybranými čeleděmi (modře) kladu “Aquatic and Semiaquatic Birds” (podle Kuhl *et al.*, 2020).

Klad s názvem Aequorlitorinithes používaný v publikaci Prum *et al.* (2015) se svým složením částečně liší od kladu “Aquatic and Semiaquatic Birds” sestaveného Kuhlem *et al.* (2020). Prum *et al.* (2015) v kladu Aequorlitorinithes spojují plameňáky, potápky a dlouhokřídlé s řády tvořícími klad „Aquatic and Semiaquatic Birds“ (Kuhl *et al.*, 2020). Klad “Aquatic and Semiaquatic Birds” zahrnuje vodní a na vodu vázané ptáky, kteří se dále dělí do dvou subkladů. První subklad zahrnuje většinu mořských ptáků (Gaviiformes, Sphenisciformes, Procellariiformes, Suliformes a Pelecaniformes) a také čápy (Ciconiiformes) (Kuhl *et al.*, 2020). Druhý subklad zahrnuje dva řády, prvním jsou

faetoni (Phaethontiformes) a druhým je řád Eurypygiformes, kam patří kagu se slunatcem. Na rozdíl od Prum *et al.* (2015) chápou Kuhl *et al.* (2020) rod pelikán (*Pelecanus*) jako sesterský rod k rodům člunozobec (*Balaeniceps*) a kladivouš (*Scopus*), stejně jako to zmiňují Hackett *et al.* (2008).

3.2 Mikrosatelity

Kromě unikátních sekvencí tvoří podstatnou část eukaryotického genomu také sekvence repetitivní, které jsou označovány jako homologní fragmenty DNA, které jsou v genomu přítomny ve více kopiích (Britten *et Davidson*, 1971; Jurka *et al.*, 2007; Shammas, 2011). Existují dva základní typy repetitivních neboli opakujících se sekvencí: rozptýlené repetice a tandemové repetice (Jurka *et al.*, 2007). Zatímco rozptýlené repetice jsou úseky DNA dlouhé 20–30 kbp rozšířené po celém genomu, tandemové repetice představují úseky DNA, ve kterých se opakuje stejný repetitivní motiv několikrát za sebou. V závislosti na délce repetitivního motivu lze tandemová opakování rozdělit na satelity, minisatelity (délka motivu: 10–100 bp, celková délka 500 bp až několik kbp) a mikrosatelity (délka motivu: 1–9 bp, opakování 3–100x za sebou) (Shammas, 2011). Rozptýlené repetice jsou většinou neaktivní kopie transponovatelných elementů vložených do genomové DNA. Transponovatelné elementy jsou segmenty DNA nebo RNA, které mají schopnost se replikovat a vzniklé kopie následně vkládat na jiná místa v genomu (Jurka *et al.*, 2007; Shammas, 2011). Tyto transponovatelné elementy mohou být buď autonomní, nebo neautonomní (Shammas, 2011).

3.2.1 Obecná charakteristika mikrosatelitů

Mikrosatelity, známé jako jednoduché opakující se sekvence (SSRs) nebo také jako krátká tandemová opakování (STRs), jsou oblasti DNA složené z motivů dlouhých 1 až 9 nukleotidů opakovaných za sebou (Tóth *et al.*, 2000). Mono-, di-, tri- a tetranukleotidové repetice jsou hlavními motivy mikrosatelitů, ale opakování pěti (penta-) nebo šesti (hexa-) nukleotidů jsou obvykle klasifikována jako mikrosatelity také (Ellegren, 2004). Většina mikrosatelitů je složena z repetitivních jednotek $(CA)_n$ (Shammas, 2011). Vyskytují se v kódujících i nekódujících oblastech prokaryotního i eukaryotního jaderného genomu a rovněž v dalších organelách nesoucích DNA (Hancock, 1996; Phumichai *et al.*, 2015). Vieira *et al.* (2016) však uvedli, že vzhledem k tomu, že mají mikrosatelity vysokou mutační rychlost, která by mohla ohrozit genovou expresi, vyskytují se v genových oblastech méně.

Tóth *et al.* (2000) porovnávali distribuci mikrosatelitů v exonech, intronech a intergenních oblastech mezi několika eukaryotickými skupinami (primáti, hlodavci, další savci, ostatní obratlovci, členovci, *Caenorhabditis elegans*, rostliny, kvasinky a jiné houby) a došli k závěru, že rozšíření a frekvence mikrosatelitů se u jednotlivých druhů liší stejně jako frekvence různých opakujících se motivů, která se liší podle genomové oblasti, ve které se mikrosatelit nachází (Ellegren, 2004). V exonech všech taxonů převažují repetice tri- a hexanukleotidů (Tóth *et al.*, 2000).

Oliveira *et al.* (2006) uvedli, že mikrosatelity lze klasifikovat podle jejich repetitivního motivu na:

- dokonalé: kdy je repetitivní sekvence složená výhradně opakováním jednoho stejného motivu a není přerušena žádným nukleotidem, který by k motivu nepatřil (např.: TATATATATATATATA);
- nedokonalé: kdy se v opakujícím se motivu vyskytuje nukleotid, který k motivu nepatří (např.: TATATATACTATATA);
- přerušované: kdy je repetitivní motiv přerušen sekvencí několika nukleotidů, které neodpovídají sekvenci repetitivního motivu (např.: TATATACCGTGTTATATAT);
- složené: kdy je tvořen dvěma různými repetitivními motivy (např.: TATATATATAGTGTGTGTGTGT).

3.2.2 Mezidruhov^á PCR amplifikace mikrosatelitů

Mikrosatelity jsou vysoce informativní kodominantní multialelové genetické markery. Jejich další výhodou je dobrá přenositelnost mezi příbuznými druhy a snadná experimentální reprodukovatelnost, která je založena na polymerázové řetězové reakci (Oliveira *et al.*, 2006; Mason, 2015). Mají využití při analýze variability populací, odvození vnitrodruhových genetických vztahů, genetickém mapování, ve forenzní genetice nebo při určování otcovství (Vieira *et al.*, 2016). V ptačích genomech je frekvence výskytu mikrosatelitů nízká, a proto je složitější je najít. Z toho důvodu se u nich, ve srovnání s na mikrosatelity bohatými genomy, používá právě *cross-species* amplifikace (Lillandt *et al.*, 2002).

Přenositelnost neboli mezidruhov^á amplifikace je velmi důležitým faktorem, který usnadňuje používání mikrosatelitů, čímž snižuje náklady na vývoj specifických primerů (Oliveira *et al.*, 2006). Přenositelnost mikrosatelitů mezi příbuznými druhy je umožněna homologní povahou sekvencí DNA v oblastech obklopujících mikrosatelit (Primmer *et Merilä*, 2002). Páry primerů navržené pro určitý druh lze použít pro jiné

druhy stejného rodu, pro různé rody stejné čeledi, a dokonce i pro zástupce z jiných řádů (Oliveira *et al.*, 2006; Dawson *et al.*, 2010; Kremlová, 2019). Amplifikace je ovlivněna fylogenetickou příbuzností a s rostoucí genetickou divergencí mezi druhy klesá. Úspěšnost amplifikace mikrosatelitu je ovlivněna velikostí a složitostí genomu druhu a výskytem amplifikovaného lokusu v kódující oblasti (Primmer *et Merilä*, 2002). Použitím identického páru primerů však nemusí být detekován polymorfismus u druhu jiného, může ovšem dojít k amplifikaci nescifických produktů (Ellegren *et al.*, 1995).

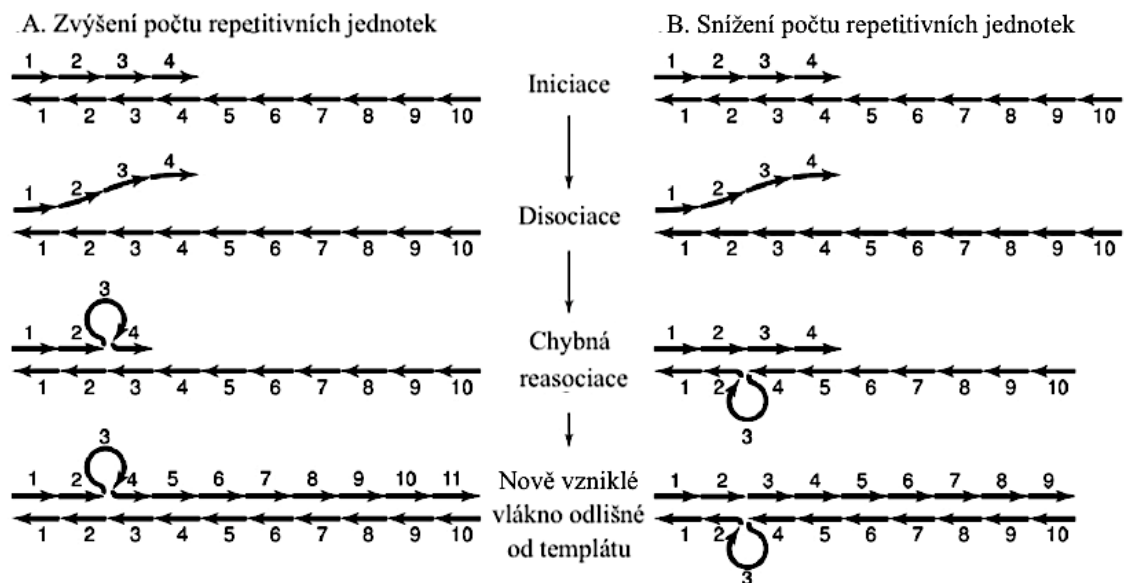
3.2.3 Vznik a variabilita mikrosatelitů

Díky své repetitivní struktuře jsou mikrosatelity velmi náchylné na vznik mutací, ty jsou za normálních podmínek opravovány procesem „mismatch repair“. Avšak v případě, že tento mechanismus není přítomen, dochází u mikrosatelitu k jeho nestabilitě (de Angelis *et al.*, 2018). Mikrosatelity mutují rychlostí 10^{-3} – 10^{-6} na generaci buněk (Gemayel *et al.*, 2012). Rychlost mutace v mikrosatelitu závisí na jeho vnitřních vlastnostech, např. na typu, délce a počtu opakujících se motivů. Mikrosatelity s delším repetitivním motivem a větším počtem jednotek opakování jsou náchylnější na vznik mutace (Ellegren, 2004). Variabilita mikrosatelitu neboli vznik nové alely téhož mikrosatelitu je obvykle výsledkem přidání nebo odstranění celých opakujících se motivů (Vieira *et al.*, 2016). Převládajícím mechanismem vzniku rozdílného počtu opakujících se motivů je sklouznutí DNA polymerázy při replikaci nebo opravě DNA (Harr *et al.*, 2000). Ellegren (2000) však uvádí, že mezi mutační mechanismus přispívající k variabilitě délky mikrosatelitu patří také chyby během rekombinace.

Rekombinace zahrnuje dva způsoby změny počtu opakujících se motivů mikrosatelitu. Prvním je nerovnoměrný crossing-over, ke kterému dochází mezi homologními chromozomy. Z důvodu přítomnosti repetitivních motivů se může během spojení vytvořit smyčka, čímž dojde k výměně různě dlouhých úseků chromozomu. Jeden chromozom získá více repetitivních motivů a bude proto delší, jeho homolog bude naopak kratší, neboť bude obsahovat repetitivních méně (Oliveira *et al.*, 2006; Vieira *et al.*, 2016). Genová konverze je druhým možným způsobem, prostřednictvím kterého se mění délka mikrosatelitu. Jedná se o nreciprokou homologní rekombinaci, při které dochází k přenosu repetitivního motivu z jednoho chromozomu na druhý (Jakupciak *et Wells*, 2000).

V průběhu replikace či opravy DNA, kdy DNA polymeráza prochází místem repetitivního motivu, může dojít k jejímu sklouznutí (tzv. *DNA slippage*). Jeden řetězec

DNA se dočasně oddělí od druhého, následující připojení však již bude chybné. Při tomto krátkém oddisociování vláken dojde k vytvoření smyčky, která má za následek chybné párování bazí (Obrázek č. 8). V případě, že se smyčka vytvoří na nově vznikajícím vlákně, dojde k prodloužení sekvence mikrosatelitu. Pokud však dojde ke smyčce na vlákně templátovém, bude sekvence mikrosatelitu na nově vzniklém vlákně kratší (Ellegren, 2000; Oliveira *et al.*, 2006).



Obrázek č. 8: Mechanismus replikačního sklouznutí. Šipkami a čísla jsou označeny jednotlivé repetitivní motivy. A: zvýšení počtu repetitivních jednotek v mikrosatelitu, B: snížení počtu repetitivních jednotek v mikrosatelitu (Ellegren, 2000).

3.2.4 Problémy vznikající v průběhu amplifikace

Po identifikaci sekvence mikrosatelitu přichází na řadu návržení primerů (o délce 18 až 25 bp), které jsou komplementární k jeho přilehlým oblastem, následuje amplifikace a určení přítomnosti polymorfismu (Vieira *et al.*, 2016).

V průběhu amplifikace však mohou nastat problémy, které často komplikují vyhodnocování alel (Guichoux *et al.*, 2011). Autoři uvádějí několik případů, prvním z nich je výskyt *stutter* bandů neboli stínových pásů. Tyto pásy odpovídají amplifikovaným PCR produktům, avšak jsou obvykle kratší o jeden nebo několik opakujících se motivů (Fazekas *et al.*, 2010; Guichoux *et al.*, 2011). Vznikají sklouznutím DNA polymerázy v mikrosatelitních oblastech v průběhu syntézy komplementárního řetězce při PCR (Fazekas *et al.*, 2010). Párování vláken, které omezuje následný efekt vzniku *stutter* bandů, lze ovlivnit snížením denaturační teploty na 83 °C nebo použitím alternativních polymeráz, jako jsou například fúzní enzymy (Guichoux *et al.*, 2011).

Druhou komplikací je výskyt o jednu bazi delších amplikonů odvozených z oblastí obsahujících mikrosatelity. Vznikají chybou *Taq* polymerázy, která k nově vznikajícím vláknům přidá nukleotid, který se na templátovém vlákně vůbec nevyskytuje. Obvykle se jedná o adenin a tento proces je nazván adenylace. Tento problém je řešen snížením množství templátové DNA, snížením koncentrace primerů, zvýšením koncentrace *Taq* polymerázy nebo použitím alternativních polymeráz (Guichoux *et al.*, 2011).

Komplikaci způsobuje také přítomnost mutací v oblastech ohraničujících místa nasedání primerů. Tato skutečnost vede buď ke špatné amplifikaci alel, která může být jednou z příčin výskytu zdánlivě nízké heterozygotnosti v populaci, nebo k výskytu neamplifikujících se alel neboli alel nulových (Guichoux *et al.*, 2011). Vznik alelického výpadku je podmíněn změnou nukleotidů v tzv. *flanking region* neboli vazebném místě jednoho z primerů. Primer nemůže na toto místo nasednout a nedojde tak k amplifikaci daného mikrosatelitu (Butler, 2007). Přítomnost nulové alely u heterozygotního jedince dává vzniku zdánlivého homozygota. U jedince homozygotního pro nulovou alelu nedochází k žádné amplifikaci alel, a tím pádem ani k jejich následné detekci (Guichoux *et al.*, 2011). V některých případech může být původně nulová alela amplifikována prostřednictvím snížení teploty *annealingu*, což umožní méně homologní vazbu mezi primerem a templátem DNA, a alela může být detekována (Butler, 2007).

Nesprávným navržením primerů může být způsoben výskyt primerových dimerů nebo nesespecifických produktů. Jejich přítomnost může být kritériem pro vyloučení vzorku nebo redesign primeru. Pokud však tyto artefakty nijak neovlivňují vyhodnocování separovaných produktů v gelu, jsou přehlédnuty a do hodnocení nezahrnuty (Guichoux *et al.*, 2011).

3.2.5 Mikrosatelity u pelikánů

Prostřednictvím *de novo* izolace bylo do současné doby získáno a charakterizováno u dvou druhů pelikánů celkem 19 polymorfních mikrosatelitních lokusů (Hickman *et al.*, 2008; de Ponte Machado *et al.*, 2009). U pelikána severoamerického (*Pelecanus erythrorhynchos*) bylo charakterizováno 9 mikrosatelitních lokusů vykazujících polymorfismus, u pelikána bílého (*P. onocrotalus*) vykazovalo polymorfismus 10 lokusů, u zbylých šesti druhů pelikánů doposud žádné mikrosatelity *de novo* izolovány nebyly.

Z důvodu poměrně náročného procesu *de novo* izolace mikrosatelitních markerů, se k hledání nových mikrosatelitních lokusů mnohem častěji využívá *cross-species* PCR amplifikace (Dawson *et al.*, 2010 a 2013). Páry primerů, které se pro *cross-species* testování používají, bývají odvozeny od zástupců z příbuzných skupin pelikánů, především z kladu Aequorlitorornithes.

3.2.5.1 Polymorfní mikrosatelity popsané *de novo*

Pro amplifikaci mikrosatelitů nalezených u pelikána severoamerického navrhli Hickman *et al.* (2008) 25 párů primerů. Následným testováním na DNA 23 jedinců téhož druhu identifikovali 9 polymorfních mikrosatelitů (PeEr01–PeEr09) s 2–8 alelami na lokus. Všechny nalezené polymorfní lokusy měly odhadované frekvence nulových alel $\leq 0,1$, výjimkou byl mikrosatelitní lokus PeEr08 s hodnotou 0,167. Všechna místa polymorfismu odpovídala očekávané Hardy-Weinbergově rovnováze. Lokusy byly také testovány na možnou vazbu mezi nimi, avšak všechny byly vyhodnoceny jako nezávislé.

De novo izolaci 10 polymorfních mikrosatelitních lokusů (PEL086, PEL149, PEL175, PEL185, PEL188, PEL190, PEL207, PEL221, PEL265 a PEL304) z DNA pelikána bílého provedli de Ponte Machado *et al.* (2009). Páry primerů navržené pro amplifikaci těchto lokusů autoři následně testovali na dvou populacích jedinců tohoto druhu. Z celkového počtu 46 jedinců pocházela polovina jedinců z namibijské a druhá polovina z jihoafrické populace. Amplifikované lokusy měly od 2 do 19 alel. Všechny lokusy, s výjimkou PEL185 a PEL221, byly v Hardy-Weinbergově rovnováze. Pozorovaná heterozygotnost byla 0,261–0,913 a žádná dvojice z výše uvedených lokusů nebyla ve vazbě.

3.2.5.2 Polymorfní mikrosatelity nalezené prostřednictvím *cross-species* PCR amplifikace

Cross-species PCR amplifikaci provedli de Ponte Machado *et al.* (2009), kteří na DNA osmi jedinců tří druhů pelikánů testovali 10 jimi navržených párů primerů. Polymorfismus byl sledován na pěti jedincích pelikána hnědého (*P. occidentalis*), dvou jedincích pelikána severoamerického (*P. erythrorhynchos*) a jednom jedinci pelikána afrického (*P. rufescens*). Pouze 4 z 10 testovaných párů primerů amplifikovaly u zkoumaných jedinců polymorfní produkt, u každého druhu se však jednalo o jiné páry primerů. Počet alel na lokus se pohyboval v rozmezí od 2 do 9.

Rozmaností genetické struktury pelikánů, patřících mezi široce rozšířené koloniální vodní ptáky, se zabývali Raudink *et al.* (2011). Ke zjištění genetického

rozrůzněni použili 7 párů primerů navržených pro amplifikaci mikrosatelitů pelikána severoamerického (PeEr01, PeEr02, PeEr03, PeEr04, PeEr06, PeEr07 a PeEr09) (Hickman *et al.*, 2008) a 3 páry primerů navržené pro amplifikaci mikrosatelitů pelikána bílého (PEL086, PEL149 a PEL304) (de Ponte Machado *et al.*, 2009). Celkem 10 párů primerů testovali na 333 jedincích pelikána severoamerického pocházejících z 19 kolonií sídlících napříč Severní Amerikou. Mezidruhové testování však odhalilo nedostatečnou rozmanitost genetické struktury populace, a to i přesto, že se jedná o migrující suchozemský druh. Populaci pelikánů severoamerických označili za panmiktickou, což je vzácný jev, který určuje neomezenou možnost křížení jakéhokoli jedince populace s jakýmkoli dalším jedincem opačného pohlaví. U žádného z lokusů však nebyla pozorována odchylka od Hardy-Weinbergovy rovnováhy, počet alel na lokus se vyskytoval v rozmezí od 4 do 19.

Úrovní toku genů mezi koloniemi pelikánů chilských (*P. thagus*) a rozmanitostí genetické struktury kolonií na severní a jižní hranici jejich rozšíření se zabývali Jeyasingham *et al.* (2013). V případě, že jsou jednotlivé kolonie specializované na určitou potravu, by měla být úroveň toku genů mezi jednotlivými koloniemi těchto pelikánů vysoká. Zato genetická rozmanitost kolonií žijících v severní a jižní oblasti by měla být slabá. Tuto hypotézu testovali autoři na DNA 83 jedinců pelikána chilského prostřednictvím 7 párů primerů navržených pro amplifikaci mikrosatelitů u dvou druhů pelikánů. Dva lokusy (PEL149 a PEL185) byly amplifikovány prostřednictvím párů primerů původně navržených pro amplifikaci mikrosatelitů pelikána bílého (de Ponte Machado *et al.*, 2009), zbylých 5 lokusů (PeEr02, PeEr03, PeEr05, PeEr07 a PeEr09) bylo amplifikováno pomocí primerů navržených pro amplifikaci mikrosatelitních lokusů u pelikána severoamerického (Hickman *et al.*, 2008). Průměrně našli 12 alel na lokus, nejvyšší počet byl 26, nejnižší 4. Nebyly odhaleny žádné významné odchylky od Hardy-Weinbergovy rovnováhy v rámci jednoho lokusu napříč koloniemi, ani v rámci jedné kolonie napříč všemi lokusy. Potvrdili tak hypotézu vykazující nízkou rozmanitost genetické struktury populace, nicméně úroveň toku genů neodhalili.

3.2.5.3 Cross-species testování mikrosatelitů u vybraných druhů rodu pelikán

Cross-species testování mikrosatelitů u pelikánů a jejich příbuzných druhů se na Katedře buněčné biologie a genetiky Univerzity Palackého v Olomouci věnuje také Laboratoř populační genetiky. Hledáním a charakteristikou mikrosatelitů pro pelikána bílého se ve 3 bakalářských (Buržáková, 2011; Hudzieczková, 2019 a Kremlová, 2019)

a 3 diplomových pracích (Ranochová, 2008; Mikulová, 2010 a Bartoňková, 2013) zabývalo kromě mě již dříve 5 studentek.

Ranochová (2008) se ve své diplomové práci zabývala hledáním polymorfních mikrosatelitů a jejím využitím při studiu paternity u pelikána afrického (*Pelecanus rufescens*) (7 jedinců), kadeřavého (*P. crispus*) (6 jedinců) a bílého (*P. onocrotalus*) (5 jedinců). U všech tří druhů provedla *cross-species* PCR amplifikaci za použití 62 párů primerů odvozených od vybraných zástupců čeledí kormoránovití, volavkovití, potápčkovití, ibisovití a čápoovití. U pelikána bílého navíc otestovala 35 párů primerů odvozených od zástupců z řádu pěvců. Celkově našla 7 polymorfních mikrosatelitů: u pelikána kadeřavého detekovala polymorfismus ve dvou případech, u pelikána afrického ve čtyřech a u pelikána bílého poskytlo polymorfni produkt celkem 7 párů primerů. Studentka doporučila otestovat a charakterizovat tyto mikrosatelitní lokusy na větším počtu nepříbuzných jedinců a s výjimkou mikrosatelitu WS μ 20, u kterého detekovala značný výskyt nulových alel, je označila jako potenciálně využitelné pro determinaci paternity výše zmíněných druhů pelikánů.

Buržáková (2011) hledala ve své bakalářské práci polymorfni mikrosatelitní lokusy, které by mohly být použitelné pro determinaci paternity u pelikána bílého a skvrnozobého (*P. philippensis*). Na DNA 6 jedinců obou těchto druhů otestovala po 137 párech primerů, které byly původně navrženy pro amplifikaci mikrosatelitů u vybraných zástupců čeledí čápoovití, volavkovití, plameňákovití, faetonovití, kormoránovití, terejovití a vybraných zástupců řádu vrubozobí. U pelikána bílého našla 20 polymorfních mikrosatelitních lokusů, u pelikána skvrnozobého detekovala polymorfismus u 9 lokusů. Jeden lokus u pelikána bílého a dva lokusy u pelikána skvrnozobého ovšem byly, z důvodu výskytu *stutter* bandů, nehodnotitelné. Celkem 26 párů primerů by tak mohlo být použito pro určování paternity.

Mikulová (2010) ve své diplomové práci testovala metodou *cross-species* PCR amplifikace 58 párů primerů původně navržných pro amplifikaci mikrosatelitů u vybraných zástupců čeledí kormoránovití, ibisovití, plameňákovití, pelikánovití a turovití na DNA čtyř druhů pelikánů (africkém, kadeřavém, bílém a skvrnozobém). Na DNA pelikána bílého a skvrnozobého pak testovala dalších 126 párů primerů původně odvozených od vybraných zástupců čeledí tučňákovití, čápoovití, terejovití, plameňákovití, fregatkovití, volavkovití, kormoránovití, ibisovití, alkovití a potápčkovití. Samostatně u pelikána bílého testovala dalších 13 párů primerů odvozených od kachny divoké, kajky mořské, kachnice laločnaté a pižmovky velké, které patří do řádu

vrubozobí. Studentka u pelikána bílého nově našla 39 polymorfních mikrosatelitních lokusů a u 10 mikrosatelitů původně odvozených od pelikána bílého polymorfismus potvrdila. U pelikána kadeřavého a afrického našla po 9 polymorfních lokusech. U pelikána skvrnozobého našla 31 polymorfních mikrosatelitů, které následně charakterizovala na DNA 17 jedinců tohoto druhu, čímž ověřila paternitu v chovné skupině zahrnující 11 mlád'at a 6 dospělců.

Bartoňková (2013) ve své diplomové práci navázala na výsledky bakalářské práce Buržákové (2011) a diplomových prací Ranochové (2008) a Mikulové (2010). Nejprve retestovala mikrosatelity poskytující polymorfní produkt ve výše zmíněných pracích u pelikána bílého a skvrnozobého. Dále retestovala mikrosatelity poskytující u těchto druhů produkt monomorfní, zároveň však u jiných druhů pelikánů poskytující produkt polymorfní. A v neposlední řadě otestovala *de novo* odvozené mikrosatelity od čápa východního a volavky rusohlavé. Celkem našla, ověřila a charakterizovala 82 párů primerů amplifikujících u pelikána bílého 84 polymorfních lokusů. U pelikána skvrnozobého našla 18 polymorfních mikrosatelitů. Všechny polymorfní lokusy charakterizovala prostřednictvím populačně-genetických programů, na základě kterých navrhla sadu lokusů využitelných pro ověřování paternity u výše zmíněných druhů.

Bakalářská práce Hudzieczkové (2019) se zabývala hledáním polymorfních mikrosatelitů u pelikána bílého. Pro *cross-species* PCR amplifikaci mikrosatelitů na DNA 6 jedinců tohoto druhu použila celkem 213 párů primerů, které byly původně navrženy pro amplifikaci mikrosatelitních lokusů u zástupců z řádů trubkonosí, dlouhokřídlí a pěvci. Téměř čtvrtina párů primerů poskytla polymorfní produkt. Pár primerů navržený pro amplifikaci mikrosatelitu Dc5 poskytl dva produkty.

Ve své bakalářské práci (Kremlová, 2019) jsem u pelikána bílého hledala polymorfní mikrosatelity prostřednictvím *cross-species* PCR amplifikace s použitím 173 párů primerů navržených pro amplifikaci mikrosatelitních lokusů u vybraných zástupců z řádu tučnáci a univerzálních ptačích mikrosatelitů. Otestováním těchto párů primerů na DNA 6 jedinců pelikána bílého jsem našla celkem 35 polymorfních lokusů amplifikovaných 34 páry primerů. Jeden pár primerů (TG13-016) nasedal na dvě místa DNA, a proto jsem u tohoto mikrosatelitu detekovala dva polymorfní produkty. Celkově jsem tedy našla 18 polymorfních lokusů původně izolovaných u tučňáků, 9 polymorfních EST ptačích mikrosatelitů a 7 polymorfních konzervovaných ptačích mikrosatelitů.

4 Materiál a metody

4.1 Biologický materiál

V rámci mé diplomové práce byla pro *cross-species* testování vybraných párů primerů, amplifikujících polymorfní mikrosatelitní lokus, použita DNA 21 nepříbuzných jedinců pelikána bílého (*Pelecanus onocrotalus*), pocházejících ze ZOO Jihlava, ZOO Lešná, ZOO Liberec, ZOO Plzeň a ZOO Praha. Jedincům byly odebrány vzorky krve. Fenol-chloroformovou izolační metodou byla z těchto vzorků vedoucím diplomové práce získána genomická DNA, která byla následně rozpuštěna v TE pufru. Koncentrace vyizolované DNA byla změřena pomocí spektrometru NanoDrop a dle potřeby naředěna deionizovanou vodou. Výsledná koncentrace vyizolované a naředěné DNA se pohybovala v rozmezí 5–50 µg·ml⁻¹.

4.2 Mikrosatelitní lokusy charakterizované u pelikána bílého

Pro analýzu a charakteristiku vybraných polymorfních mikrosatelitních lokusů byly použity páry primerů, které byly testovány metodou *cross-species* PCR na DNA 6 jedinců pelikána bílého v mé bakalářské práci (Kremlová, 2019) a zároveň byly vyhodnoceny jako primery amplifikující polymorfní mikrosatelitní lokus. 18 párů primerů bylo navrženo pro amplifikaci mikrosatelitů z řádu tučňáci, 9 pro amplifikaci EST ptačích mikrosatelitů a 7 pro amplifikaci konzervovaných ptačích mikrosatelitů. Všechny polymorfní mikrosatelitní lokusy jsou uvedeny v tabulkách č. 1 a 2.

Tabulka č. 1: Seznam 18 mikrosatelitních lokusů odvozených od zástupců z řádu tučňáci, které byly v mé bakalářské práci (Kremlová, 2019) u pelikána bílého vyhodnocené jako polymorfní. Tabulka zahrnuje název mikrosatelitního lokusu, zdrojový druh, od kterého lokus pocházel a literární zdroj, ve kterém byl lokus podrobně popsán.

Mikrosatelit	Zdrojový druh	Literární zdroj
Ech008		
Ech011		
Ech039	Tučňák žlutorohý (<i>Eudiptes chrysolophus</i>)	Ahmed <i>et al.</i> , 2009
Ech060		
Ech113		
Emm5	Tučňák nejmenší (<i>Eudiptula minor</i>)	Billing <i>et al.</i> , 2007
Emm6		

Tabulka č. 1: Pokračování.

Mikrosatelit	Zdrojový druh	Literární zdroj
Em8		
Em14	Tučňák nejmenší (<i>Eudyptula minor</i>)	Grosser <i>et al.</i> , 2015
Em21		
Em23		
AM13	Tučňák kroužkový (<i>Pygoscelis adeliae</i>)	Roeder <i>et al.</i> , 2001
PNN05	Tučňák brýlový (<i>Spheniscus demersus</i>)	Labuschagne <i>et al.</i> , 2013
Sh2Ca21	Tučňák Humboldtův (<i>Spheniscus humboldti</i>)	Schlosser <i>et al.</i> , 2003
Sh2Ca49		Schlosser <i>et al.</i> , 2009
M1-11	Tučňák magellanský (<i>Spheniscus magellanicus</i>)	Akst <i>et al.</i> , 2002
Pygantarc11	Tučňák uzdičkový (<i>Pygoscelis antarctica</i>)	Kang <i>et al.</i> , 2015
Pygantarc19		

Tabulka č. 2: Seznam 9 EST ptačích mikrosatelitních lokusů a 8 konzervovaných ptačích mikrosatelitních lokusů, které byly v mé bakalářské práci (Kremlová, 2019) u pelikána bílého vyhodnocené jako polymorfní včetně CAM24, který byl vyhodnocen jako monomorfní. Tabulka zahrnuje název mikrosatelitního lokusu, zdroj a literární zdroj.

Mikrosatelit	Zdroj	Literární zdroj
TG01-114		
TG01-148		
TG03-031		
TG03-098		
TG04-012	EST ptačí mikrosatelity	Dawson <i>et al.</i> , 2010
TG04-061		
TG08-24 (1)		
TG13-016		
TG13-017		
CAM03		
CAM05		
CAM11		
CAM17	Konzervované ptačí mikrosatelity	Dawson <i>et al.</i> , 2013
CAM19		
CAM20		
CAM23		
CAM24		

4.3 PCR amplifikace DNA

Genomická DNA 21 nepříbuzných jedinců pelikána bílého byla postupně amplifikována prostřednictvím 34 párů primerů. Postup přípravy vzorku pro amplifikaci je následující:

1. Složky reakční směsi (viz tabulka č. 3) nechat rozmrazit, zvortexovat, zcentrifugovat a napipetovat je v uvedeném pořadí do 1,5 ml mikrozkušavky, následně směs zvortexovat a zcentrifugovat.

Tabulka č. 3: Složení PCR reakční směsi pro 21 vzorků DNA pelikána bílého (včetně připočítaných rezerv).

Složka reakční směsi	Koncentrace zásobního roztoku	Finální koncentrace v reakční směsi	Objem složek pro 21 vzorků [μl]
H ₂ O	-	-	177,0
Reakční pufr	10x	1x	26,8
MgCl ₂	25 mmol·l ⁻¹	1,6 mmol·l ⁻¹	16,0 ^Δ
dNTPs	20 μmol·l ⁻¹	0,2 μmol·l ⁻¹	2,8
Primer F	10 μmol·l ⁻¹	0,5 μmol·l ⁻¹	13,2
Primer R	10 μmol·l ⁻¹	0,5 μmol·l ⁻¹	13,2
<i>aTaq</i> DNA polymeráza	5 U·μl ⁻¹	20 U/reakce	4,0

^Δ dle potřeby snížit objem MgCl₂ na ³/₄ nebo ²/₃ a navýšit objem vody tak, aby celkový objem reakční směsi zůstal stejný (viz kapitola Výsledky)

2. Osmikanálovou pipetou rozpipetovat po 1 μl DNA všech 21 jedinců do předem označených PCR mikrozkušavek. Připravenou PCR reakční směs rozpipetovat po 9 μl do jednotlivých PCR mikrozkušavek k DNA.
3. PCR mikrozkušavky se vzorky důkladně uzavřít, umístit do termocykléru a nechat amplifikovat dle předem nastaveného teplotního a časového profilu reakce (viz tabulka č. 4).

Tabulka č. 4: Teplotní a časový profil PCR reakce.

Krok PCR	Teplota [°C]	Doba trvání	Počet cyklů
Úvodní denaturace	94	5 min	1
Denaturace	94	30 s	35
<i>Annealing</i>	^{ΔΔ}	30 s	
Elongace	72	30 s	1
Finální elongace	72	7 min	

^{ΔΔ} pro jednotlivé páry primerů použít takové T_a, které byly optimalizovány v mé bakalářské práci (Kremlová, 2019), dle potřeby dále upravit (viz kapitola Výsledky)

4.4 Elektroforetická separace PCR produktů

Pro separaci PCR produktů byl připraven 6% denaturující polyakrylamidový gel. Rozměry skel, mezi které byl gel nalit, činily 330 x 390 mm (malé sklo) a 330 x 420 mm (velké sklo), tloušťka gelu byla 0,4 mm. PCR produkty rozseparované ve vyhřívané sekvenační elektroforetické komůrce S2 (Whatman Biometra) byly následně vizualizovány dusičnanem stříbrným. Celý postup probíhal následovně:

Ošetření skel

1. Plochy obou skel, které budou následně v kontaktu s gelem, omýt 2x deionizovanou vodou, 2x 96% ethanolem a osušit papírovými ubrousky.
2. Na ošetřenou plochu velkého skla nanést přípravek odpuzující vodu (RainOff) a dobře jej rozetřít. Po cca 5 minutách omýt tuto plochu 2x deionizovanou vodou a osušit papírovými ubrousky.
3. Obě skla přemístit do digestoře a položit je na polystyrenové desky. Na ošetřenou plochu malého skla, ke které následně přilne gel, nanést roztok obsahující 3 μ l 3-methakryloxypropyltrimethoxysilanu rozpuštěného v 1 ml roztoku 0,5% kyseliny octové v 96% ethanolu. Po cca 5 minutách omýt tuto plochu 4x 96% ethanolem a osušit papírovými ubrousky.
4. K okrajům velkého skla umístit dva spacery. Malé sklo přiložit ošetřenou stranou dolů a spacery zarovnat podél hran skel. V místě spacerů sepnout skla svorkami.

Příprava 6% roztoku polyakrylamidového gelu

1. Ve válci odměřit a do kádinky přelít 60 ml pracovního roztoku akrylamidu : N, N' - methylenbisakrylamidu. Mikropipetou přidat 40 μ l N, N, N', N' - tetramethylethylendiaminu a 400 μ l 10% roztoku peroxidisíranu amonného. Krouživými pohyby směs opatrně promíchat.
2. Za současného poklepávání na sklo vyplnit prostor mezi skly připraveným 6% roztokem polyakrylamidového gelu.
3. Hřebínek zasunout rovnou stranou do prostoru mezi skly do hloubky cca 0,5 cm od okraje malého skla. Obě skla sepnout svorkami v místě hřebínku.
4. Takto připravený gel nechat tuhnout po dobu jedné hodiny.

Elektroforetická separace

1. Po ztuhnutí gelu svorky odstranit, skla namočit a s použitím kartáče se zbavit zbytků gelu. Vnější plochu malého skla opláchnout deionizovanou vodou a osušit pomocí ubrousků do sucha.
2. Skla s gelem umístit do sekvenační elektroforetické komůrky hřebínkem nahoru a připevnit je prostřednictvím šroubů tak, aby mezi vnější plochou malého skla a hliníkovou deskou komůrky nebyla mezera. Do horního (katodového) a dolního (anodového) prostoru komůrky nalít 0,5x TBE pufr.
3. Vyjmout hřebínek a vzniklý prostor mezi skly vypláchnout pomocí injekční stříkačky a pufru od případných zbytků gelu.
4. Katodový i anodový prostor elektroforetické aparatury uzavřít a připojit ke zdroji stejnosměrného elektrického proudu nastaveného na výkon 90 W, napětí nastavit na 3 000 V a proud na 150 mA.
5. Během nahřívání gelu přidat ke každému z PCR produktů 5 μ l nanášecího pufru. Přibližně 2 minuty před ukončením nahřívání vložit vzorky do termocykléru a nechat je po dobu tří minut denaturovat (94 °C). Po skončení denaturace umístit vzorky ihned do nádoby s ledem.
6. Po 30 minutách nahřívání gelu vypnout zdroj elektrického proudu, odpojit elektrody a pomocí injekční stříkačky a pufru vyčistit prostor mezi skly od zbytků gelu, močoviny a vzduchových bublin. Zoubky hřebínku zasunout do gelu cca 1 mm hluboko.
7. Do prostoru mezi zoubky hřebínku nanést osmikanálovou pipetou po 2 μ l každého vzorku.
8. Katodový prostor elektroforetické aparatury opět uzavřít a připojit ke zdroji elektrického proudu. Vzorky nechat separovat po dobu 90–180 minut při snížené hodnotě výkonu na 70 W.
9. V průběhu separace vzorků připravit roztoky pro vizualizaci gelu (viz Použité roztoky a jejich příprava):
 - Fix/stop roztok
 - 1% roztok kyseliny dusičné
 - 0,1% roztok dusičnanu stříbrného
 - Vývojku

10. Po dokončení elektroforetické separace vypnout a odpojit zdroj stejnosměrného elektrického proudu, uvolnit šroub odtoku pufry z katodového prostoru a šrouby fixující skla s gelem v aparatuře.
11. Uvolněná skla s gelem přemístit z aparatury na vodorovnou plastovou podložku. Vyjmout oba spacersy a skla od sebe opatrně oddělit pomocí čepele nože.

Vizualizace gelu

1. Malé sklo přemístit do první fotomisky přichyceným gelem nahoru, položit na třepačku a zalít fix/stop roztokem. Po 20 minutách působení roztok slít zpět do baňky. Sklo s gelem promýt 3x po dvou minutách deionizovanou vodou.
2. Fotomisku s gelem umístit opět na třepačku a zalít 1% roztokem kyseliny dusičné. Roztok po uplynutí čtyř minut vylít do odpadu a sklo s gelem promýt 4x po dvou minutách deionizovanou vodou.
3. V průběhu promývání přidat 1 200 μl formaldehydu k 0,1% roztoku dusičnanu stříbrného. Sklo s gelem přemístit do druhé fotomisky a nechat na něj působit tento roztok.
4. Během působení dusičnanu stříbrného naplnit třetí fotomisku deionizovanou vodou. Těsně před uplynutím 30 minut přidat k vychlazené vývojce 1 200 μl formaldehydu a 160 μl 1% roztoku thiosíranu sodného.
5. Po uplynutí doby působení slít roztok dusičnanu stříbrného zpět do zásobní láhve, gel vyjmout a ponořit jej na 5 sekund do fotomisky naplněné deionizovanou vodou.
6. Sklo s gelem následně přemístit do čtvrté fotomisky a zalít připraveným roztokem vývojky.
7. Gel se zřetelně šedě zbarvenými PCR produkty zalít fix/stop roztokem a zastavit tak jeho dobarvování. Po vyšumění vyvíjejících se bublin CO_2 vylít roztoky do odpadu a gel přemístit do fotomisky s deionizovanou vodou.
8. Sklo s gelem popsat po okapání v místě spaceru, umístit jej do sušárny a nechat jej přibližně jednu hodinu sušit. Vysušený gel vyhodnotit na negatoskopu a naskenovat do počítače.
9. Sklo s nepotřebným gelem namočit na několik hodin do 1 $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ roztoku hydroxidu sodného, následně omýt saponátem a deionizovanou vodou k opakovanému použití.

Vyhodnocení získaných výsledků a jejich softwarové zpracování

Vedoucím diplomové práce byl každému lokusu všech 21 jedinců přiřazen genotyp, tzn. pro každý lokus byla číselně určena konstituce alel (č. 1–x). Kde alela č. 1 byla nejpomaleji migrující alelou, tzn. vyskytovala se neblíže hornímu okraji gelu. Číslování zbývajících alel se odvíjelo dle jejich celkového počtu u všech zbývajících jedinců. Jedinec s přítomností pouze jedné alely byl vyhodnocen pro danou alelu jako homozygot.

Všechny genotypy všech jedinců byly převedeny z formátu .xlsx (MS Office Excel) do formátu .csv a následně analyzovány populačně-genetickými programy. Odchylky od Hardy-Weinbergovy rovnováhy, informace o heterozygotnosti a frekvenci výskytu nulových alel byly získány s použitím programu Cervus 3.0.7 (Kalinowski *et al.*, 2007). Informace o vazebné nerovnováze (tzn. zda jsou lokusy ve vazbě) byly stanoveny pomocí programu Genepop 4.7.5 (Rousset, 2008).

4.5 Použité chemikálie

- Akrylamid (Serva)
- *aTaq* DNA polymeráza ($5 \text{ U} \cdot \mu\text{l}^{-1}$), M1241 (Promega)
- Bromfenolová modř (Serva)
- Deionizovaná voda
- Deoxyribonukleosid trifosfáty (dNTPs) ($100 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$, $400 \mu\text{l}$ každého), U1240 (Promega)
- Dusičnan stříbrný (Sigma)
- Ethanol (96% roztok) (Lihovar Vrbátky)
- Ethylendiaminotetraoctan sodný (Na_2EDTA) (Lachner)
- Formaldehyd (Lachner)
- Formamid (Lachner)
- Hydroxid sodný (Lachner)
- Chlorid draselný (Lachema)
- Chlorid sodný (Lachema)
- Kyselina boritá (Lachema)
- Kyselina dusičná (65% roztok) (Lachner)
- Kyselina octová (Lachner)
- Laurylsíran sodný (SDS) (Lachema)

- 3-methakryloxypropyltrimethoxysilan (Serva)
- Močovina (Lachner)
- N, N' - methylenbisakrylamid (Serva)
- N, N, N', N' - tetramethylethyldiamin (TEMED) (AppliChem)
- Peroxodisíran amonný (APS) (Lachner)
- Tekuté stěrače Rain Off (Sheron)
- Thiosíran sodný (Na₂S₂O₃) (Lachema)
- Trishydroxymethylaminomethan (Tris) (AppliChem)
- Triton X-100 (Ambresco)
- Uhličitan sodný (Na₂CO₃) (Lachema)
- Xylenová modř (Xylencyanol FF) (AppliChem)

4.6 Použité roztoky a jejich příprava

6% zásobní roztok akrylamidu

- 420 g močoviny
- 484 ml deionizované vody
- 50 ml 10x TBE
- 150 ml 40% zásobního roztoku akrylamidu : N, N'- methylenbisakrylamid (v poměru 19:1)
- Po rozpuštění všech složek roztok zfiltrovat a uchovat v tmavé láhvi a chladu (4 °C)

0,1% roztok dusičnanu stříbrného

- 0,8 g dusičnanu stříbrného
- 800 ml deionizované vody
- Před použitím roztoku přidat 1,2 ml formaldehydu

Fix/stop roztok

- 88 ml ledové kyseliny octové
- 800 ml deionizované vody

Roztok 3-methakryloxypropyltrimethoxysilanu

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

Nanášecí pufr

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

1 mol·l⁻¹ roztok hydroxidu sodného

- 40 g hydroxidu sodného rozpustit v 1 l deionizované vody

1% roztok kyseliny dusičné

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

10% roztok peroxodisíranu amonného

- 1 g peroxodisíranu amonného rozpustit v 10 ml deionizované vody
- Roztok uchovat v chladu (4 °C)

6% roztok polyakrylamidového gelu

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

10x reakční pufr pro PCR

- 1,211 g trishydroxymethylaminomethanu
- 80 ml deionizované vody
- 3,73 g chloridu draselného
- 1 ml Triton X-100
- Přidáním HCl upravit pH roztoku na hodnotu 9,0 a doplnit do 100 ml

10x zásobní roztok TBE pufu

- 108 g trishydroxymethylaminomethanu
- 55 g kyseliny borité
- 40 ml 0,5 mol·l⁻¹ roztoku ethylendiaminotetraoctanu sodného (pH 8,0)
- Rozpustit v 800 ml deionizované vody, poté doplnit do 1 l

Vývojka (3% roztok uhličitanu sodného)

- 800 ml deionizované vody
- 24 g uhličitanu sodného

- Vývojku vychladit na 4 °C, před použitím přidat 1,2 ml formaldehydu a 160 µl 1% roztoku 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)
- Mikropipeta osmikanálová Finnpiette 0,5–10 µl (Thermo Labsystems)
- Mikropipety Finnpiette 0,3 µl–1 ml (Thermo Labsystems)
- Mikropipety Nichipet EX 0,5 µl–1 ml (Nichiryo)
- Minicentrifuga CLE CSQSP (Clever Scientific)
- Minicentrifuga Prism mini (Labnet International)
- Negatoskop NEGA1 (Maneko)
- Sekvenační elektroforetická komůrka S2 (Whatman Biometra)
- Spektrofotometr NanoDrop ND-1000 (Thermo Scientific)
- Sušárna CAT 8050 (Contherm)
- Termocyklér Gene-Pro (BIOER Technology)
- Termocyklér PTC 100-96 VHB (MJ Research)
- Termocyklér XP Thermal Cyclers (BIOER Technology)
- Třepačka Orbit 1 900 (Labnet International)
- Vortex mixer (Labnet International)
- Vortex MS2 (Ika)
- Výrobník deionizované a ultračisté vody typ 02 (AquaOsmotic)
- Výrobník ledu (Brema Ice Makers)

5 Výsledky

V experimentální části této diplomové práce jsem provedla analýzu a charakteristiku vybraných mikrosatelitních lokusů, které jsem v mé bakalářské práci (Kremlová, 2019) označila za polymorfní. Dále jsem retestovala a charakterizovala lokus CAM24, který jsem v bakalářské práci označila za monomorfní.

Ve své bakalářské práci jsem testováním 173 párů primerů u 6 nepříbuzných jedinců pelikána bílého detekovala polymorfismus u 18 mikrosatelitních lokusů, které pocházely od zástupců z řádu tučňáci, u 9 EST ptačích mikrosatelitů a 7 konzervovaných ptačích mikrosatelitů. U 6 jedinců pelikána bílého jsem amplifikací se 34 páry primerů získala 35 polymorfních mikrosatelitních lokusů, neboť pár primerů amplifikující lokus TG13-016, který byl původně navržený pro amplifikaci EST ptačího mikrosatelitu, poskytl dva polymorfní produkty (Kremlová, 2019).

Při hledání polymorfních lokusů jsem ve své bakalářské práci (Kremlová, 2019) otestovala také mikrosatelitní lokus AM13, který byl již dříve testován a vyhodnocen jako polymorfní v bakalářské práci Mikulová (2010). Tento lokus byl u pelikána bílého následně charakterizován v diplomové práci Bartoňková (2013). Ale protože Bartoňková (2013) takto charakterizovala pouze jeden mikrosatelit pocházející od zástupce z řádu tučňáků, zahrnula jsem i já tento mikrosatelit do následujících analýz, které jsem provedla společně se všemi mikrosatelity od zástupců z řádu tučňáci, které byly v laboratoři k dispozici.

DNA 21 nepříbuzných jedinců pelikána bílého (*Pelecanus onocrotalus*) jsem postupně amplifikovala za použití výše zmíněných 34 párů primerů, přičemž jsem pro počáteční PCR amplifikaci použila takové teploty *annealingu* (T_a), které jsem zoptimalizovala v bakalářské práci. Produkty PCR jsem následně podrobila polyakrylamidové elektroforetické separaci za denaturujících podmínek. Použila jsem takové délky separací, které jsem taktéž v mé bakalářské práci (Kremlová, 2019) uvedla jako finální.

Na základě výsledků elektroforézy jsem však u některých mikrosatelitů upravovala teplotu *annealingu* PCR, délku elektroforetické separace, případně také koncentraci hořčičných iontů v PCR reakční směsi. V případě, že některý z párů primerů neposkytl žádný produkt nebo byl produkt málo zřetelný, snížila jsem jeho T_a o 3–5 °C. V opačném případě, kdy byl produkt špatně hodnotitelný z důvodu přítomnosti silného PCR produktu, jsem T_a zvýšila. Konečná teplota *annealingu* všech párů primerů se

pohybovala v rozmezí od 48 do 66 °C. Délku elektroforetické separace jsem upravila tak, aby byly jednotlivé alely určitého lokusu od sebe snadno odlišitelné. Všechny PCR produkty jsem separovala v rozmezí od 90 do 180 minut. U problematicky hodnotitelných mikrosatelitních lokusů, které poskytovaly při PCR amplifikaci silný produkt, avšak při zvýšení teploty *annealingu* již produkt neposkytly, jsem snižovala koncentraci hořčičných iontů, a to snížením jejich objemu pipetovaného do PCR reakční směsi: u sedmi reakčních směsí (s páry primerů pro amplifikace mikrosatelitů Emm5, Em14, Sh2Ca21, TG04-012, CAM05, CAM17 a CAM20) jsem snížila koncentraci (objem) hořčičných iontů na $3/4$, u TG04-061 jsem snížila koncentraci (objem) na $2/3$. Vzniklý deficit objemu jsem dle potřeby doplnila deionizovanou vodou tak, aby výsledný objem reakční směsi zůstal nezměněn.

Polymorfní produkt poskytlo celkem 33 párů primerů. Bohužel kvůli výskytu extrabandů byl polymorfní lokus CAM05 nehodnotitelný, z další analýzy jsem jej proto vyřadila a dále už jej nebudu uvádět. Jeden pár primerů, původně navržený pro amplifikaci mikrosatelitního lokusu M1-11, který v mé bakalářské práci (Kremlová, 2019) poskytoval polymorfní produkt se dvěma alelami, při testování na 21 jedincích pelikána bílého polymorfní produkt neposkytl. Tento mikrosatelit jsem tedy v mé bakalářské práci chybně označila jako polymorfní. Polymorfismus jsem nyní nepotvrdila ani u lokusu CAM23, u kterého jsem ve své bakalářské práci (Kremlová, 2019) detekovala 2 alely. Retestováním původně monomorfního lokusu CAM24 na DNA 21 jedinců pelikána bílého jsem detekovala 5 alel. Dále jsem zjistila, že jeden mikrosatelit (TG13-016), který měl dle bakalářské práce dvě místa polymorfismu, má dokonce tři polymorfní oblasti.

Celkově jsem tedy amplifikací za použití 32 párů primerů u pelikána bílého získala 34 polymorfních lokusů. Na základě zjištěných alelových konstitucí všech polymorfních lokusů u 21 nepříbuzných jedinců tohoto druhu jsem tyto lokusy analyzovala a charakterizovala prostřednictvím populačně-genetických programů Cervus 3.0.7 (Kalinowski *et al.*, 2007) a Genepop 4.7.5 (Rousset, 2008). Získala jsem tak informace o Hardy-Weinbergově rovnováze jednotlivých lokusů, heterozygotnosti, frekvenci výskytu nulových alel (viz Tabulka č. 5) a v neposlední řadě také o případné vazbě mezi lokusy.

Tabulka č. 5: Charakteristika 34 polymorfních lokusů (amplifikovaných 32 páry primerů) genotypovaných u 21 nepříbuzných jedinců pelikána bílého. V tabulce je uveden název lokusu s příslušným *Accession number* uvedeným v databázi GenBank, zdrojový druh, sekvence primerů, teplota *annealingu* (T_a) s případným označením snížené koncentrace $MgCl_2$, délka separace (t_s), počet vyhodnocených alel (N), případná odchylka od Hardy-Weinbergovy rovnováhy (HW) a frekvence výskytu nulových alel (f).

Název lokusu (GenBank Acc. No.)	Zdrojový druh	Sekvence primerů (5'→3')	Jednotka repetice	T_a [°C]	t_s [min]	N	HW	f [%]
Ech008 (FM878339)		F: TGGGAAGCGTAACGGCCTAA R: TCAGTCACTCTCCCATTTTGTAGGG	CA	63	90	5	NS	21,37
Ech011 (FM878342)		F: CACAGCACTGTGACAGAAGCA R: TTAAGTGGTTCGATTTGTCAGTCTTT	GT	65	120	2	ND	-
Ech039 (FM878370)	<i>Eudyptes chrysolophus</i>	F: TCTTCCCAGGCAAGGAATAAC R: CTCTGACTAATTGCTAAGAAATACTCCTG	TTTCT	48	90	5	NS	-
Ech060 (FM878391)		F: CATGTTGGGTTGCAGAAGC R: AACAGACTGTAACTACTATCAAGGTATATCATC	TG	63	150	6	NS	-
Ech113 (FM878444)		F: TGTGTTTACATTCAATCCATCAATGC R: GCAGGTAGGAACATTAAGTGAACCTTG	GT	59	165	4	*	54,70
Emm5 (DQ837733)	<i>Eudyptula</i>	F: ATTAAGTGGCCTTGGGTTTC R: TTTATGCTCCCTCATTCCAC	CTTT	54**	90	4	NS	-
Emm6 (DQ837734)	<i>minor</i>	F: TTGTTGGTCTGTATCACAAGG R: CAGGGAAGTGTGTCAGTAAATGG	CT	60	90	2	***	99,91

Legenda:

** $3/4x MgCl_2$

ND lokus nelze vyhodnotit, zda je nebo není v souladu s HW rovnováhou

NS lokus je v souladu s HW rovnováhou

* signifikantní odchylka od HW rovnováhy na hladině významnosti 5 %

*** signifikantní odchylka od HW rovnováhy na hladině významnosti 0,1 %

Tabulka č. 5: Pokračování 1.

Název lokusu (GenBank Acc. No.)	Zdrojový druh	Sekvence páru primerů (5'→3')	Jednotka repetice	T _a [°C]	t _s [min]	N	HW	f [%]
Em8 (KM272226)		F: GGTGCTGGGAGATGGCTTC R: ACGAAATGGTTTGGCTGGTG	AGAT	63	90	7	NS	-
Em14 (KM272230)	<i>Eudyptula minor</i>	F: CAGGAGTGAACCCAAAGCTG R: AGGTACCGAGGAAGCAAAG	CAA	63**	165	3	NS	5,48
Em21 (KM272232)		F: CCACATTCATCCACAGGCAG R: CCTCGCAGGGAATATTTGGC	CT	63	90	2	NS	-
Em23 (KM272234)		F: GATGCATGTGGAGGAAGTGC R: GGCAACATGGTAGCTGACAC	CA	63	140	4	NS	19,86
AM13 (AF131243)	<i>Pygoscelis adeliae</i>	F: TTTTCCCATCTCTCTCCTG R: CAGTTTTCAACAATCCTTCC	CT/GC	59	90	3	NS	1,18
PNN05 (JX494405)	<i>Spheniscus demersus</i>	F: CAGTGACAGGCAAGGGTCTTAT R: TGAGTAAGCAATGAGTTGGCAC	TG	64	165	4	NS	20,92
Sh2Ca21 (AF540011)	<i>Spheniscus humboldti</i>	F: AAAATAAAGCCTATACACAACAGG R: GTGCACTTAATGGGGTGTATG	CA	59**	90	2	ND	-
Sh2Ca49 (AY435089)		F: GCTTTTCCACCAGCTCTTCC R: TTCTGTTCAAAGCGTGGTTG	CA	60	90	3	NS	10,46
Pygantarc11 (KP316215)	<i>Pygoscelis antarctica</i>	F: GGGGGAGTGCATATCAGAAA R: CATCAAAGAATTCGCCTTGG	AT	60	90	2	ND	-
Pygantarc19 (KP316219)		F: GTATTCCCATGCAGGCTTTG R: CAAGCGTGTTTTTGTGTTGCT	ACAGAT	64	120	2	ND	-

Legenda:

** ³/₄X MgCl₂

ND lokus nelze vyhodnotit, zda je nebo není v souladu s HW rovnováhou, NS lokus je v souladu s HW rovnováhou

Tabulka č. 5: Pokračování 2.

Název lokusu (GenBank Acc. No.)	Zdroj	Sekvence páru primerů (5'→3')	Jednotka repetice	T _a [°C]	t _s [min]	N	HW	f [%]
TG01-114 (CK301583)		F: TTGAAACATTGTGAAGCAG R: CAGATAGTGTCATAACAATACTTTTC	AT/AA	57	120	2	ND	-
TG01-148 (CK301512)		F: TTGCAACACATTCTAATATTGC R: TTAAAGTACATCAAACAACAAAATC	AT/AA	50	90	2	ND	-
TG03-031 (CK312587)		F: ATTGCACATGAACCTGGAAG R: TCATTACTTGAAGCAGGTCTCTG	AT/TT	60	165	2	ND	-
TG03-098 (DV573670)		F: TTTGCCTTAATTCTTACCTCATTG R: TTGCAACCTCTGTGGAAGC	AG/AA	63	180	7	NS	-
TG04-012 (CK306810)	EST ptačí mikrosatelity	F: TGAATTTAGATCCTCTGTTCTAGTGTC R: TTACATGTTTACGGTATTTCTCTGG	GT/CT	60**	120	8	NS	-
TG04-061 (CK235034)		F: GACAATGGCTATGAAATAAATTAGGC R: AGAAGGGCATTGAAGCACAC	A/GA	61***	170	7	NS	-
TG08-24(1) (CK314428)		F: CCCACAAATCCTGAATTCATATC R: ACTGGCTTATAAAGTCCATGGTGG	AT/AG/AA	62	90	4	ND	8,68
TG13-016 (CK308822)		F: GATTGCTGAGGCTTGATTGC R: GCCTACGGCTTTATTTACTTGC	A/C/AA/CA/GA	54	150	3	NS	53,00
					90	4	NS	32,96
						2	ND	-
TG13-017 (CK313422)		F: GCTTTGCATCTTGCCTTAAA R: GGTA ACTACAACATTC CA ACTCCT	AT	57	165	4	NS	3,04

Legenda:

** ³/₄x MgCl₂, *** ²/₃x MgCl₂

ND lokus nelze vyhodnotit, zda je nebo není v souladu s HW rovnováhou

NS lokus je v souladu s HW rovnováhou

Tabulka č. 5: Pokračování 3.

Název lokusu (GenBank Acc. No.)	Zdroj	Sekvence páru primerů (5'→3')	Jednotka repetice	T _a [°C]	t _s [min]	N	HW	f [%]
CAM03 (HG518761)	Konzervované ptačí mikrosatelity	F: ATTAGCATAGCTCAGCATTGCC R: CGAGCATTCAAMCCTGTCATC	TG	62	90	2	ND	-
CAM11 (HG518769)		F: TGGTACAGGGACAGCAAACC R: AGATGCTGRGAGCGGATG	GT	65	90	3	NS	29,04
CAM17 (HG518775)		F: CGGGTTGTAATCAAGAAGATGC R: CTGCGGAGCAATTAACGC	TG	58**	150	7	NS	12,61
CAM19 (HG518777)		F: TCTTGGAGGCAGATARGAAGTG R: GAGCAAGCAAAGATCACAAGC	GT	66	120	2	ND	-
CAM20 (HG518778)		F: TAACAGGCAGGAATGCAGG R: TCAGCCAGTGTGGAGGTC	AT	51**	120	2	ND	0,51
CAM24 (HG518782)		F: CCCACTTCAGTCTTCAGAGC R: TGGAGTATTTGGGATTGGAG	CA	59	90	5	NS	-

Legenda:

** ³/₄x MgCl₂

ND lokus nelze vyhodnotit, zda je nebo není v souladu s HW rovnováhou

NS lokus je v souladu s HW rovnováhou

U analyzovaných mikrosatelitních markerů jsem detekovala od 2 do 8 alel. Nejvíce alel jsem našla u lokusu TG04-012 (8 alel). Nejnížší počet alel na lokus (2) jsem detekovala u mikrosatelitů Ech011, Emm6, Sh2Ca21, Em21, Pygantarc11, Pygantarc19, TG01-114, TG01-148, TG03-031, CAM03, CAM19, CAM20 a u třetí polymorfni oblasti mikrosatelitu TG13-016.

U pelikána bílého jsem našla 32 párů primerů amplifikujících polymorfni produkt, z nichž jeden pár primerů poskytl tři polymorfni produkty, tj. našla jsem 34 polymorfni lokusů. Z těchto 32 párů primerů amplifikujících polymorfni produkt bylo 5 navrženo pro amplifikaci mikrosatelitního lokusu nalezeného u tučňáka žlutorohého, 6 pro amplifikaci lokusu nalezeného u t. nejmenšího, po jednom páru primerů navrženo pro amplifikaci lokusu nalezeného u t. kroužkového a brýlového a po dvou párech primerů navrženo pro amplifikaci mikrosatelitního lokusu u t. Humboldtova a uzdičkového. Další 9 párů primerů bylo navrženo pro amplifikaci EST ptačích mikrosatelitů a 6 pro amplifikaci konzervovaných ptačích mikrosatelitů.

U mnou nalezených 34 polymorfni lokusů charakterizovaných u 21 jedinců pelikána bílého bylo prostřednictvím programu Cervus 3.0.7 (Kalinowski *et al.*, 2007) nalezeno v průměru 3,7 alel na lokus a průměrná očekávaná heterozygotnost byla 0,4777. Dále byla zjištěna pravděpodobnost chybného provedení paternitní analýzy: pravděpodobnost, že by mládě bylo nesprávně přiřazeno prvnímu z rodičů za předpokladu, že neznám ani jednoho rodiče, je $2,18 \cdot 10^{-3}$, pravděpodobnost, že by mládě bylo nesprávně přiřazeno druhému z rodičů za předpokladu, že již znám prvního rodiče, je $6,34 \cdot 10^{-6}$, pravděpodobnost, že by mládě bylo přiřazeno nesprávnému rodičovskému páru, je $1,55 \cdot 10^{-9}$. Pravděpodobnost, že dva náhodně zvolení jedinci budou mít stejnou alelovou konstituci na všech lokusech, je $1,00 \cdot 10^{-18}$ a pravděpodobnost, že dvě náhodně zvolená mláďata budou mít stejnou konstituci alel na všech nalezených lokusech, je $1,00 \cdot 10^{-8}$.

Pro detekci možné vazby mezi dvěma náhodně vybranými polymorfni lokusy jsem použila program Genepop 4.7.5 (Rousset, 2008). Na základě vypočtené hodnoty pravděpodobnosti (*p*-value) bylo zjištěno, že lokusy Ech113 a TG04-012 jsou ve vazbě. V případě, že by se tyto lokusy používaly pro potenciální studium populačně-genetických vztahů, nebylo by vhodné používat oba tyto lokusy v rámci jedné studie. Z celkového počtu 34 polymorfni lokusů charakterizovaných v této práci bylo 33 z nich vzájemně nezávislých.

Na základě alelových konstitucí 34 polymorfních lokusů, amplifikovaných 32 páry primerů na DNA 21 jedinců pelikána bílého, jsem u 2 lokusů detekovala vazbu na pohlaví. Jednalo se o lokusy Ech113 a první polymorfní oblast lokusu TG13-016 (oblast s nejtěžšími produkty). Možnou vazbu na pohlaví jsem stanovila také u lokusů Emm6 a TG03-031, ale jelikož první z dvojice nemá u žádného z 21 testovaných jedinců heterozygotní genotyp a druhý má heterozygotní genotyp pouze u jednoho z 21 testovaných jedinců, je u obou těchto lokusů vazba na pohlaví málo pravděpodobná.

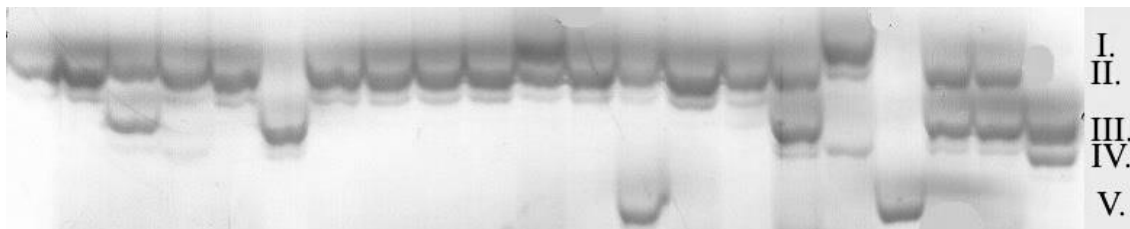
Oba nalezené na pohlaví vázané mikrosatelitní lokusy vykazovaly vazbu na pohlavní chromozom Z, neboť se všechny samice při genotypizační analýze jevily jako homozygotní. Ve skutečnosti však byly hemizygotní a to z toho důvodu, že samice mají pouze jeden chromozom Z (tj. ZW), samci pak byli homozygoti nebo heterozygoti (tj. ZZ nebo ZW).

Z celkového počtu 34 polymorfních lokusů zahrnutých do analýzy bylo 20 lokusů v souladu s Hardy-Weinbergovou rovnováhou, v tabulce č. 5 jsou tyto lokusy označeny NS. U 12 z 34 polymorfních a do analýzy zahrnutých lokusů nebyl program Cervus 3.0.7 (Kalinowski *et al.*, 2007) schopen určit, zda jsou v Hardy-Weinbergově rovnováze, v tabulce č. 5 jsou tyto lokusy označeny jako ND. Jednalo se převážně o lokusy se dvěma alelami, v jednom případě se jednalo o lokus se čtyřmi alelami. U lokusu Ech113 byla zjištěna signifikantní odchylka od Hardy-Weinbergovy rovnováhy na hladině významnosti 5 %, u lokusu Emm6 byla tato odchylka na hladině významnosti 0,1 %. U obou těchto lokusů byly zjištěny vysoké frekvence výskytu nulových alel. U lokusu Emm6 se nulové alely vyskytují téměř se 100% pravděpodobností. U lokusu Ech113 činila pravděpodobnost výskytu nulových alel necelých 55 %. U 19 lokusů program nezaznamenal možný výskyt nulových alel, u 5 lokusů byla frekvence výskytu nulových alel nad 20 %, u dalších 3 lokusů byla frekvence v rozmezí 10–20 %, u 2 lokusů byla v rozmezí 5–10 % a u zbylých 3 lokusů byla frekvence výskytu nulových alel pod 5 % (detailně viz Příloha č. 1).

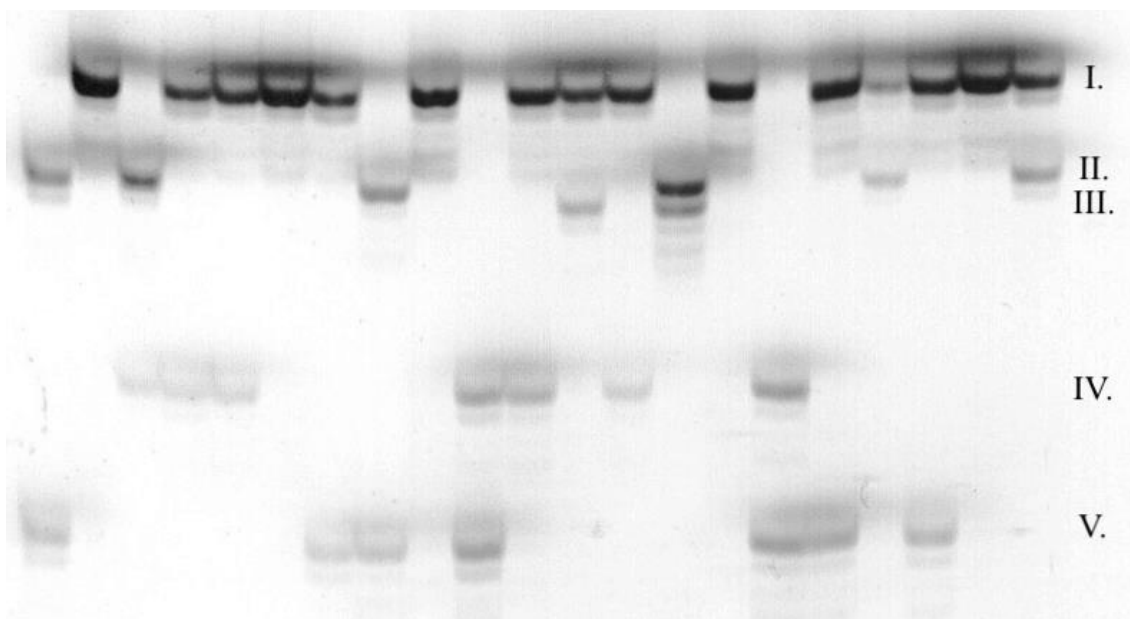
V průběhu experimentální části mé diplomové práce byly elektroforetogramy všech vyhodnocených mikrosatelitů naskenovány do PC. Na následujících obrázcích jsou výřezy gelů s rozseparovanými a vizualizovanými PCR produkty. Jedná se o mikrosatelity TG01-148, Ech008 a Ech039, které byly genotypovány na DNA 21 nepříbuzných jedinců pelikána bílého. Římskými číslicemi jsou označeny jednotlivé alely.



Obrázek č. 9: Dvoualelový mikrosatelitní lokus TG01-148 genotypovaný na 21 vzorcích DNA pelikána bílého. *Cross-species* PCR amplifikace probíhala za T_a 50 °C, následná elektroforetická separace probíhala po dobu 90 minut (I. a II. - alely).



Obrázek č. 10: Pětialelový mikrosatelitní lokus Ech008 genotypovaný na 21 vzorcích DNA pelikána bílého. *Cross-species* PCR amplifikace probíhala za T_a 63 °C, následná elektroforetická separace probíhala po dobu 90 minut (I.–V. - alely).



Obrázek č. 11: Pětialelový mikrosatelitní lokus Ech039 genotypovaný na 21 vzorcích DNA pelikána bílého. *Cross-species* PCR amplifikace probíhala za T_a 48 °C, následná elektroforetická separace probíhala po dobu 90 minut (I.–V. - alely).

Některé mikrosatelity s vysokým počtem alel byly velmi problematicky hodnotitelné. U mnoha z nich se vyskytovaly extrabandy, které znesnadňovaly určení příslušných alel. U jiných se obtížně určovala konstituce alel z důvodu krátké jednotky repetice a nízkého počtu jejího opakování. Mezi tyto lokusy patřily například CAM17, Emm5 nebo TG04-061, které bych proto nedoporučovala pro případné paternitní studie.

6 Diskuse

V této diplomové práci jsem se zabývala *cross-species* PCR amplifikací 35 polymorfních mikrosatelitních lokusů, které jsem ve své bakalářské práci (Kremlová, 2019) našla amplifikací se 34 páry primerů původně navrženými pro amplifikaci mikrosatelitů u 9 druhů tučňáků a univerzálních ptačích mikrosatelitů. Dále jsem retestovala mikrosatelitní lokus CAM24, který jsem po otestování u 6 jedinců pelikána bílého (*Pelecanus onocrotalus*) vyhodnotila jako monomorfní (Kremlová, 2019). Všechny výše zmíněné mikrosatelity jsem amplifikovala na DNA 21 nepříbuzných jedinců tohoto druhu. Získaná data jsem dále analyzovala za použití dvou populačně-genetických programů Cervus 3.0.7 (Kalinowski *et al.*, 2007) a Genepop 4.7.5 (Rousset, 2008).

Nejprve jsem prostřednictvím *cross-species* PCR amplifikovala 18 lokusů, které byly původně nalezeny u 7 zástupců z řádu tučňáci. Z toho pět mikrosatelitů pocházelo od tučňáka žlutorohého, šest od tučňáka nejmenšího, po jednom mikrosatelitu od tučňáka kroužkového, brýlového a magellanského, a v neposlední řadě po dvou mikrosatelitech od tučňáka uzdičkového a Humboldtova. Jeden z těchto lokusů (AM13) byl u pelikána bílého již dříve testován (Mikulová, 2010) a charakterizován (Bartoňková, 2013). Jelikož jsem však v mé bakalářské práci testovala všechny páry primerů amplifikující mikrosatelity od tučňáků, které byly doposud v laboratoři k dispozici, zahrnula jsem do společného testování také tento již otestovaný a charakterizovaný lokus. Bartoňková (2013) ve své diplomové práci detekovala u tohoto lokusu 2 alely. Nynější genotypizací u 21 totožných jedinců pelikána bílého jsem však zjistila, že tehdejší hodnocení nebylo provedeno správně a místo dvou alel jsem našla 3 alely. Do následujících analýz jsem tento lokus zahrnovala vždy jen jednou a použila jsem mnou vyhodnocené výsledky tohoto lokusu. U jediného mikrosatelitu M1-11, původně izolovaného od tučňáka magellanského, jsem polymorfismus neprokázala, nicméně u zbylých 17 mikrosatelitních lokusů jsem polymorfismus potvrdila.

Dále jsem prováděla *cross-species* PCR amplifikaci se 16 páry primerů amplifikujícími univerzální ptačí mikrosatelity, 9 z nich bylo navrženo pro amplifikaci EST ptačích mikrosatelitů a 7 pro amplifikaci konzervovaných ptačích mikrosatelitů. Z výše zmíněných párů primerů poskytlo 15 z nich polymorfní produkt. Amplifikací mikrosatelitního lokusu CAM23 na DNA 21 jedinců pelikána bílého jsem však polymorfní produkt nedetekovala. Dokonce ani elektroforetogram tohoto lokusu

neodpovídal záznamu z bakalářské práce (Kremlová, 2019). Z tohoto důvodu jsem přetestovala v té době společně pipetovanou trojici mikrosatelitů (CAM22, CAM23 a CAM24) a došla jsem k závěru, že tehdy nejspíše z důvodu špatného označení mikrozkuumavek s páry primerů amplifikujícími lokusy CAM23 a CAM24 došlo s velkou pravděpodobností k jejich záměně. Zjistila jsem tedy, že tím polymorfním lokusem není CAM23, který jsem nyní vyloučila jako monomorfní, ale CAM24, který byl v mé bakalářské práci (Kremlová, 2019) chybně uveden jako monomorfní. Genotypizací lokusu CAM24 na DNA 21 jedinců pelikána bílého jsem detekovala 5 alel. Nově jsem našla třetí polymorfní oblast amplifikovanou párem primerů TG13-016. Celkově tedy 16 párů primerů amplifikovalo 18 polymorfních míst. Locus CAM05 jsem sice vyhodnotila jako polymorfní, ale z důvodu výskytu extrabandů jsem u něj nebyla schopna určit počet ani konstituci alel, a proto jsem jej z další analýzy vyloučila.

Celkově jsem prostřednictvím dvou populačně-genetických programů (Cervus 3.0.7 a Genepop 4.7.5) analyzovala a charakterizovala 34 polymorfních lokusů, které byly amplifikovány za použití 32 párů primerů (detailně viz Příloha č. 1).

Srovnání polymorfních mikrosatelitů u pelikána bílého a u zdrojových druhů

Izolaci a charakteristikou mikrosatelitních lokusů u tučňáka žlutorohého se zabývali Ahmed *et al.* (2009). Navržené lokusy testovali na 28 jedincích tohoto druhu a našli 25 polymorfních lokusů. Pět z těchto lokusů (Ech008, Ech011, Ech039, Ech060 a Ech113) jsem charakterizovala na DNA 21 jedinců pelikána bílého. Srovnání jejich výsledků a výsledků této diplomové práce je uvedeno v tabulce č. 6. U všech mikrosatelitů jsem musela při testování na větším počtu jedinců snížit T_a , oproti finálním T_a z mé bakalářské práce (Kremlová, 2019). U tří lokusů jsem detekovala větší počet alel, než našli původně autoři, jedná se o mikrosatelity Ech008, Ech039 a Ech060.

Tabulka č. 6: Srovnání mikrosatelitních lokusů původně nalezených u tučňáka žlutorohého (Ahmed *et al.*, 2009) s výsledky *cross-species* testování 21 nepříbuzných jedinců pelikána bílého (tato práce). V tabulce je uveden název lokusu, teploty *annealingu* (T_a), délka elektroforetické separace (t_s) a počty nalezených alel (N). V závorkách // jsou uvedeny výsledné hodnoty z mé bakalářské práce (Kremlová, 2019).

Lokus	Tučňák žlutorohý, 28 jedinců (Ahmed <i>et al.</i> , 2009)		Pelikán bílý, 21 nebo /6/ jedinců (tato práce, /Kremlová, 2019/)		
	T_a [°C]	N	T_a [°C]	t_s [min]	N
Ech008		4	63 /67/	90	5 /2/
Ech011	neuvedeno	8	65 /67/	120	2 /2/
Ech039		2	48 /51/	90	5 /3/

Tabulka č. 6: Pokračování.

Lokus	Tučňák žlutorohý, 28 jedinců (Ahmed <i>et al.</i> , 2009)		Pelikán bílý, 21 nebo /6/ jedinců (tato práce, /Kremlová, 2019/)		
	T _a [°C]	N	T _a [°C]	t _s [min]	N
Ech060	neuvedeno	4	63 /64/	150	6 /2/
Ech113		7	59 /62/	165	4 /2/

Pro tučňáka nejmenšího bylo ve dvou publikacích (Billing *et al.*, 2007; Grosser *et Waters*, 2015) charakterizováno celkem 28 (8 + 20) mikrosatelitních lokusů. Billing *et al.* (2007) amplifikovali 8 mikrosatelitních lokusů na dvou populacích jedinců tohoto druhu. U 21 jedinců pelikána bílého jsem charakterizovala 2 polymorfní lokusy. Lokus Emm5 byl autory amplifikován na DNA 28 jedinců tučňáka nejmenšího pocházejících z Filipova ostrova a na DNA 15 jedinců pocházejících z Troubridgeova ostrova. Při T_a 58 °C našli autoři 11, respektive 8 alel na lokus. Já jsem u 21 jedinců pelikána bílého detekovala 4 alely při T_a 54 °C a snížené koncentraci MgCl₂ na ³/₄. Lokus Emm6 amplifikovali autoři při T_a 56 °C na 21 jedincích tučňáka nejmenšího pocházejících z Filipova ostrova a 13 jedincích tohoto druhu pocházejících z Troubridgeova ostrova a detekovali 3, respektive 2 alely. Já jsem u tohoto lokusu, amplifikovaném na DNA 21 jedinců pelikána bílého, našla 2 alely při T_a 60 °C.

Grosser *et Waters* (2015) našli 20 mikrosatelitních lokusů, včetně Em8, Em14, Em21 a Em23, které jsem genotypovala u 21 jedinců pelikána bílého. Autoři amplifikovali tyto lokusy při jednotné teplotě *annealingu* 60 °C, avšak neuvádějí počet testovaných jedinců. Srovnání teplot *annealingu*, délky separace a výsledného počtu alel je uveden v tabulce č. 7.

Tabulka č. 7: Srovnání mikrosatelitních lokusů původně nalezených u tučňáka nejmenšího (Grosser *et Waters*, 2015) s výsledky *cross-species* testování 21 nepříbuzných jedinců pelikána bílého (tato práce). V tabulce je uveden název lokusu, teploty *annealingu* (T_a), délka elektroforetické separace (t_s) a počty nalezených alel (N). ** značí snížení koncentrace hořčnatých iontů v PCR reakční směsi na ³/₄. V závorkách // jsou uvedeny výsledné hodnoty z mé bakalářské práce (Kremlová, 2019).

Lokus	Tučňák nejmenší (Grosser <i>et Waters</i> , 2015)		Pelikán bílý, 21 nebo /6/ jedinců (tato práce, /Kremlová, 2019/)		
	T _a [°C]	N	T _a [°C]	t _s [min]	N
Em8	60	10	63 /67/	90	7 /5/
Em14		10	63** /66/	165	3 /2/
Em21		2	63 /67/	90	2 /2/
Em23		9	63 /56/	140	4 /2/

Roeder *et al.* (2001) publikovali ve své práci 7 mikrosatelitních lokusů, původně odvozených od tučňáka kroužkového. Mezi tyto lokusy patřil také AM13, který autoři amplifikovali na DNA 417 jedinců při teplotě *annealingu* 50 °C a našli u něj 20 alel. Při testování tohoto mikrosatelitu u 21 jedinců pelikána bílého jsem při T_a 59 °C našla 3 alely.

Mikrosatelitní lokus PNN05 byl původně odvozen od tučňáka brýlového a Labuschagne *et al.* (2013) u něj uvádějí 2 alely při teplotě *annealingu*, která měla hodnotu mezi 50–60 °C. Genotypizací u 21 jedinců pelikána bílého jsem u tohoto lokusu detekovala 4 alely při T_a 64 °C.

Lokusy Sh2Ca21 (Schlosser *et al.*, 2003) a Sh2Ca49 (Schlosser *et al.*, 2009) byly původně odvozeny od tučňáka Humboldtova. U prvního jmenovaného lokusu detekovali autoři při T_a 53 °C 6 alel. Zatímco u 21 jedinců jsem tento lokus amplifikovala při snížené koncentraci hořčíku na $3/4$ a T_a 59 °C a detekovala dvě alely. U lokusu Sh2Ca49 uvádějí autoři 9 alel při T_a 63 °C. Avšak při *cross-species* testování na DNA 21 jedinců pelikána bílého jsem u tohoto lokusu našla při T_a 60 °C 3 alely.

Kang *et al.* (2015) charakterizovali 16 polymorfních mikrosatelitních lokusů pro tučňáka uzdičkového. Mezi tyto lokusy patřily také Pygantarc11 a Pygantarc19, které jsem charakterizovala u pelikána bílého. Autoři uvedli, že teplota *annealingu* všech párů primerů byla stejná, avšak v průběhu několika cyklů proměnlivá: prvních 7 cyklů probíhalo na 65 °C, následujících 7 cyklů na 61 °C, dalších 7 cyklů na 58 °C a zbylých 21 cyklů na 55 °C. Amplifikací obou těchto lokusů u 23 jedinců tučňáka uzdičkového našli autoři shodně po 4 alelách. Já jsem u obou těchto lokusů u 21 jedinců pelikána bílého našla po dvou alelách. Každý z těchto lokusů jsem však amplifikovala při rozdílných teplotách *annealingu*, Pygantarc11 při T_a 60 °C a Pygantarc19 při T_a 64 °C.

Dawson *et al.* (2010) nejdříve našli vysoce homologní EST sekvence mezi dvěma geneticky vzdálenými druhy, zebříčkou pestrou (*Taenopygia guttata*) a kurem domácím (*Gallus gallus*), a navrhli pro jejich amplifikaci 36 párů primerů. Další páry primerů navrhli Dawson *et al.* (2013) pro konzervované ptačí mikrosatelity, a to takovým způsobem, že nejprve u obou zmíněných druhů vybrali vysoce konzervované sekvence s vysokým počtem krátkých repetitivních motivů a pro 24 homologních sekvencí, obsahujících minimálně osm repetitivních motivů, následně navrhli páry primerů.

Dawson *et al.* (2010) testovali 36 navržených párů primerů při rozdílných T_a na devíti ptačích druzích pocházejících z řádu pěvců (vlaštovka australská, sýkora modřina

a koňadra, rákosník velký, sýkořice vínoprsá, kos černý, timálievec pruhokřídlý, straka americká a popeláč šedý) a na pěti druzích ptáků z jiných řádů (kulík mořský, sova pálená, kolibřík rezavolesklý, papoušek různohrdý a kur domácí). Od každého druhu otestovali autoři 4 jedince. U 21 jedinců pelikána bílého jsem charakterizovala celkem 9 EST mikrosatelitů, respektive 11 polymorfních EST lokusů, a našla u nich od 2 do 8 alel. Srovnání výsledků uváděných autory a výsledků mé diplomové práce je uvedeno v tabulce č. 8. V tabulce však neuvádím srovnání výsledků amplifikace u všech autory testovaných druhů, ale pouze u dvou z nich, u kterých se vyskytovalo nejvíce lokusů, které byly zároveň polymorfní u testovaného druhu a u mnou testovaného pelikána bílého. Z řádu pěvců uvádím straku americkou (*Pica hudsonia*), u které se vyskytovalo 5 lokusů, které byly polymorfní současně i u pelikána bílého. Z ostatních ptačích řádů uvádím kulíka mořského (*Charadrius alexandrinus*) řazeného do řádu dlouhokřídílí, u kterého se vyskytovaly 4 lokusy, které byly polymorfní zároveň i u pelikána bílého.

Tabulka č. 8: Srovnání EST ptačích mikrosatelitních lokusů (Dawson *et al.*, 2010) s výsledky *cross-species* testování u 21 nepříbuzných jedinců pelikána bílého (tato práce). V tabulce je uveden název lokusu, teploty *annealingu* (T_a), délka elektroforetické separace (t_s) a počty nalezených alel (N). * značí snížení koncentrace hořčnatých iontů v PCR reakční směsi na $1/2$, ** značí snížení koncentrace hořčnatých iontů v PCR reakční směsi na $3/4$, *** značí snížení koncentrace hořčnatých iontů v PCR reakční směsi na $2/3$. m: monomorfní. V závorkách // jsou uvedeny výsledné hodnoty z mé bakalářské práce (Kremlová, 2019).

Lokus	EST mikrosatelity (Dawson <i>et al.</i> , 2010)			Pelikán bílý, 21 nebo /6/ jedinců (tato práce, /Kremlová, 2019/)		
	T_a [°C]	N		T_a [°C]	t_s [min]	N
		Straka americká	Kulík mořský			
TG01-114	53	2	m	57 /61/	120	2 /2/
TG01-148	56	2	m	50 /50/	90	2 /2/
TG03-031	58	m	m	60 /64/	165	2 /2/
TG03-098	60	m	2	63 /65/	180	7 /2/
TG04-012	58	2	3	60** /61**/	120	8 /4/
TG04-061	60	2	m	61*** /60*/	170	7 /3/
TG08-24 (1)	61	m	m	62 /66/	90	4 /3/
TG13-016	59	m	2	54 /54/	90 + 150	3 + 4 + 2 /2 + 2/
TG13-017	58	4	4	57 /63/	165	4 /3/

Amplifikací 24 konzervovaných ptačích mikrosatelitů na DNA 6 jedinců pelikána bílého jsem detekovala polymorfismus u 7 lokusů (Kremlová, 2019). Tyto jsem dále

charakterizovala na 21 jedincích tohoto druhu (tato práce). Dawson *et al.* (2013) amplifikovali tyto mikrosatelity na DNA 7–12 jedinců zebřičky pestré a 2–4 jedinců kura domácího. U obou zmíněných druhů probíhala amplifikace při T_a 56 °C, počet zjištěných alel na lokus se však lišil. V tabulce č. 9 uvádím T_a a počty alel nalezených autory s hodnotami, které jsem našla u pelikána bílého (tato práce).

U mikrosatelitního lokusu CAM17 uvedli Dawson *et al.* (2013) u zebřičky pestré 6 a u kura domácího 2 alely. Avšak u pelikána bílého jsem při snížené koncentraci $MgCl_2$ v PCR reakční směsi a T_a 58 °C detekovala alel 7. U kura domácího vyhodnotili autoři lokusy CAM11, CAM19, CAM20 a CAM24 jako monomorfní. Amplifikací těchto lokusů u 21 jedinců pelikána bílého jsem u jednoho lokusu detekovala 3 alely (CAM11), u dvou (CAM19 a CAM20) po dvou alelách a u lokusu CAM24 jsem našla 5 alel. U lokusu CAM03 uvedli autoři u zebřičky pestré 11 alel a u kura domácího 2 alely. Amplifikací tohoto lokusu u pelikána bílého jsem detekovala polymorfní produkt se dvěma alelami.

Tabulka č. 9: Srovnání konzervovaných ptačích mikrosatelitních lokusů (Dawson *et al.*, 2013) s výsledky *cross-species* testování u 21 nepříbuzných jedinců pelikána bílého (tato práce). V tabulce je uveden název lokusu, teploty *annealingu* (T_a), délka elektroforetické separace (t_s) a počty nalezených alel (N). * značí snížení koncentrace hořčnatých iontů v PCR reakční směsi na $1/2$, ** značí snížení koncentrace hořčnatých iontů v PCR reakční směsi na $3/4$. ZP: zebřička pestrá, KD: kur domácí, m: monomorfní. V závorkách // jsou uvedeny výsledné hodnoty z mé bakalářské práce (Kremlová, 2019).

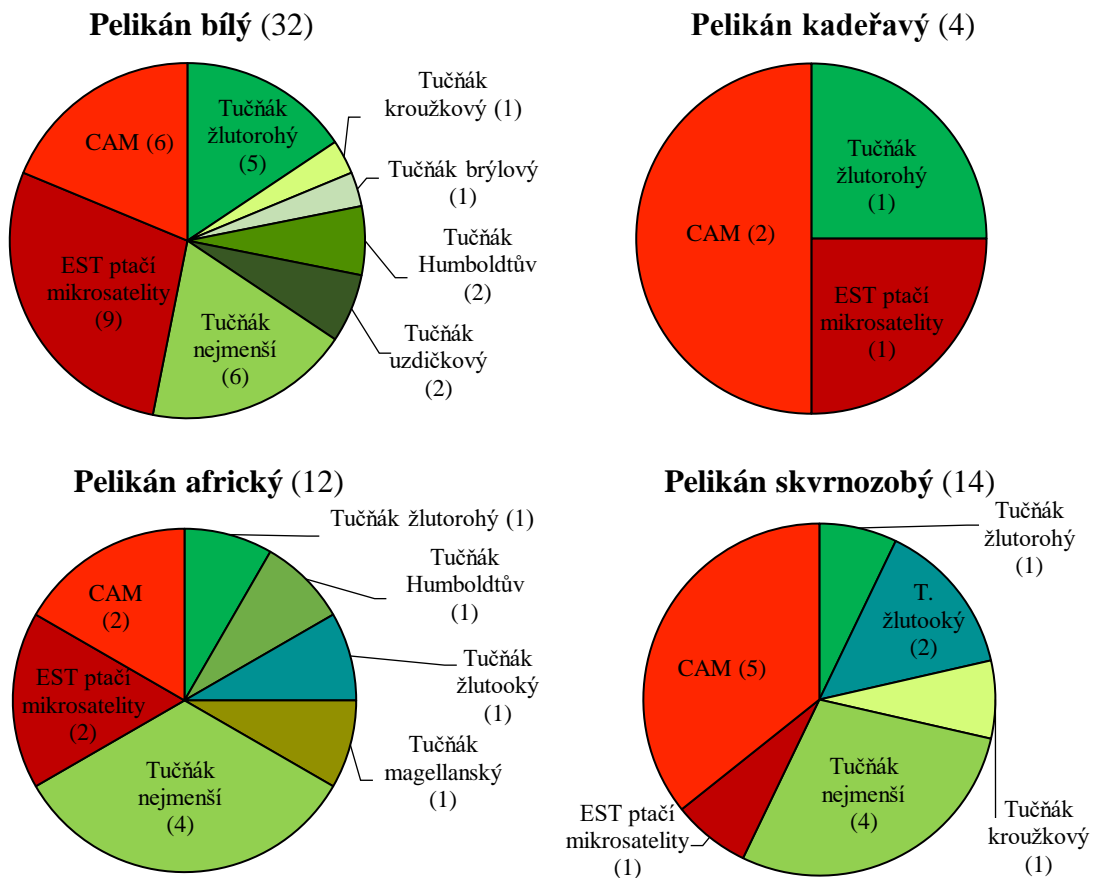
Lokus	Konzervované ptačí mikrosatelity (Dawson <i>et al.</i> , 2013)		Pelikán bílý, 21 nebo /6/ jedinců (tato práce, /Kremlová, 2019/)			
	T_a [°C]	N		T_a [°C]	t_s [min]	N
		ZP (7–12 jedinců)	KD (2–4 jedinci)			
CAM03	56	11	2	62 /68/	90	2 /2/
CAM11		6	m	65 /67/	90	3 /3/
CAM17		6	2	58** /54*/	150	7 /2/
CAM19		6	m	66 /68/	120	2 /2/
CAM20		6	m	51** /52**/	120	2 /2/
CAM24		6	m	59 /60/	90	5 /m/

Úspěšnost amplifikace polymorfních mikrosatelitů u čtyř druhů pelikánů

V rámci Laboratoře populační genetiky KBB PřF UPOL bylo u každého ze čtyř druhů pelikánů (kadeřavý, skvrnozobý, africký a bílý) otestováno po 113 párech primerů

původně navržených pro amplifikaci mikrosatelitů u 9 druhů z řádu tučňáci, po 36 párech primerů navržených pro amplifikaci EST ptačích mikrosatelitů a po 24 párech primerů navržených pro amplifikaci konzervovaných ptačích mikrosatelitů.

V průběhu své diplomové práce jsem u pelikána bílého amplifikací se 32 páry primerů našla 34 polymorfních lokusů. Úspěšnost nalezení polymorfního lokusu prostřednictvím *cross-species* PCR amplifikace činila u pelikána bílého 18,49 %. U pelikána kadeřavého (*Pelecanus crispus*) našla studentka Iveta Daňková pouze 4 páry primerů amplifikující polymorfní produkt (neobhajovaná bakalářská práce, ústní sdělení vedoucího práce). Jedná se tak o druh pelikána s nejnižší úspěšností amplifikace polymorfního produktu, a to 2,31 %. U pelikána afrického (*Pelecanus rufescens*) bylo ze 173 testovaných párů primerů nalezeno 12 párů primerů poskytujících polymorfní produkt a úspěšnost amplifikace tak činila 6,93 % (Kopečná, 2020). Šuláková (2017) otestovala 173 výše zmíněných párů primerů na DNA pelikána skvrnozobého (*Pelecanus philippensis*) a našla 14 párů primerů poskytujících polymorfní produkt, úspěšnost amplifikace tedy byla 8,09 %. Srovnání počtu párů primerů amplifikujících polymorfní lokusy u čtyř druhů pelikánů je uvedeno na obrázku č. 12.



Obrázek č. 12: Srovnání počtu (uvedeného v závorkách) párů primerů amplifikujících polymorfní mikrosatelity u čtyř druhů pelikánů.

Po srovnání rozdělení párů primerů amplifikujících polymorfni lokus u všech 4 druhů pelikánů podle zdroje, ze kterého byly páry primerů odvozené je zřejmé, že největší podíl úspěšné amplifikace polymorfniho lokusu zaujímaly páry primerů navržené pro amplifikaci EST ptačích mikrosatelitů a konzervovaných ptačích mikrosatelitů. Další početnou skupinkou u srovnávaných druhů tvořily páry primerů navržené pro amplifikaci mikrosatelitů pocházejících od tučňáka nejmenšího a žlutorohého.

Rozložení polymorfniích mikrosatelitů u čtyř druhů pelikánů

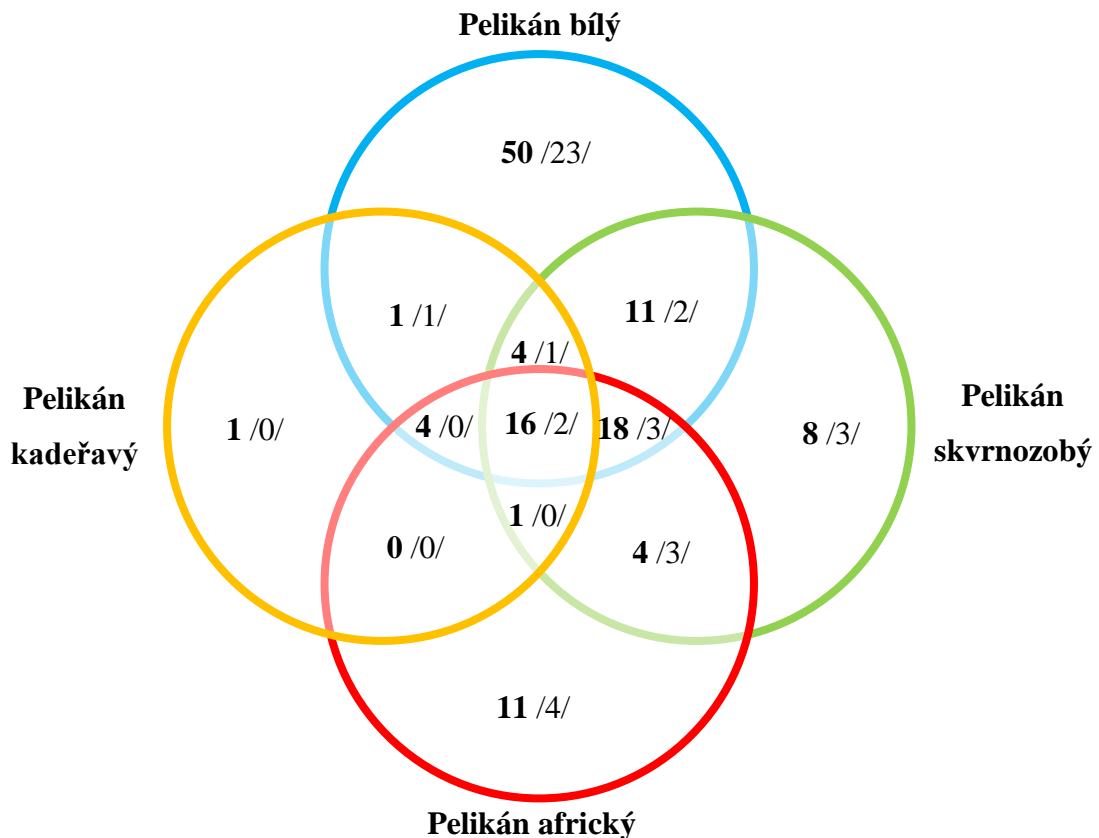
Stejně jako Bartoňková (2013) jsem i já během svého výzkumu zjistila, že se nejvíce polymorfniích *cross-species* lokusů nachází u pelikána bílého. Otestováním 173 párů primerů jsem u pelikána bílého našla 32 párů primerů amplifikujících 34 polymorfniích mikrosatelitů. Ve srovnání s dalšími druhy pelikánů (kadeřavým, africkým a skvrnozobým) ovšem existuje ještě dalších 10 párů primerů, které amplifikovaly polymorfni produkt u alespoň jednoho ze tří výše zmíněných druhů pelikánů. A tudíž bylo z celkového počtu 173 párů primerů, navržených pro amplifikaci mikrosatelitů u tučňáků a univerzálních ptačích mikrosatelitů, nalezeno 42 párů primerů amplifikujících polymorfni produkt alespoň u jednoho z těchto čtyř druhů pelikánů.

Bartoňková (2013) ve své práci shrnula rozdělení dalších 97 párů primerů, které poskytovaly polymorfni produkt alespoň u jednoho ze 4 testovaných druhů pelikánů. Celkově se tedy jedná o 138 doposud nalezených párů primerů amplifikujících již charakterizované polymorfni mikrosatelitni lokusy mezi dříve zmíněnými čtyřmi druhy pelikánů. Schématické rozdělení těchto 138 /42/ párů primerů amplifikujících polymorfni produkt je znázorněno na obrázku č. 13.

Ze 42 párů primerů, navržených pro amplifikaci mikrosatelitů 9 druhů tučňáků a univerzálních ptačích mikrosatelitů, amplifikujících již charakterizované polymorfni mikrosatelity, poskytly 2 páry primerů polymorfni produkt u všech čtyř druhů pelikánů (CAM24 a Ech008). Čtyři páry primerů (Em8, Emm5, Emm6 a CAM17) poskytly polymorfni produkt u některých tří druhů pelikánů, 6 párů primerů (AM13, TG03-098, CAM11, Em8, Emm8 a Man13) poskytlo polymorfni produkt u některých dvou druhů pelikánů. Zbývajících 30 párů primerů amplifikovalo polymorfni produkt pouze u jednoho z testovaných druhů pelikánů. Kvůli absenci polí společných pro pelikána bílého a afrického a pro pelikána kadeřavého a skvrnozobého, není na obrázku č. 13 znázorněn počet párů primerů poskytujících polymorfni lokusy společně pro danou dvojici

pelikánů. Nicméně mezi oběma zmíněnými dvojicemi pelikánů se nevyskytoval žádný pár primerů, který by amplifikoval polymorní produkt pouze u těchto dvou dvojic druhů.

A z celkového počtu 138 párů primerů (amplifikujících již charakterizované polymorní lokusy) bylo pro pelikána bílého a afrického přitom nalezeno 9 párů primerů společné těmto dvěma druhům. U pelikána kadeřavého a skvrnozobého nebyl nalezen žádný pár primerů poskytující polymorní produkt společný těmto druhům.



Obrázek č. 13: Rozložení všech 138 /42/ doposud nalezených párů primerů amplifikujících již charakterizované polymorní mikrosatelity alespoň u jednoho ze čtyř druhů pelikánů. Čísla zvýrazněná tučně představují celkový počet párů primerů amplifikujících polymorní produkt u jednotlivých, respektive překrývajících se druhů (Bartoňková, 2013 a tato práce). Čísla v závorkách // představují pouze počty párů primerů, které byly původně navrženy pro amplifikaci mikrosatelitů u zástupců z řádu tučňáci a konzervovaných ptačích mikrosatelitů (tato práce).

Předpoklad fylogeneze čtyř druhů pelikánů

Na základě srovnání polymorních mikrosatelitů, u 4 druhů pelikánů, pocházejících od vybraných zástupců z řádu tučňáci a univerzálních ptačích mikrosatelitů, lze předpokládat, že pelikán bílý je z testovaných druhů pelikánů nejpříbuznějším druhem k ostatním zástupcům kladu Aequorlithornithes (Prum *et al.*, 2015). Což by mohlo také znamenat, že v rámci testovaných druhů pelikánů je evolučně nejstarší. A jelikož v tomto pořadí (bílý, skvrnozobý, africký, kadeřavý) ubývá

společných polymorfních mikrosatelitů, prodlužuje se zřejmě evoluční vzdálenost (příbuznost) jednotlivých druhů pelikánů k ostatním zástupcům kladu Aequorlitorornithes, u kterých se tyto mikrosatelity testují. Většina párů primerů, navržených pro amplifikaci výše zmíněných mikrosatelitů, které byly nalezeny u pelikána kadeřavého (neobhajovaná bakalářská práce Ivety Daňkové, ústní sdělení vedoucího práce) poskytuje (s výjimkou 10 párů primerů) polymorfní produkt také u pelikána afrického (Kopečná, 2020). Dále pak páry primerů amplifikující polymorfní produkt u p. kadeřavého a afrického poskytují také polymorfní produktu p. skvrnozobého (Šuláková, 2017) (který má ovšem 2 páry primerů navíc). Nejvíce párů primerů poskytujících polymorfní lokusy má pelikán bílý (tato práce).

Srovnání polymorfních mikrosatelitů u pelikána bílého a u dalších testovaných druhů z kladu Aequorlitorornithes

Cross-species PCR amplifikací mikrosatelitů původně nalezených u některých zástupců kladu Aequorlitorornithes (Prum *et al.*, 2015) se na Katedře buněčné biologie a genetiky PřF UPOL zabývá Laboratoř populační genetiky. Ta testuje převážně páry primerů, které jsou navrženy pro amplifikaci mikrosatelitů pocházejících právě od zástupců tohoto kladu.

Na přítomnost polymorfních mikrosatelitů, původně nalezených u zástupců z řádu tučňáci a univerzálních ptačích mikrosatelitů, byli v bakalářských pracích Pechová (2014), Gajdošíková (2020) a Košatová (2020) testováni nesyt indomalajský, resp. čáp bílý a čáp simbil. U potápky roháče byly tyto mikrosatelity testovány v bakalářské práci Filipová (2016) a následně charakterizovány v diplomové práci Janušová (2017). Dále byly testovány dva druhy plameňáků: plameňák karibský, u něhož byly mikrosatelity testovány v bakalářské práci Zlochová (2017) a následně charakterizovány v diplomové práci Šuláková (2019), a plameňák růžový, u nějž byly lokusy testovány v bakalářské práci Klaclová (2018) a charakterizovány v diplomové práci Verešová (2020). Dále byly na přítomnost výše zmíněných polymorfních mikrosatelitů testovány a charakterizovány tři druhy pelikánů: pelikán bílý, skvrnozobý a africký. U pelikána afrického byly mikrosatelity původně navrženy pro zástupce z řádu tučňáci a univerzální ptačí mikrosatelity testovány v bakalářské práci Adámková (2019) a charakterizovány v diplomové práci Kopečná (2020), u pelikána skvrnozobého byly výše zmíněné mikrosatelity testovány v bakalářské práci Šuláková (2017). U pelikána bílého jsem polymorfismus těchto mikrosatelitů testovala ve své bakalářské práci (Kremlová, 2019)

a nalezené polymorfní mikrosatelity jsem charakterizovala v této diplomové práci. Srovnání výsledků mé diplomové práce (tato práce) s výsledky testování dalších studentek, které se zabývaly amplifikací mikrosatelitů nalezených u zástupců z řádu tučňáci a univerzálních ptačích mikrosatelitů, jsem uvedla v tabulce č. 10.

Tabulka č. 10: Přehled nalezených polymorfních mikrosatelitů u pelikána bílého původně navržených pro zástupce z řádu tučňáci a univerzální ptačí mikrosatelity a srovnání s výsledky testování u dalších devíti druhů z kladu Aequorlornithes. V závorkách // jsou uvedeny počty testovaných jedinců, čísla udávají počet nalezených alel na daný lokus, m jsou lokusy vyhodnocené jako monomorfní, NT jsou lokusy, které nebyly u daného druhu testovány, NA je označení lokusu, který nebyl amplifikován.

Lokus	Druh s /počtem testovaných jedinců/ a počtem nalezených alel									
	Pelikán bílý /21/ (tato práce)	Pelikán africký /12/ (Kopečná, 2020)	Pelikán skvrnozobý /6/ (Šuláková, 2017)	Pelikán kadeřavý /6/ (nepublikováno)	Plameňák růžový /22/ (Verešová, 2020)	Plameňák karibský /30/ (Šuláková, 2019)	Čáp simbil /6/ (Košťatová, 2020)	Čáp bílý /6/ (Gajdošíková, 2020)	Potápka roháč /13/ (Janušová, 2017)	Nesyt indomalajský /6/ (Pechová, 2014)
Ech008	5	2	3	2	m	m	m	m	m	m
Ech011	2	m	m	m	2	2	3	m	m	m
Ech039	5	m	m	m	m	16	m	m	m	m
Ech060	6	m	m	m	m	m	m	m	m	m
Ech113	4	m	m	m	m	m	m	m	m	m
Emm5	4	3	2	m	5	3	m	m	3	m
Emm6	2	2	2	m	m	m	m	m	m	m
Em8	7	5	3	m	5	m	m	3	m	NT
Em14	3	m	m	m	m	m	m	2	2	NT
Em21	2	m	m	m	m	m	m	m	2	NT
Em23	4	m	m	m	7	7	3	m	m	NT
AM13	3	m	2	m	m	m	m	m	m	m
PNN05	4	m	m	m	m	m	m	m	m	m
Sh2Ca21	2	m	m	m	m	2	m	m	m	m
Sh2Ca49	3	m	m	m	m	m	m	m	m	m
Pygantarc11	2	m	m	m	m	m	m	m	m	NT
Pygantarc19	2	m	m	m	m	m	m	m	m	NT
TG01-114	2	m	m	m	m	m	m	m	m	m
TG01-148	2	m	m	m	2	m	3	m	m	m
TG03-031	2	m	m	m	m	m	m	m	m	m
TG03-098	7	m	m	2	m	m	m	2	2	2
TG04-012	8	m	m	m	m	m	m	m	2	m

Tabulka č. 10: Pokračování.

Lokus	Druh s /počtem testovaných jedinců/ a počtem nalezených alel									
	Pelikán bílý /21/ (tato práce)	Pelikán africký /12/ (Kopečná, 2020)	Pelikán skvrnozobý /6/ (Šuláková, 2017)	Pelikán kadeřavý /6/ (nepublikováno)	Plameňák růžový /22/ (Veršová, 2020)	Plameňák karibský /30/ (Šuláková, 2019)	Čáp simbil /6/ (Košťatová, 2020)	Čáp bílý /6/ (Gajdošíková, 2020)	Potápka roháč /13/ (Janušová, 2017)	Nesyt indomalajský /6/ (Pechová, 2014)
TG04-061	7	m	m	m	m	4	3	m	6	m
TG08-24 (1)	4	m	m	m	m	m	m	2	m	m
TG13-016	3+4+2	m	m	m	m	m	m	m	NA	m
TG13-017	4	m	m	m	m	m	m	2	m	m
CAM03	2	m	m	m	2	m	m	m	m	4
CAM11	3	m	2	m	2	3	2	2	5	5
CAM17	7	m	3	2	m	m	m	m	6	m
CAM19	2	m	m	m	2	m	m	m	3	m
CAM20	2	m	m	m	m	5	m	m	m	m
CAM24	5	3	2	2	7	4	2	2	5	m

Mezi nejúspěšnější mikrosatelity patří lokus CAM24, který je polymorfní u 9 z 10 testovaných druhů. Dále pak lokus CAM11, který je polymorfní u 8 z 10 testovaných druhů. Jeden lokus (Emm5) byl polymorfní u 6 z 10 testovaných druhů. Lokusy Em8 a TG03-098 byly polymorfní u 5 druhů, pět lokusů bylo polymorfních u čtyř druhů, sedm lokusů u tří druhů a dalších osm u dvou druhů. Celkově devět lokusů bylo polymorfních pouze u pelikána bílého.

Vazba polymorfních mikrosatelitů u 21 jedinců pelikána bílého

V rámci této diplomové práce jsem prostřednictvím *cross-species* PCR amplifikace se 32 páry primerů, původně navrženými pro amplifikaci mikrosatelitů u zástupců z řádu tučňáci a konzervovaných ptačích mikrosatelitů, našla u 21 jedinců pelikána bílého 34 polymorfních lokusů. Bartoňková (2013) ve své diplomové práci našla 84 polymorfních lokusů (82 párů primerů), u kterých určila konstituce alel u 21 totožných jedinců pelikána bílého jako já v této práci. Tyto páry primerů byly původně navrženy pro amplifikaci mikrosatelitů nalezených u zástupců z čeledi faetonovití, kormoránovití, fregatkovití, terejovití, pelikánovití, volavkovití, ibisovití, čápoovití, plameňákovití, alkovití a tučňákovití. Jelikož byl lokus AM13 analyzován v obou pracích

(vysvětleno již na začátku kapitoly Diskuse), je dohromady pro pelikána bílého charakterizováno 117 polymorfních mikrosatelitních lokusů amplifikovaných prostřednictvím 113 párů primerů.

Nejprve jsem pomocí programu Genepop 4.7.5 (Rousset, 2008) provedla analýzu všech 34 polymorfních lokusů, které jsem charakterizovala ve své diplomové práci (tato práce) a našla jsem velmi silnou vazbu mezi lokusy Ech113 a TG04-012. Dále jsem provedla společnou analýzu všech 117 polymorfních lokusů (Bartoňková, 2013 a tato práce) a kromě potvrzení vazby Ech113 s TG04-012, jsem také ověřila vazbu mezi lokusy Fmin13 a Phaari03, kterou již detekovala Bartoňková (2013), dále jsem však našla vazbu mezi jedním lokusem nalezeným mnou (CAM11) s jedním lokusem (PeEr05) nalezeným Bartoňkovou (2013). Kromě těchto lokusů, které jsou určitě ve vazbě, byly těsně za hranicí vazby dvě dvojice lokusů: Sn2A-36 s CAM11 a Sn2A-36 s PeEr05.

Polymorfní mikrosatelity vázané na pohlaví u pelikána bílého

Na základě zjištěných alelových konstitucí u všech 21 jedinců pelikána bílého vykazovaly dva z 34 polymorfních lokusů vazbu na pohlaví, respektive vazbu na pohlavní chromozom Z. Jednalo se o lokusy Ech113 a polymorfní oblast s nejtěžšími produkty lokusu TG13-016, přičemž samice se na základě vyhodnocených gelů jeví jako homozygotní, samci pak byli hetero- nebo homozygotní. Možnou vazbu na pohlaví jsem stanovila také u lokusu Emm6 a TG03-031, ale jelikož se u prvního zmiňovaného lokusu nevyskytuje mezi 21 jedinci žádný heterozygotní genotyp a u druhého zmiňovaného lokusu se mezi 21 jedinci vyskytuje pouze jeden heterozygotní genotyp, je u obou těchto lokusů vazba na pohlaví velice sporná. Oba tyto lokusy mají kromě toho pouze dvě alely a pro ověření vazby by muselo být otestováno větší množství jedinců obou pohlaví. Bartoňková (2013) prostřednictvím genotypizační analýzy 84 polymorfních lokusů u pelikána bílého našla 3 lokusy vázané na pohlaví. Lokusy Eru03 a PeEr05 vykazovaly vazbu na pohlavní chromozom Z. Locus Sn2A-36 byl také vázaný na pohlaví, ale typ vazby na pohlaví byl jiný, neboť všichni samci byli homozygotní pro delší alelu a všechny samice byly heterozygotní, což je zcela naopak oproti klasické vazbě na chromozom Z.

Na základě vypočtené hodnoty pravděpodobnosti vazby (p -value) programem Genepop 4.7.5 (Rousset, 2008) lze stanovit, jak silná je vazba mezi lokusy. Pokud je hodnota p -value 0,000000, existuje mezi lokusy velmi silná vazba. V případě, že je hodnota p -value nižší než 0,0002, hodnotíme lokusy stále jako vzájemně vázané. Překročí-li však hodnota p -value tuto hraniční hodnotu, pak dané lokusy již ve vazbě

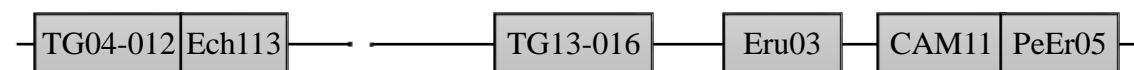
nejdou. V tabulce č. 11 jsou uvedeny vybrané hodnoty p -value vyhodnocené programem Genepop 4.7.5 (Rousset, 2008).

Tabulka č. 11: Hodnoty p -value vybraných mikrosatelitních lokusových párů dle klesající síly vazby. Dvojitá čára odděluje lokusy, které jsou ve vazbě od lokusů, které ve vazbě již nejsou. Přičemž u prvních dvou párů lokusů je první z dvojice zároveň vázaný na pohlavní chromozom Z.

Mikrosatelitní lokusový pár		p -value
Ech113	TG04-012	0,000000
PeEr05	CAM11	0,000000
Eru03	CAM11	0,019044
Eru03	TG13-016	0,121188
Eru03	PeEr05	0,165960
TG13-016	Ech113	0,215154
TG13-016	PeEr05	0,270030
Ech113	Eru03	0,326042
Ech113	PeEr05	0,403962
Ech113	CAM11	0,488972

Vzhledem k tomu, že lokusy Ech113 a PeEr05 jsou vázané na pohlaví a zároveň jsou v silné vazbě s lokusy TG04-012, respektive s CAM11, je velmi pravděpodobné, že i tyto dva lokusy budou vázané na pohlaví. Lokus TG04-012 je dle Dawson *et al.* (2010) vázaný u zebřičky pestré na chromozom 4, ovšem u pelikána bílého se jeví jako pohlavně vázaný. Lokus CAM11 lokalizují Dawson *et al.* (2013) na chromozomu Z, u pelikána bílého se také jeví jako pohlavně vázaný, protože je, jak již bylo zmíněno výše, v silné vazbě s pohlavně vázaným PeEr05.

Na základě získaných hodnot p -value z programu Genepop 4.7.5 (Rousset, 2008) jsem odhadla přibližnou vzájemnou pozici mikrosatelitních lokusů na pohlavním chromozomu Z (viz Obrázek č. 14). Jedná se však pouze o odhad vycházející z p -hodnot, které zde naznačují vzdálenosti lokusů.

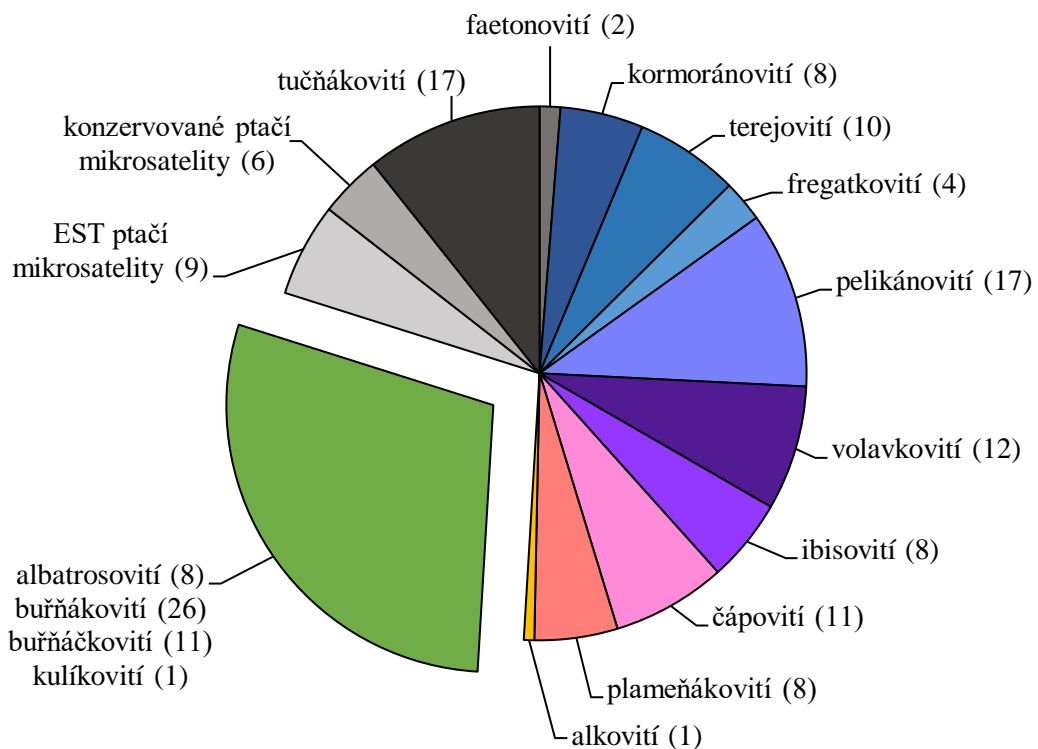


Obrázek č. 14: Přibližné schématické znázornění vzájemné pozice pohlavně vázaných mikrosatelitních lokusů Ech113, TG13-016, Eru03, PeEr05 a mikrosatelitů CAM11 a TG04-012, které jsou s velkou pravděpodobností také vázané na pohlavní chromozom Z.

Testované a charakterizované polymorfni mikrosatelity u pelikána bílého

Z celkového počtu 835 testovaných párů prumerů bylo pro pelikána bílého doposud nalezeno celkem 159 párů prumerů, které amplifikují 164 polymorfni mikrosatelitních lokusů. Uvedené páry prumerů byly původně navrženy pro amplifikaci mikrosatelitů odvozených od druhů z čeledí faetonovití (2), kormoránovití (8), fregatkovití (4), terejovití (10), pelikánovití (17), volavkovití (12), ibisovití (8), čápvití (11), plameňákovití (8), alkovití (1) a tučňákovití (17), dále pak od vybraných druhů z čeledí albatrosovití (8), buňňákovití (26), buňňáčkovití (11), kulíkovití (1) a v neposlední řadě pro amplifikaci univerzálních ptačích mikrosatelitů (15) (viz Obrázek č. 15). A byly testovány v bakalářské práci Hudzieczková (2019) a charakterizovány v diplomových pracích Bartoňková (2013) a tato práce.

Počet párů prumerů a jimi amplifikovaných polymorfni lokusů je ovšem pouze předběžný, neboť je ve 159 párech prumerů (164 polymorfni mikrosatelitech) zahrnuto také 45 párů prumerů (amplifikující 46 polymorfni lokusů od trubkonosých) a jeden pár prumerů (amplifikující 1 polymorfni lokus od dlouhokřídých), které byly prozatím jen testovány a jejich charakterizace bude teprve provedena.



Obrázek č. 15: Rozložení 159 párů prumerů amplifikujících polymorfni mikrosatelitní lokusy u pelikána bílého vzhledem k jejich zdrojové čeledi. Čísla za čeledi udávají počet párů prumerů poskytující polymorfni produkt. Zelená výseč znázorňuje páry prumerů amplifikujících polymorfni lokusy, které zatím nebyly charakterizovány.

Mikrosatelity potenciálně vhodné pro další *cross-species* testování u pelikána bílého

Mikrosatelity jsou stále využívány při testování paternity, ale také při testování dalších vztahů uvnitř i mezi populacemi jednotlivých druhů. Pelikáni sice nepatří mezi ohrožené druhy ptáků, ale z důvodu stálého znečišťování je vhodné populace pelikánů přinejmenším sledovat. Pelikán bílý je v rámci testování mikrosatelitů pocházejících od jiných zástupců kladu *Aequorlornithes* (Prum *et al.*, 2015), nejlépe recipientním druhem, což znamená, že mikrosatelity, které jsou u pelikána bílého polymorfní, mají velkou šanci, že budou polymorfní také u ostatních druhů pelikánů. Mikrosatelity, které by byly polymorfní u pelikána bílého mohou být cca ze čtvrtiny také polymorfní u pelikána kadeřavého, u pelikána afrického je šance poloviční a u pelikána skvrnozobého je tato šance dvoutřetinová.

Testování mikrosatelitů pocházejících od druhů z kladu *Aequorlornithes* u pelikána bílého za účelem nalezení polymorfních mikrosatelitů, má význam, což již naznačila Ranochová (2008), která u pelikána bílého mimo mikrosatelity pocházejících od různých skupin kladu *Aequorlornithes* testovala také mikrosatelity od pěvců. A přestože tyto mikrosatelity byly vysoce polymorfní u nejrůznějších druhů pěvců, u pelikána bílého nebyl polymorfní žádný z nich.

Pokud by tedy byla snaha najít další polymorfní mikrosatelity pro pelikána bílého nebo pro pelikány obecně, doporučila bych v první řadě dotestovat další nalezené a doposud netestované páry primerů, od druhů, u kterých víme, že poskytují polymorfní produkt, neboť byly u pelikána bílého v Laboratoři populační genetiky KBB PřF UPOL již testovány. Jedná se převážně o páry primerů navržené pro amplifikaci mikrosatelitů od některých zástupců z řádů tučňáci (Vianna *et al.*, 2017), trubkonosí (Danckwerts *et al.*, 2016; Gravley *et al.*, 2019), čápi (Turjeman *et al.*, 2016), Suliformes (Rodrigues *et al.*, 2017) a Pelecaniformes (Wirtz *et al.*, 2016).

Jelikož dochází k úspěšné amplifikaci mikrosatelitů napříč kladem *Aequorlornithes*, bylo by vhodné otestovat také mikrosatelity, které byly popsány u druhů z řádu dlouhokřídlí (Hasegawa *et al.*, 2005; Küpper *et al.*, 2008; Farrel *et al.*, 2012 a další). Neboť mikrosatelity nalezené u zástupců z tohoto řádu nebyly doposud u pelikána bílého testovány, s výjimkou pěti testovaných v bakalářské práci Hudzieczková (2019) a dvou charakterizovaných v diplomové práci Bartoňková (2013). Dále doporučuji otestovat také mikrosatelity, které byly nalezeny u kagu chocholatého (*Rhynochetos jubastus*) pocházejícího z řádu slunatci. Testování těchto mikrosatelitů by mohlo ukázat, jak jsou zástupci zmíněných řádů příbuzní ptákům rodu pelikán.

7 Závěr

V této diplomové práci jsem prostřednictvím *cross-species* PCR amplifikace u 21 nepříbuzných jedinců pelikána bílého (*Pelecanus onocrotalus*) otestovala a charakterizovala vybrané polymorfní mikrosatelity.

DNA pelikána bílého jsem postupně amplifikovala za použití párů primerů, které v mé bakalářské práci (Kremlová, 2019) poskytly polymorfní produkt. Jednalo se o 18 párů primerů původně navržených pro amplifikaci mikrosatelitů u zástupců z řádu tučňáci (Sphenisciformes) a 16 párů primerů navržených pro amplifikaci univerzálních ptačích mikrosatelitů. Dále jsem provedla *cross-species* PCR amplifikaci univerzálního ptačího mikrosatelitu CAM24, který byl v mé bakalářské práci (Kremlová, 2019) vyhodnocen jako monomorfní.

Nalezla jsem celkem 32 párů primerů amplifikujících 34 hodnotitelných polymorfních lokusů. Z 32 párů primerů poskytujících polymorfní produkt bylo 17 původně navrženo pro amplifikaci mikrosatelitů u zástupců z řádu tučňáci a 15 párů primerů bylo původně navrženo pro amplifikaci univerzálních ptačích mikrosatelitů. Pár primerů amplifikujících mikrosatelitní lokus TG13-016 poskytl tři polymorfní produkty.

U všech hodnotitelných mikrosatelitních lokusů jsem stanovila počet a konstituci alel u 21 nepříbuzných jedinců pelikána bílého. Celkově jsem tedy prostřednictvím programu Cervus 3.0.7 charakterizovala 33 vzájemně nezávislých mikrosatelitních lokusů, s průměrným počtem alel na lokus 3,7. Za použití programu Genepop 4.7.5 jsem následně ověřila možnou vazbu mezi všemi dvojicemi lokusů a zjistila jsem, že lokus Ech113 je ve vazbě s lokusem TG04-012. Nalezla jsem také dva, respektive čtyři, lokusy vázané na pohlavní chromozom Z (Ech113, první polymorfní oblast lokusu TG13-016, CAM11 a TG04-012).

Společně se 34 mikrosatelity charakterizovanými v této diplomové práci je pro pelikána bílého v současné době nalezeno 164 polymorfních lokusů (159 párů primerů), z nichž 117 je již statisticky charakterizováno na souboru 21 nepříbuzných jedinců a dalších 47 polymorfních mikrosatelitů (46 párů primerů) je potřeba v budoucnu ještě charakterizovat.

8 Literární zdroje

- Abdul-Muneer** PM (2014): Application of microsatellite markers in conservation genetics and fisheries management: Recent advances in population structure analysis and conservation strategies. *Genetics Research International*, 2014: 1–11.
- Ahmed** S, Hart T, Dawson DA, Horsburgh GJ, Trathan PN, Rogers AD (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.
- Bartoňková** I (2013): Analýza a charakteristika polymorfních *cross-species* mikrosatelitů u pelikána bílého (*Pelecanus onocrotalus*) a pelikána skvrnozobého (*P. philippensis*). Diplomová práce. Depon in: Knihovna biologických oborů PřF UPOL Olomouc.
- Billing** TM, Guay PJ, Peucker AJ, Mulder RA (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.
- Britten** RJ, Davidson EH (1971): Repetitive and non-repetitive DNA sequences and a speculation on the origins of evolutionary novelty. *The Quarterly Review of Biology*, 46: 111–138.
- Buržáková** K (2011): Analýza vybraných polymorfních *cross-species* mikrosatelitů pro determinaci paternity u pelikána bílého (*Pelecanus onocrotalus*) a pelikána skvrnozobého (*P. philippensis*). Bakalářská práce. Depon in: Knihovna biologických oborů PřF UPOL Olomouc.
- Butler** JM (2007): Short tandem repeat typing technologies used in human identity testing. *BioTechniques*, 43: 2–5.
- Cracraft** J (1985): Monophyly and phylogenetic relationship of the Pelecaniformes: A numerical cladistic analysis. *The Auk*, 102: 834–853.
- Danckwerts** D, Corré S, Pinet P, Corre M, Humeau L (2016): Isolation and Characterization of 15 Polymorphic Microsatellite Loci for the Barau's Petrel

(*Pterodroma barau*), an Endangered Endemic of Réunion Island (Indian Ocean). *Waterbirds*, 39: 413–416.

- Dawson DA**, Horsburgh GJ, Küpper C, Stewart IRK, Ball AD, Durrant KL, Hansson B, Bacon I, Bird S, Klein A, Krupa AP, Lee JW, Martín-Gálvez D, Simeoni M, Smith G, Spurgin LG, Burke T (2010): New methods to identify conserved microsatellite loci and develop primer sets of high cross-species utility - as demonstrated for birds. *Molecular Ecology Resources*, 10: 475–494.
- Dawson DA**, Ball, AD, Spurgin LG, Martín-Gálvez D, Stewart IR, Horsburgh GJ, Potter J, Molina-Morales M, Bicknell AWJ, Preston SAJ, 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.
- de Angelis GL**, Bottarelli L, Azzoni C, De' Angelis N, Leandro G, Di Mario F, Gaiani F, Negri F (2018): Microsatellite instability in colorectal cancer. *Acta Bio-medica*, 89: 97–101.
- de Ponte Machado M**, Feldheim K, Sellas A, Bowie R (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**, Collar NJ, Christie DA, Elliott A, Fishpool LDC (2014): HBW and BirdLife International Illustrated Checklist of the Birds of the World, Volume 1 (Non-passerines), *Lynx Edicions*. Barcelona.
- Dickinson EC**, Remsen JV (Eds.) (2013): The Howard and Moore Complete Checklist of Birds of the World. Volume 1 (Non-passerines), *Aves Press*. Eastbourne.
- Ellegren H** (2000): Microsatellite mutations in the germline: implications for evolutionary inference. *Trends in Genetics*, 16: 551–558.
- Ellegren H** (2004) Microsatellites: simple sequences with complex evolution. *Nature Reviews Genetics*, 5: 435–445.
- Ellegren H**, Primmer CR, Sheldon B (1995): Microsatellite evolution: Directionality or bias in locus selection? *Nature Genetics*, 11: 60–62.
- Ericson PG**, Anderson CL, Britton T, Elzanowski A, Johansson US, Källersjö M, Ohlson JI, Parsons TJ, Zuccon D, Mayr G (2006): Diversification of Neoaves: integration of molecular sequence data and fossils. *Biology Letters*, 2: 543–547.

- Farrell L**, Dawson D, Horsburgh G, Burke T, Lank D (2012): Isolation, characterization and predicted genome locations of ruff (*Philomachus pugnax*, AVES) microsatellite loci. *Conservation Genetics Resources*, 4: 763–771.
- Fazekas AJ**, Steeves R, Newmaster SG (2010): Improving sequencing quality from PCR products containing long mononucleotide repeats. *BioTechniques*, 48: 277–285.
- Field D**, Wills C (1996): Long, polymorphic microsatellites in simple organisms. *Proceedings of the Royal Society of London Series B, Biological Sciences*, 263: 209–215.
- 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.
- Gajdošiková T** (2020): *Cross-species* amplifikace mikrosatelitů z řádu tučňáci a konzervovaných ptačích mikrosatelitů u čápa bílého (*Ciconia ciconia*). Bakalářská práce. Depon in: Knihovna biologických oborů PřF UPOL Olomouc.
- Gemayel R**, Cho J, Boeynaems S, Verstrepen KJ (2012): Beyond Junk-Variable Tandem repeats as facilitators of rapid evolution of regulatory and coding sequences. *Genes*, 3: 461–480.
- Gravley M**, Sage G, Ramey A, Hatch S, Gill V, Rearick J, Petersen A, Talbot S (2019): Development and characterization of polymorphic microsatellite markers in northern fulmar, *Fulmarus glacialis* (Procellariiformes), and *cross-species* amplification in eight other seabirds. *Genes and Genomics*, 41: 1015–1026.
- Grosser S**, Waters JM (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 RJ (2011): Current trends in microsatellite genotyping. *Molecular Ecology Resources*, 11: 591–611.
- Hackett SJ**, Kimball RT, Reddy S, Bowie RCK, Braun EL, Braun MJ, Chojnowsk JL, Cox WA, Han K-L, Harshman J, Huddleston CJ, Marks BD, Miglia KJ, Moore WS, Sheldon FH, Steadman DW, Witt CC, Yuri T (2008): A phylogenetic study of birds reveals their evolutionary history. *Science*, 320: 1763–1767.
- Hancock JM** (1996): Simple sequences in a 'minimal' genome. *Nature Genetics*, 14: 14–15.

- Harr B**, Zangerl B, Schlötterer C (2000): Removal of microsatellite interruptions by DNA replication slippage: phylogenetic evidence from *Drosophila*. *Molecular Biology and Evolution*, 17: 1001–1009.
- Hasegawa O**, Ishibashi Y, Abe S (2005): Polymorphic microsatellite DNA markers for the rhinoceros auklet (*Cerorhinca monocerata*). *Molecular Ecology Notes*, 5: 637–638.
- Hedges SB**, Sibley CG (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.
- Hickman CR**, Peters, MB, Crawford NG, Hagen C, Glenn TC, Somers CM (2008): Development and characterization of microsatellite loci in the American white pelican (*Pelecanus erythrorhynchos*). *Molecular Ecology Resources*, 8: 1439–1441.
- 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.
- Jakupciak JP**, Wells RD (2000): Gene conversion (recombination) mediates expansions of CTG·CAG repeats. *Journal of Biological Chemistry*, 275: 40003–40013.
- Jarne P**, Lagoda P (1996): Microsatellites, from molecules to populations and back. *Trends in Ecology and Evolution*, 11: 424–429.
- Jarvis ED**, Mirarab S, Aberer AJ, Li B, Houde P, Li C, Ho SYW, Faircloth BC, Nabholz B, Howard JT, Suh A, Weber CC, da Fonseca RR, 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 WC, Ray D, Green RE, Bruford MW, Zhan X, Dixon A, Li S, Li N, Huang Y, Derryberry EP, Bertelsen MF, Sheldon FH, Brumfield RT, Mello CV, Lovell PV, Wirthlin M, Schneider MPC, Prosdocimi F, Samaniego JA, Velazquez AMV, Alfaro- Núñez A, Campos PF, Petersen B, Sicheritz-Ponten T, Pas A, Bailey T, Scofield P, Bunce M, Lambert DM, Zhou Q, Perelman P, Driskell AC, 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 FE, Braun M, Fjeldsa J, Orlando L, Barker FK, Jønsson KA, Johnson W, Koepfli KP, O'Brien S, Haussler D, Ryder OA, Rahbek C, Willerslev E, Graves GR, Glenn TC, McCormack J, Burt D, Ellegren H, Alström P, Edwards SV, Stamatakis A,

- Mindell DP, Cracraft J, Braun EL, Warnow T, Jun W, Gilbert MTP, Zhang G (2014): Whole-genome analyses resolve early branches in the tree of life of modern birds. *Science*, 346: 1320–1331.
- Jeyasingham** W, Taylor S, Zavalaga C, Simeone A, Friesen V (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.
- Jurka** J, Kapitonov VV, Kohany O, Jurka MV (2007): Repetitive sequences in complex genomes: structure and evolution. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, 8: 241–259.
- Kalinowski** S, Taper M, Marshall T (2007): Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. *Molecular Ecology*, 16: 1099–1106.
- Kang** S, Jung JW, Ahn DH, Lee JE, Kim JH, Park H (2015): Isolation and characterization of polymorphic microsatellite loci from the Chinstrap penguin, *Pygoscelis antarctica*. *Conservation Genetics Resources*, 7, 561–563.
- Kopečná** K (2020): Analýza a charakteristika vybraných polymorfních mikrosatelitů z řádů trubkonosí a tučňáci a konzervovaných ptačích mikrosatelitů u pelikána afrického (*Pelecanus rufescens*). Diplomová práce. Depon in: Knihovna biologických oborů PřF UPOL Olomouc.
- Košatová** K (2020): *Cross-species* amplifikace mikrosatelitů z řádu tučňáci a konzervovaných ptačích mikrosatelitů u čápa simbila (*Ciconia abdimii*). 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.
- Kuhl** H, Frankl-Vilches C, Bakker A, Mayr G, Nikolaus G, Boerno, ST, Klages S, Timmermann B, Gahr M (2020): An unbiased molecular approach using 3'UTRs resolves the avian family-level tree of life. *Molecular Biology and Evolution*, 38: 108–127.
- Küpper** C, Burke T, Székely T, Dawson DA (2008): Enhanced *cross-species* utility of conserved microsatellite markers in shorebirds. *BMC Genomics*, 9: 1–20.

- Labuschagne** C, van Wyk A, Kotzé A, Grober P, Dalton DL (2013): Isolation and characterization of species-specific microsatellite loci in African penguin (*Spheniscus demersus*). *Conservation Genetics Resources*, 5, 169–171.
- Lanham** UN (1947): Notes on the phylogeny of the Pelecaniformes. *The Auk*, 64: 65–70.
- Lillandt** BG, Bensch S, Hansson B, Wennerberg L, Von Schantz T (2002): Isolation and *cross-species* amplification of microsatellite loci in the Siberian jay (*Perisoreus infaustus*). *Hereditas*, 137: 157–160.
- Livezey** BC, Zusi RL (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.
- McCormack** JE, Harvey MG, Faircloth BC, Crawford NG, Glenn TC, Brumfield RT (2013): A phylogeny of birds based on over 1,500 loci collected by target enrichment and high-throughput sequencing. *PLoS One*, 8: 1–11.
- Mason** AS (2015): SSR Genotyping. *Methods in Molecular Biology*, 1245: 77–89.
- Mayer** G (2010): Metaves, Mirandornithes, Strisores and other novelties—a critical review of the higher-level phylogeny of neornithine birds. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*, 49: 58–76.
- McMillan** A, Bagley M, Evers D (2004): Characterization of seven polymorphic microsatellite loci in the Common Loon (*Gavia immer*). *Molecular Ecology Notes*, 4: 297–299.
- Mikulová** V (2010): Mikrosatelitové lokusy pro determinaci paternity u vybraných druhů pelikánů (*Pelecanus* spp.). Diplomová práce. Depon in: Knihovna biologických oborů PřF UPOL, Olomouc.
- Oliveira** EJ, Páduam JG, Zucchi MI, Vencovsky R, Vieira MLC (2006): Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. *Genetics and Molecular Biology*, 29: 294–307.
- Pechová** A (2014): *Cross-species* amplifikace mikrosatelitů z řádu tučňáci a konzervovaných ptačích mikrosatelitů u nesyta indomalajského (*Mycteria leucocephala*). Bakalářská práce. Depon in: Knihovna biologických oborů PřF UPOL Olomouc.
- Penhallurick** J, Wink M (2004): Analysis of the taxonomy and nomenclature of the Procellariiformes based on complete nucleotide sequences of the mitochondrial cytochrome b gene. *Emu*, 104: 125–147.

- Phumichai C, Phumichai T, Wongkaew A (2015):** Novel chloroplast microsatellite (cpSSR) markers for genetic diversity assessment of cultivated and wild *Hevea* rubber. *Plant Molecular Biology Reporter*, 33: 1486–1498.
- Primmer CR, Merilä J (2000):** A low rate of cross-species microsatellite amplification success in Ranid frogs. *Conservation Genetics*, 3: 445–449.
- Prum RO, Berv JS, Dornburg A, Field DJ, Townsend JP, Lemmon EM, Lemmon AR (2015):** A comprehensive phylogeny of birds (Aves) using targeted next-generation DNA sequencing. *Nature*, 526: 569–557.
- Ranochová A (2008):** Analýza mikrosatelitových lokusů pro determinaci paternity u vybraných druhů pelikánů. Diplomová práce. Depon in: Knihovna biologických oborů PřF UPOL, Olomouc.
- Reddy S, Kimball RT, Pandey A, Hosner PA, Braun MJ, Hackett SJ, Han KL, Harshman J, Huddleston CJ, Kingston S, Marks BD, Miglia KJ, Moore WS, Sheldon FH, Witt CC, Yuri T, Braun EL (2017):** Why Do Phylogenomic Data Sets Yield Conflicting Trees? Data Type Influences the Avian Tree of Life more than Taxon Sampling. *Systematic Biology*, 66: 857–879.
- Reudink M, Kyle CHJ, Nocera JJ, Oomen RA, Green MC, Somers CHM (2011):** Panmixia on a continental scale in a widely distributed colonial waterbird. *Biological Journal of the Linnean Society*, 102: 583–592.
- Roeder AD, Marshall RK, Mitchelson AJ, Visagathilagar T, Ritchie PA, Love DR, Lambert DM (2001):** Geneflow on the ice: genetic differentiation among Adélie penguin colonies around Antarctica. *Molecular Ecology*, 10, 1645–1656.
- Rousset F (2008):** GENEPOP'007: a complete re-implementation of the GENEPOP software for Windows and Linux. *Molecular Ecology Resources*, 8: 103–106.
- Rodrigues P, Micael J, Hernández C, Verdugo C (2017):** Characterisation of 11 Microsatellite DNA Markers from the Neotropic Cormorant (*Phalacrocorax Brasilianus*). *Avian Biology Research*, 10: 45–48.
- Sanger F, Coulson AR (1975):** A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *Journal of Molecular Biology*, 94: 441–448.
- Schlosser JA, Dubach JM, Garner TWJ, McElligott AG (2003):** Characterization of microsatellite loci in Humboldt penguin (*Spheniscus humboldti*) and cross-amplification in other penguin species. *Molecular Ecology Notes*, 3, 62–64.

- Schlosser** JA, Dubach JM, Garner TWJ, Araya B, Bernal M, Simeone A, Wallace RS (2009): Evidence for gene flow differs from observed dispersal patterns in the Humboldt penguin, *Spheniscus humboldti*. *Conservation Genetics*, 10, 839–849.
- Shammas** MA (2011): Repetitive sequences, genomic instability, and Barrett's esophageal adenocarcinoma. *Mobile Genetic Elements*, 1: 208–212.
- Sibley** CG, Ahlquist JE (1990): Phylogeny and Classification of the Birds. A Study of Molecular Evolution. *Yale University Press*, New Haven.
- Stoeckle** B, Theuerkauf J, Rouys S, Gula R, Lorenzo A, Lambert, CH, Kaeser T, Kuehn R (2012): Identification of polymorphic microsatellite loci for the endangered Kagu (*Rhynochetos jubatus*) by high-throughput sequencing. *Journal of Ornithology*, 153: 249–253.
- Suh** A, Smeds L, Ellegren H (2015): The Dynamics of Incomplete Lineage Sorting across the Ancient Adaptive Radiation of Neoavian Birds. *PLoS Biology*, 13: 1–18.
- 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.
- Tóth** G, Gáspári Z, Jurka J (2000). Microsatellites in Different Eukaryotic Genomes: Survey and Analysis. *Genome Research*, 10: 967–981.
- Turjeman** S, Centeno–Cuadros A, Nathan R (2016): Isolation and characterization of novel polymorphic microsatellite markers for the white stork, *Ciconia ciconia*: applications in individual–based and population genetics. *Animal Biodiversity and Conservation*, 39: 11–16.
- Verešová** D (2020): Analýza a charakteristika vybraných polymorfních mikrosatelitů z řádů trubkonosí a tučňáci a konzervovaných ptačích mikrosatelitů u pelikána kadeřavého (*Pelecanus crispus*) a u plameňáka růžového (*Phoenicopterus roseus*). Diplomová práce. Depon in: Knihovna biologických oborů PřF UPOL Olomouc.
- Vianna** JA, Noll D, Mura-Jornet I, Valenzuela-Guerra P, González-Acuña D, Navarro C, Loyola DE, Dantas GPM (2017): Comparative genome-wide polymorphic

- microsatellite markers in Antarctic penguins through next generation sequencing. *Genetics and Molecular Biology*, 40: 676–687.
- Vieira** M L, Santini L, Diniz A, De Munhoz C (2016): Microsatellite markers: what they mean and why they are so useful. *Genetics and Molecular Biology*, 39: 312–328.
- Welch** AJ, Olson SL, Fleischer RC (2014): Phylogenetic relationships of the extinct St. Helena petrel, *Pterodroma rupinarum* Olson, 1975 (Procellariiformes: Procellariidae), based on ancient DNA. *Zoological Journal of the Linnean Society*, 170: 494–505.
- Wetmore** A. (1960): A classification for the birds of the world. *Smithsonian Miscellaneous Collections*, 139: 1–37.
- Wirtz** S, Böhm C, Fritz J, Hankeln T, Hochkirch A (2016): Isolation of Microsatellite Loci by Next-Generation Sequencing of the Critically Endangered Northern Bald Ibis, *Geronticus eremita*. *Journal of Heredity*, 107: 363–366.

9 Příloha

Příloha č. 1: Charakteristika 34 polymorfních lokusů u 21 nepříbuzných jedinců pelikána bílého. Výstup z analýzy programem Cervus 3.0.7.

Lokus	k	N	H _{Obs}	H _{Exp}	PIC	NE-1P	NE-2P	NE-PP	NE-I	NE-SI	HW	F (null)
Ech008	5	21	0,333	0,530	0,482	0,854	0,693	0,516	0,268	0,559	NS	0,2137
Ech011	2	21	0,190	0,177	0,157	0,985	0,921	0,861	0,700	0,839	ND	-0,0432
Ech039	5	21	0,762	0,712	0,655	0,713	0,533	0,343	0,133	0,436	NS	-0,0346
Ech060	6	21	0,524	0,505	0,464	0,866	0,705	0,527	0,286	0,575	NS	-0,0174
Ech113	4	21	0,190	0,631	0,552	0,797	0,646	0,479	0,211	0,495	*	0,5470
Emm5	4	21	0,619	0,631	0,551	0,803	0,653	0,494	0,213	0,495	NS	-0,0149
Emm6	2	21	0,000	0,483	0,360	0,889	0,820	0,728	0,390	0,612	***	0,9991
AM13	3	21	0,571	0,595	0,490	0,832	0,714	0,576	0,267	0,526	NS	0,0118
PNN05	4	21	0,429	0,692	0,619	0,750	0,585	0,413	0,162	0,453	NS	0,2092
Sh2Ca21	2	21	0,286	0,251	0,215	0,970	0,893	0,819	0,600	0,778	ND	-0,0733
Sh2Ca49	3	21	0,476	0,612	0,531	0,821	0,676	0,524	0,229	0,508	NS	0,1046
Em8	7	21	0,762	0,780	0,727	0,628	0,449	0,261	0,092	0,392	NS	-0,0097
Em14	3	21	0,524	0,617	0,523	0,819	0,685	0,539	0,238	0,508	NS	0,0548
Em21	2	21	0,381	0,372	0,297	0,934	0,852	0,766	0,472	0,687	NS	-0,0244
Em23	4	21	0,429	0,645	0,560	0,790	0,643	0,482	0,207	0,487	NS	0,1986
Pyga11	2	21	0,190	0,177	0,157	0,985	0,921	0,861	0,700	0,839	ND	-0,0432
Pyga19	2	21	0,048	0,048	0,045	0,999	0,977	0,956	0,910	0,954	ND	-0,0046

Příloha č. 1: Pokračování.

Lokus	k	N	H_{Obs}	H_{Exp}	PIC	NE-1P	NE-2P	NE-PP	NE-I	NE-SI	HW	F (null)
TG01-114	2	21	0,190	0,177	0,157	0,985	0,921	0,861	0,700	0,839	ND	-0,0432
TG01-148	2	21	0,095	0,093	0,087	0,996	0,957	0,919	0,831	0,912	ND	-0,0152
TG03-031	2	21	0,048	0,048	0,045	0,999	0,977	0,956	0,910	0,954	ND	-0,0046
TG03-098	7	21	0,857	0,814	0,766	0,576	0,398	0,214	0,071	0,370	NS	-0,0356
TG04-012	8	21	0,762	0,724	0,663	0,694	0,520	0,328	0,129	0,429	NS	-0,0358
TG04-061	7	21	0,810	0,811	0,766	0,575	0,395	0,207	0,069	0,372	NS	-0,0067
TG08-24(1)	4	21	0,238	0,261	0,240	0,967	0,868	0,767	0,570	0,765	ND	0,0868
TG13-016-1	3	21	0,143	0,484	0,424	0,888	0,752	0,610	0,327	0,595	NS	0,5300
TG13-016-2	4	21	0,238	0,502	0,457	0,872	0,714	0,544	0,293	0,578	NS	0,3296
TG13-016-3	2	21	0,429	0,345	0,280	0,943	0,860	0,776	0,497	0,706	ND	-0,1189
TG13-017	4	21	0,619	0,664	0,593	0,771	0,608	0,435	0,179	0,471	NS	0,0304
CAM03	2	21	0,429	0,345	0,280	0,943	0,860	0,776	0,497	0,706	ND	-0,1189
CAM11	3	21	0,333	0,605	0,521	0,826	0,685	0,535	0,238	0,514	NS	0,2904
CAM17	7	21	0,619	0,816	0,766	0,579	0,401	0,221	0,072	0,369	NS	0,1261
CAM19	2	21	0,095	0,093	0,087	0,996	0,957	0,919	0,831	0,912	ND	-0,0152
CAM20	2	21	0,333	0,345	0,280	0,943	0,860	0,776	0,497	0,706	ND	0,0051
CAM24	5	21	0,905	0,659	0,594	0,768	0,600	0,418	0,176	0,473	NS	-0,2067

Legenda:

k	počet nalezených alel na lokus
N	počet testovaných jedinců
H _{Obs}	pozorovaná heterozygotnost
H _{Exp}	očekávaná heterozygotnost
PIC	vypovídací hodnota lokusu

NE-1P	pravděpodobnost chybného přiřazení prvního z rodičů k mláděti v případě, že není znám ani jeden z rodičů
NE-2P	pravděpodobnost chybného přiřazení druhého z rodičů k mláděti v případě, že je znám první z rodičů
NE-PP	pravděpodobnost chybného přiřazení rodičovského páru k mláděti
NE-I	pravděpodobnost výskytu stejné alelové konstituce všech polymorfních lokusů u dvou náhodně vybraných nepříbuzných jedinců
NE-SI	pravděpodobnost výskytu stejné alelové konstituce všech polymorfních lokusů u dvou příbuzných mláďat
HW	soulad/odchylka od Hardy-Weinbergovy rovnováhy
NS	lokus je v souladu s Hardy-Weinbergovou rovnováhou
ND	lokus nelze vyhodnotit, zda je nebo není v souladu s Hardy-Weinbergovou rovnováhou
*	signifikantní odchylka od Hardy-Weinbergovy rovnováhy na hladině významnosti 5 %
***	signifikantní odchylka od Hardy-Weinbergovy rovnováhy na hladině významnosti 0,1 %
F (null)	frekvence výskytu nulových alel

Number of individuals:	21
Number of loci:	34
Mean number of alleles per locus:	3,706
Mean proportion of loci typed:	1,0000
Mean expected heterozygosity:	0,4777
Mean polymorphic information content (PIC):	0,4233
Combined non-exclusion probability (first parent):	0,00218942
Combined non-exclusion probability (second parent):	0,00000634
Combined non-exclusion probability (parent pair):	$1,557 \cdot 10^{-9}$
Combined non-exclusion probability (identity):	$1,003 \cdot 10^{-18}$
Combined non-exclusion probability (sib identity):	0,00000001