

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Katedra zoologie



DIPLOMOVÁ PRÁCE

**Příprava mikrosatelitových markerů pro studium
koroptve polní (*Perdix perdix*)**

**Development of Grey Partridge (*Perdix perdix*)
microsatellite markers**

Bc. Dominika Vaněčková

Vedoucí práce: Mgr. Pavel Munclinger, PhD.

Praha 2011

Prohlašuji, že diplomovou práci jsem vypracovala samostatně s použitím uvedené literatury,
pod vedením školitele práce.

Praha 26.8. 2011

Dominika Vaněčková

Poděkování

Na tomto místě bych chtěla poděkovat především svému školiteli, Pavlu Munclingerovi, za jeho bezbřehou trpělivost, bez které by tato diplomová práce nikdy neměla šanci na vznik. Rovněž bych chtěla poděkovat Evě Duškové, která mě zasvětila do tajů izolace mikrosatelitových markerů.

Tento projekt byl finančně podpořen grantem „Složky pohlavního výběru monogamního kura koroptve polní“ (GAČR 206/08/1281).

Obsah

Abstrakt	6
Abstract	7
1. Úvod	8
1.1. Koroptev polní (<i>Perdix perdix</i>)	11
1.2. Mikrosatelity	14
1.3. Analýza paternity	15
1.4. Cíle práce	16
2. Materiál a metodika	17
2.1. Izolace DNA	17
2.2. Primery pro PCR reakci	17
2.3. Izolace specifických mikrosatelitů pro koroptev polní (<i>Perdix perdix</i>)	19
2.4. Celkový set lokusů pro další analýzy	21
2.5. Analýza paternity	22
2.6. Analýza dat	24
2.7. Stanovení haplotypů mtDNA control region 1 (CR1)	28
3. Výsledky	31
3.1. Charakteristika lokusů	32
3.2. Charakteristika populací	33
3.2.1. Základní charakteristiky	33
3.2.2. Allelic richness	36
3.2.3. Privátní alely	37

3.2.4. F_{IS} (koeficient inbreedingu)	38
3.2.5. AMOVA (analýza molekulární variance)	39
3.2.6. Párové Φ_{ST} mezi populacemi	40
3.2.7. AFC (korespondenční faktoriální analýza)	41
3.2.8. Hodnoty optimálního K	42
3.2.8.1. delta K	42
3.2.8.2. delta F_{ST}	43
3.2.8.3. Ln P(D)	44
3.2.8.4. Similarity coefficient	44
3.2.8.5. Coefficient of clusteredness	45
3.2.9. Distruct	46
3.2.10. Efektivní velikost populace (N_e)	47
3.3. Analýza paternity	49
3.4. Haplotypy oblasti control region 1 mtDNA koroptve polní (<i>P. perdix</i>)	53
3.4.1. Median joining network haplotypů mtDNA koroptve polní (<i>Perdix perdix</i>)	54
4. Diskuze	55
4.1. Mikrosatelity pro studium koroptve polní (<i>Perdix perdix</i>)	55
4.2. Pokles stavů koroptve polní (<i>Perdix perdix</i>)	56
4.3. Mitochondriální linie koroptve polní (<i>Perdix perdix</i>)	57
4.4. Extrapárové kopulace a analýza paternity	58
5. Závěr	62
6. Použitá literatura	63

7. Přílohy	69
Příloha č. 1: Izolace mikrosatelitů a designování mikrosatelitových primerů	69
Příloha č. 2: Sekvence mikrosatelitů	77
Příloha č. 3: Seznam mikrosatelitových lokusů z cross-species amplifikace	79
Příloha č. 4: Seznam specifických mikrosatelitových lokusů izolovaných <i>de novo</i>	80
Příloha č. 5: Genotypy adultů, lokusy z cross-species amplifikace	81
Příloha č. 6: Genotypy adultů, nové lokusy	84
Příloha č. 7: Vazebná nerovnováha (linkage disequilibrium)	87
Příloha č. 8: Genotypy mláďat a rodičů	91
Příloha č. 9: Seznam haplotypů, které byly použity pro tvorbu haplotypové sítě	100
Příloha č. 10: Sekvence haplotypů mtDNA námi studovaných jedinců	102
Příloha č. 11: Variabilní místa haplotypů control region 1 mtDNA (CR 1)	103

Abstrakt

Cílem mé práce byla konstrukce setu mikrosatelitových markerů pro koroptev polní (*Perdix perdix*). Podařilo se mi vyizolovat sedm nových mikrosatelitů specifických pro tento druh a další lokusy jsem pak převzala od blízce příbuzných druhů ze třídy hrabavých (*Galliformes*). Celkově jsem tak získala set 18ti lokusů, který jsem následně použila k otestování charakteristik populační struktury tří studovaných populací koroptví ze Stodůlek, Písecka a Milešína. Analýza ukázala jasnou strukturovanost populací a překvapivě malé (menší než 100) efektivní populační velikosti. Vybraných sedm mikrosatelitových lokusů jsem pak použila k provedení analýzy paternity u vybraného vzorku hnízd. V některých hnízdech se mi skutečně podařilo nalézt důkaz o existenci mimopárové paternity u tohoto domněle monogamního kura. Na závěr jsem na základě sekvenace kontrolní oblasti mitochondriální DNA několika vzorků z každé z populací dospěla k názoru, že studované populace koroptví náleží k západní linii mitochondriální DNA.

Klíčová slova: koroptev polní (*Perdix perdix*), mikrosatelity, efektivní velikost populace, paternita, mitochondriální DNA

Abstract

The aim of this work was the construction of set of microsatellites for the Grey Partridge (*Perdix perdix*). I succeeded in isolation of seven new specific microsatellites. Another microsatellite markers were passed from close relative galliform species (*Galliformes*). On the whole I gained 18 microsatellite loci which were used for study of population characteristics of three partridge populations from Stodůlky, Písecko and Milešín. The analysis showed conspicuous structuredness of these populations and surprisingly low values (less than 100) of their effective population sizes. Seven of the microsatellites were chosen for analysis of paternity. Indeed I found the evidence of extrapair paternity in this putatively monogamous bird. Finally I conclude, on the basis of sequenation of mitochondrial control region that our populations belong to the western lineage of mitochondrial DNA.

Key words: Grey Partridge (*Perdix perdix*), microsatellites, effective population size, paternity, mitochondrial DNA

1. Úvod

Monogamie je charakterizována výlučnou asociací jednoho samce a jedné samice po nějaký definovatelný časový úsek jako je hnízdní období, reprodukční sezóna nebo dokonce celý život (Ligon, 1999). U ptáků je monogamie obvykle blízce svázána s biparentální rodičovskou péčí. Ta byla dříve považována za ancestrální rodičovský systém tohoto taxonu. Zdá se však, že ačkoli se v evoluční historii ptáků vskutku objevila velmi brzy, prapůvodním typem rodičovské péče byla výhradně péče otcovská (Ligon, 1999).

Jaké faktory tedy vedly k evoluci monogamie a s ní svázané biparentální péče u ptáků? Oring (1982) se domnívá, že klíčovými faktory jsou oviparie a endotermie, jejichž kombinace zvýšila potřebu intenzivní parentální péče. V mnoha případech tak může být péče obou rodičů naprosto zásadní pro úspěšné vyvedení mláďat.

Trivers (1972) vyjádřil na základě anisogamie, tedy faktu, že samičí gamety jsou větší a na produkci energeticky mnohem náročnější, než samčí spermie, dva předpoklady ohledně toho, jakou reprodukční strategii by měly volit odlišná pohlaví. Zatímco samci by se měli snažit získat co největší počet potenciálních partnerek a tím dosáhnout co možná největšího reprodukčního úspěchu co do počtu mláďat, samice by si měly pečlivě vybírat takové partnery, kteří jejich budoucím potomkům zajistí kvalitní genetickou výbavu.

Potom, co David Lack (1968) ve svém review prohlásil, že přes 90% ptačích druhů (9000+) je zjevně monogamních se silnými sociálními svazky a biparentální rodičovskou péčí, se zdálo, že ptáci jsou taxonem, který tyto teze od základů popírá. Avšak ukázalo se, že Triversova tvrzení nemohla být přesnější. Pokroky v molekulárních metodách posledních let nám umožnily přesvědčivě odhadovat rodičovské vztahy mezi jedinci a tudíž odhalit i doposud skryté reprodukční strategie ptáků. Navzdory Lackovu pohledu (1968) je už nyní obecně přijímán fakt, že pozorovaná sociální organizace nemusí odpovídat skutečnému genetickému reprodukčnímu systému. To podporuje i zjištění, že velký podíl zdánlivě sociálně monogamních druhů se ukázal být ve skutečnosti promiskuitní. Skutečná genetická monogamie (0% extrapárových paternit, EPP) byla prokázána pouze u méně než 25% sociálně monogamních druhů ptáků, které byly do té doby studovány (Griffith et al., 2002).

Kupříkladu mezi hrabavými (*Galliformes*), vysoce diversifikovanou skupinou, co se reprodukčních systémů týká, nalezneme velké procento druhů nemonogamních. Tato třída zahrnující šest rodin (Cramp & Simmons, 1987): *Phasianidae* (bažantovití), *Tetraonidae* (tetřevovití), *Numidiidae* (perličkovití), *Meleagrididae* (krocanovití), *Cracidae* (hokovití) a *Megapoiidae* (tabonovití) obsahuje nejméně jednu třetinu rodů vyznačující se polygamií či promiskuitou.

Jaké mají obě pohlaví důvody pro vkládání energie do mimopárových kopulací? Hlavní výhoda jakou díky nim obdrží samec je jasná. Je to prostředek k získání dalších mláďat, jimž navíc nemusí poskytovat žádnou rodičovskou péči. Ačkoli se původně předpokládalo, že vyhledávání extrapárových kopulací je doménou výhradně samců, ukázalo se, že i samice se mohou aktivně zapojovat, neboť i jim tato reprodukční strategie poskytuje mnohé benefity (Birkhead & Møller 1992; Jennions & Petrie, 2000; Yasui, 1998). Jedním z nich je obrana proti potenciální neplodnosti jejich sociálního partnera. Dalším pak získání geneticky kompatibilního samce anebo tzv. "dobrých genů". Pokud jsou spárované s nepříliš kvalitním samcem, mohou prostřednictvím extrapárových kopulací (EPC) získat pro své potomky geny od kvalitnějšího otce, přičemž jejich sociální partner mláďatům poskytne potřebnou rodičovskou péči. Díky páření s několika samci samice také zajišťuje svým potomkům genetickou diversitu, která je důležitá pro jejich přežívání. Jiným důvodem pak může být získání negenetických benefitů jako jsou například potravní či jiné zdroje, které vlastní mimopárový samec.

Griffith & Immler (2009) se domnívají, že obecným vysvětlením funkce extrapárových kopulací, je snaha samic získat geneticky kompatibilního samce jakožto otce jejich budoucích mláďat. Genetická kompatibilita jedinců je zajišťována prekopulačními, tedy behaviorálními, anebo postkopulačními mechanismy. U ptáků je postkopulační pohlavní výběr velmi silný, protože samice skladují sperma ještě nějakou dobu po kopulaci, tudíž se v jejím reprodukčním traktu může najednou nahromadit sperma od několika různých samců (Birkhead & Biggins, 1998). Výsledek kompetice spermií je u ptáků ovlivněn pořadím, v jakém samci se samicí kopulovali, a rovněž množstvím a kvalitou ejakulátu (Birkhead & Biggins, 1998; Parker, 1990). Samice mají schopnost detekovat genetickou kompatibilitu samčího spermatu za pomoci imunitního systému, který rozhodne o tom, který z ejakulátů bude přednostně uložen v jejím reprodukčním traktu a poslouží k oplození vajíček (Birkhead & Brillard, 2007).

Nekompatibilita dvou rodičovských genotypů může vyústit v řadu genetických důsledků od mortality embryí v časném stadiu vývoje po částečně anebo úplně sterilní jedince (Price & Bouvier, 2002). V zájmu samice tedy je, těmto efektům se vyhýbat. Pokud je samice spárovaná se samcem, který je jí geneticky nekompatibilní, bude se snažit získat prostřednictvím extrapárových kopulací pro svá mláďata jiného otce.

Na základě Griffitovi et al. (2002) studie se tedy zdá, že extrapárové kopulace jsou u ptáků poměrně obvyklým jevem, což by mohlo vést k závěrům, že skutečná genetická monogamie je velmi vzácná. Avšak studie dokázaly, že mnoho druhů skutečně geneticky monogamních je (Ligon, 1999). Nicméně pro mnoho domněle monogamních druhů dosud nebyly provedeny dostatečné výzkumy na to, aby se dala předpokládaná sociální monogamie s jistotou potvrdit anebo vyvrátit. Jedním z takových druhů je i koroptev polní (*Perdix perdix*). Dá se říci, že o její striktní monogamii zatím nebyly žádné pochyby, avšak na základě behaviorálních dat se zdá, že by tomu tak být nemuselo. Jak bude podrobněji popsáno v následující kapitole, koroptví populace se vyznačují nevyváženým poměrem pohlaví ve prospěch samců (Jenkins, 1961). Taková situace jen napomáhá výskytu extrapárových paternit, neboť mnoho samců zůstane z důvodu nedostatku samic nespárovaných a jejich jedinou šancí na reprodukci, je zplodit mláďata s již spárovanou samicí. Naopak samice tak mají šanci hodnotit jednotlivé samce a popřípadě si pro svá mláďata zvolit jiného otce, než je jejich sociální partner. Tyto vztahy se však dají velmi těžko spolehlivě odhadnout pouhým pozorováním chování jedinců, a proto se v posledních letech stále více spoléhá na molekulární metody.

1.1. Koroptev polní (*Perdix perdix*)

Koroptev polní (*Perdix perdix*) je druhem typickým pro travnaté stepi a kulturní krajinu temperátního klimatického pásma. Oblast jejího rozšíření zahrnuje Evropu a Asii, od Irska po Ural, vyjma Islandu a nejsevernějších oblastí Skandinávie a Ruska (Hudec & Šťastný, 2005). Koroptev polní byla úspěšně introdukována i do Severní Ameriky.

Evropský výskyt je rozdělen do dvou linií mitochondriální DNA (Liukkonen-Antilla, 2002), které jsou podle geografického původu označovány jako západní a východní (Obr.1) a shodují se s výskytem dvou poddruhů, *P.p. perdix* (Linnaeus, 1758) a *P.p. lucida* (Altmann, 1894). Výskyt těchto dvou mitochondriálních linií je odvozen od odlišných glaciálních refugií, které sloužily jako zdroj pro pozdější rekolonizaci Evropy. Po poslední době ledové byly zřejmě severní oblasti Evropy rekolonizovány z Pyrenejského a Balkánského poloostrova a východní oblasti měly refugium rovněž na Balkáně a na Kavkazu (Taberlet et al., 1998).



Obr.1: Evropský areál rozšíření koroptve polní (*Perdix perdix*). Koláčové grafy ukazují podíl východních a západních haplotypů mtDNA v dané oblasti. Šipky znázorňují možné postglaciální rekolonizační cesty těchto dvou linií. Převzato z Liukkonen-Anttila et al. (2002).

Koroptev polní (*Perdix perdix*) je monogamním druhem (Jenkins 1961) s dlouho trvajícím svazky a biparentální rodičovskou péčí (Potts, 1986).

V průběhu podzimu a zimy se ptáci zdržují v hejnech čítajících 5-15 jedinců (Jenkins, 1961). Základní jednotkou hejn jsou rodiny, avšak k nim se často přidružují i nespárovaní jedinci, kteří nebyli daný rok úspěšní při páření. Během ledna a února se hejna rozpadají a začíná párování. Pokud se opětovně ustavuje pár z minulého roku, formace páru se může odehrávat i v rámci hejna. Většinou však mladí samci opouští své mateřské hejno a vydávají se hledat potenciální partnerku v hejnech cizích. Pokud ji získají, odchází spolu pryč a zakládají rodinu. Starší ptáci se obvykle párují dříve. Mladí, toho roku poprvé se pářící jedinci, zpravidla několikrát změní partnera, než se utvoří definitivní pár (Jenkins, 1961).

Typickým znakem je u koroptví poměr pohlaví ve prospěch samců (Jenkins, 1961). Nadbytek samců během rozmnožovacího období vyústuje v množství nespárovaných jedinců, tzv. floaterů (Ligon, 1999), kteří se nomadicky pohybují od páru k páru a snaží se získat již spárovanou samici. Mnohdy se takoví samci k páru přímo přidruží a v jednom home range tak koexistují tři jedinci. Floateři jsou ve většině případů odehnáni původním samcem, někdy se jim však podaří uspět a samici získat. Alternativní strategií je čekat na svou příležitost a v případě smrti původního partnera ho okamžitě nahradit. Přítomnost nespárovaných samců v blízkosti samice vybízí k zamyšlení, zda jsou tyto ptáci skutečně striktně monogamní, jak je obvykle uváděno (Jenkins, 1961).

Po utvoření páru samice vybírá místo k hnízdění a oba budoucí rodiče společně staví hnízdo. Hnízdění probíhá jedenkrát do roka a to od dubna do začátku června. Koroptve mívají 12-20 vajec (Hudec & Šťastný, 2005), které inkubuje pouze samice (výjimečně i samec). Mláďata jsou nekrmová a velmi samostatná. Již dvě hodiny po vylíhnutí opouští hnízdo a ve věku čtrnácti dní jsou schopna letu.

Koroptev polní (*Perdix perdix*) je v současnosti uvedena na Červeném seznamu ohrožených druhů (Šťastný & Bejček, 2003) v kategorii druh téměř ohrožený. Rapidní pokles jejich stavů byl patrný zejména v 50. letech minulého století (Potts, 1986) a je přičítán především moderním zemědělským postupům (De Leo et al., 2004), jejichž vlivem dochází ke snížení potravní nabídky, ztrátě přirozených úkrytů a prostoru k hnízdění. V některých oblastech jako je například Irsko, Norsko a Švýcarsko je tento druh dokonce na pokraji vyhynutí (Aebischer & Kavanagh, 1997). Navzdory umělému odchovu a opakovaným reintrodukcím spolu s omezením jejich lovu, se dosud nepodařilo zvýšit jejich počty na původní hodnoty. Celoevropský pokles početnosti se nevyhnul ani České republice.

1.2. Mikrosatelity

Mikrosatelity neboli STRs (short tandem repeats) či SSRs (simple sequence repeats) jsou tandemově se opakující krátké úseky DNA o délce 1-6 bp (Oliveira et al., 2006). Jsou široce rozšířeny v genomech jak prokaryotických, tak eukaryotických organismů (Tóth et al., 2000) a vyskytují se v kódujících i nekódujících oblastech genomu. V převážné míře je nalezneme právě v nekódujících oblastech DNA a to zřejmě díky jejich vysoké mutační rychlosti. Ta se pohybuje od 10^{-2} do 10^{-6} nukleotidů na lokus a generaci (Sia et al., 2000). Změna v kódující oblasti by totiž mohla způsobit ztrátu funkce daného proteinu, který je touto oblastí kódován.

Funkce SSR nebyla donedávna příliš jasná a mikrosatelity se považovaly za evolučně neutrální genetické markery. Pravděpodobně však mají vliv např. na regulaci genové aktivity, organizaci chromatinu, rekombinaci, replikaci DNA či buněčný cyklus (Li et al., 2002).

Mikrosatelity jsou v současné době nejpoužívanějšími genetickými markery. Využívají se například v populační genetice, genetickém mapování a v neposlední řadě při parentálních analýzách. Mezi jejich hlavní přednosti patří značný stupeň polymorfismu v důsledku vysoké míry mutací, dědičnost na základě mendelistických zákonů, kodominance a poměrně snadná detekce založená na polymerázové řetězové reakci.

Mikrosatelity však mají i svou nevýhodu. Primery používané k amplifikaci mikrosatelitů jsou často druhově specifické tzn. primer fungující u jednoho druhu, nemusí fungovat u druhu jiného. Mikrosatelity je pak potřeba pro daný druh izolovat *de novo*, což může být finančně a časově náročné, obzvláště u druhů s malou frekvencí jejich výskytu jako jsou například ptáci (Primmer et al., 2011). V současnosti je vyvinuto několik technik izolace mikrosatelitů (Zane et al., 2002).

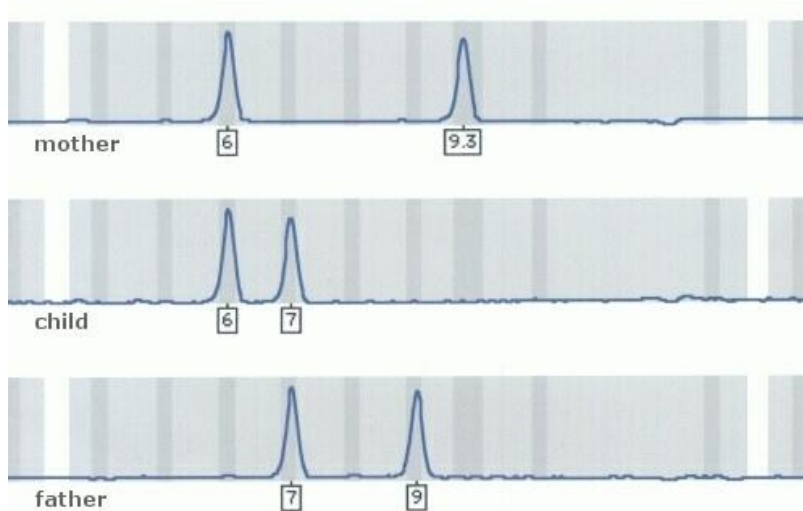
Druhou možností je použít primery navržené pro jiný blízký příbuzný druh. Tato vlastnost mikrosatelitů je označována jako transferabilita neboli cross-species amplifikace a je založena na homologní povaze tzv. flanking regions, což jsou jedinečné sekvence nukleotidů ohraničující mikrosatelit, kam při amplifikaci nasedá primer. Míra úspěšnosti amplifikace však klesá se vzrůstající fylogenetickou vzdáleností mezi druhy (Primmer et al. 1996).

Po koroptev polní (*Perdix perdix*) nebyly dosud nalezeny žádné specifické mikrosatelitové lokusy, které by mohly sloužit ke studiu tohoto druhu. Proto jsem se ve své práci zaměřila právě na tento úkol.

1.3. Analýza paternity

V minulosti byly používány nejrůznější metody k zjišťování paternity a jiných příbuzenských vztahů založené na polymorfismu chromozomů, elektroforetické separaci allozymů či DNA fingerprintingu. Teprve objev mikrosatelitových markerů (Tautz, 1989) však poskytl prostředek k vysoce spolehlivým metodám tohoto typu analýz.

Základní parentální analýzy jsou založeny na jednoduchém mendelistickém principu. Potomek by měl na každém sledovaném lokusu zdědit jednu alelu po matce a druhou po otci. Kombinace alel matky a otce by tedy měla vysvětlit všechny alely vyskytující se u daného mláděte (ačkoli někdy může být nesoulad způsoben vzácnou mutací) (Obr.2). Porovnáním genotypů potenciálních rodičů a genotypu potomka tak můžeme identifikovat skutečné biologické rodiče. Adult, který na daném lokusu nevlastní alelu nalezenou u potomka, může být jakožto jeho biologický rodič vyloučen. Zároveň se však musí počítat s možností, že shoda mezi potenciálním rodičem a potomkem je jen dílem náhody. To se může stát zejména na lokusech s malým množstvím alel, anebo u velmi častých alel na polymorfnějších lokusech. Vyloučení potenciálního rodiče jakožto skutečného biologického rodiče je tedy v zásadě poměrně snadné. Mnohem větší problém však spočívá v přiřazení rodičovství. Pro zvýšení spolehlivosti analýzy je nutné sledovat větší množství lokusů a teprve na jejich základě můžeme skutečně dosáhnout přesvědčivého výsledku.



Obr.2: Genotyp potomka je kombinací genotypů rodičů. Pokud potomek na daném lokusu vlastní alelu, která se u potenciálního rodiče nevyskytuje, můžeme tohoto jedince vyloučit jakožto biologického rodiče našeho mláděte.

1.4. Cíle práce

Pro koroptev polní (*Perdix perdix*) nejsou dosud známy specifické mikrosatelitové lokusy, a proto jsem se ve své práci rozhodla zaměřit právě na tento úkol. Rovněž bych chtěla odzkoušet lokusy od dalších druhů ze třídy hrabavých (*Galliformes*) a využít tak cross-species amplifikace, tedy možnosti amplifikovat DNA studovaného druhu pomocí primerů, které byly nadesignovány pro jiný blízce příbuzný druh. Získaným setem mikrosatelitových lokusů bych pak chtěla otestovat populační charakteristiky tří studovaných populací koroptví ze Stodůlek, Písecka a Milešína a rovněž provést paternální analýzu u vybraného vzorku hnízd, abych ověřila, zda u tohoto domněle monogamního druhu nenarazím na známky mimopárových kopulací.

Kromě práce s mikrosatelity se hodlám zabývat také mitochondriální DNA. Koroptev polní (*Perdix perdix*) se na území Evropy vyskytuje ve dvou liniích mtDNA a doposud není známo, ke které z nich české populace koroptví patří. Sekvenací náhodně vybraných vzorků ze tří studovaných populací získám povědomost o tom, jaké haplotypy se u našich koroptví objevují, a tedy ke které ze zmíněných linií mnou studované populace koroptví náleží.

2. Materiál a metodika

Námi použité vzorky pocházejí z jedinců ze tří populací koroptve polní (*Perdix perdix*), které se vyskytují v pražských Stodůlkách, na Písecku a na Moravě v okolí vesnic Milešín a Nová ves (Obr.3). Tyto vzorky byly sbírány v následujících letech: Stodůlky 2001-2003, Písecko 2003-2004 a Milešín 2009.



Obr.3: Mapa výskytu populací, z nichž pocházejí námi studovaní jedinci.

2.1. Izolace DNA

Vzorky DNA adultních jedinců pochází z krve odebrané z brachiální žíly. Pro získání DNA mláďat byla použita neinvazivní metoda, kdy se DNA izolovala z vnitřních membrán vajíček. Izolace byla provedena kitem DNeasy Blood and Tissue Kit podle originálního protokolu (Qiagen).

2.2. Primery pro PCR reakci

Pro další práci byly použity mikrosatelitové lokusy ze dvou zdrojů. Jednak lokusy od blízce příbuzných druhů studované koroptve polní (*Perdix perdix*). A za druhé námi nalezené mikrosatelitové lokusy specifické pro tento druh.

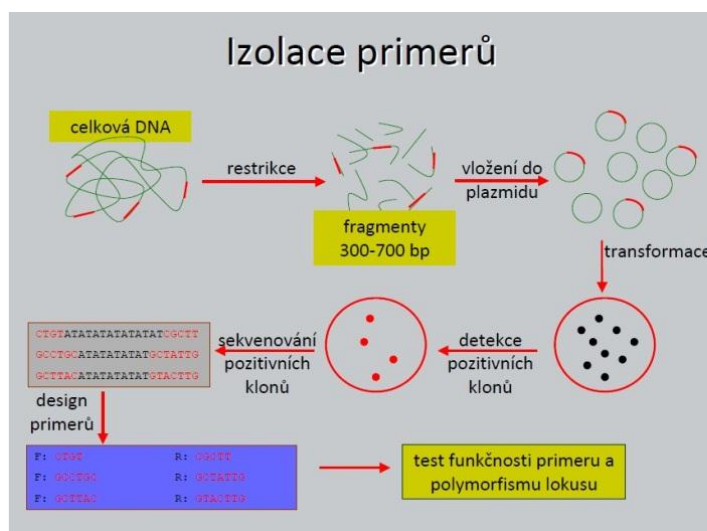
Ze 17 předběžně testovaných lokusů z cross-ampifikace bylo vyselektováno 11 z nich, které se ukázaly jako vhodné pro použití u námi studovaného druhu. Vyřazené lokusy buď vůbec nefungovaly, anebo byly nedostatečně polymorfní, nebo dokonce monomorfní. Deset z nich pochází od kura domácího (*Gallus gallus*): ADL0020, ADL0142, ADL0191, ADL0247, ADL0262, ADL0306, ADL0315, LEI0064, MCW0083 a MCW0230, z nichž dva byly izolovány i u krocana divokého (*Meleagris gallopavo*): ADL0306, MCW0230. Zbýlý lokus je znám od tetřívka pelyňkového (*Centrocercus urophasianus*). Lokusy pocházející od kura domácího jsou výsledkem projektu US Poultry genome project, který se zabývá mapováním genomu tohoto druhu (<http://poultry.mph.msu.edu>). V příloze č. 3 naleznete seznam lokusů s uvedenými sekvencemi primerů, jejich fluorescenčním značením, teplotou anealingu, počtem a velikostí alel. Rovněž jsou zde uvedeny reference prací, kde byly tyto mikrosatelitové lokusy uvedeny poprvé, a také jejich přístupové kódy do Genbanku.

Pro koroptev polní zatím nebyly objeveny specifické lokusy, a proto jsem přistoupila k jejich izolaci a následnému designování primerů.

2.3. Izolace specifických mikrosatelitů pro koroptev polní (*Perdix perdix*)

Níže zmíněný postup je podle protokolu pro Praktikum izolace mikrosatelitů a designování mikrosatelitových primerů (Dušková, 2009). Zde uvádím pouze zjednodušený princip použité metody (Obr.4). Podrobný protokol je součástí příloh této práce (příloha č. 1).

Základem je poměrně velké množství vstupní DNA, optimálně 6-10 μ l, o koncentraci 500-1000 ng/ μ l. Ta je za použití restrikčních enzymů rozštěpena. Následuje ligace, kdy se k rozštěpené DNA připojí adaptory, jež nám později umožní amplifikaci DNA fragmentů. DNA fragmenty jsou dále hybridizovány s mikrosatelitovými oligonukleotidy, které na svém 5' konci nesou biotin. Hybridizovanou denaturovanou DNA přidáme ke směsi magnetických streptavidinových kuliček, za jejichž pomoci dochází k vymytí fragmentů bez repetice. Tyto kuličky totiž na svém povrchu nesou streptavidin, na nějž se váže biotin, a mají tak schopnost vycytat fragmenty obsahující mikrosatelit. Následně se opět provede amplifikace a vzniklé produkty ligujeme do pGEM-Teasy vektoru. K ligační směsi přidáme kompetentní bakteriální buňky. Transformace vektoru do kompetentních buněk se uskuteční prostřednictvím teplotního šoku, při kterém se rozruší buněčná stěna a tudíž se do buněčné DNA může integrovat plazmid. Buňky poté vyséváme na LB ampicilinové agarové plotny a inkubujeme přes noc. Na plotnách nám tak narostlou bakteriální kolonie. Ty jsou buď bílé (obsahují insert), nebo modré (buňky bez insertu). Bílé kolonie pak použijeme do následné PCR reakce. Produkty s délkou v rozmezí 400-1100 bp jsou použity pro sekvenaci.



Obr.4: Zjednodušené schéma izolace mikrosatelitů a designování mikrosatelitových primerů (schéma převzato z prezentace k přednášce Využití molekulárních markerů v systematice a populační biologii rostlin-PřF UK).

K sekvenaci bylo celkem odesláno 384 bakteriálních kolonií. Sekvence byly osekvenovány oboustranně a z těchto dvojic pak byly v programu DNA-baser (<http://www.dnabaser.com/>) utvořeny contigy. Následně v nich byly programem Repeat-masker (<http://www.repeatmasker.org/>) vyhledány repetitivní sekvence. Vybrali jsme pak takové sekvence, ve kterých byly nalezeny pěkné repetitivní úseky, tedy dobře rozeznatelné nepřerušené sekvence daného motivu. Následně se musely ještě oříznout navázané adaptory, čímž se sekvence mnohdy o dost zkrátí, a proto se na závěr vyřadily sekvence, kde by před a za mikrosatelitovým úsekem nebylo dostatečné místo pro navázání primeru. Tímto způsobem se získalo celkem 41 sekvencí s mikrosatelity. Finálně je ale ještě potřeba zkontrolovat, zda nejsou tyto sekvence shodné, a proto se pomocí lokálního BLASTu na stránkách NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) jejich případná shoda ověřila. Tím se dospělo ke konečnému počtu 15 sekvencí s různými mikrosatelitovými úseky.

V programu primer3plus 3.0 (Rozen & Skaletsky, 1998) jsem poté navrhla primery (v rozmezí 100-300 bp) a vybrala jsem vhodné barevné značení (fluorescenční značení na 5' konci forward primeru, které umožňuje detekci při fragmentační analýze) tak, aby nekolidovalo s již existujícími lokusy známými z cross-amplifikace.

Získané primery byly otestovány na vzorcích DNA, která pocházela z dospělých jedinců ze všech tří studovaných lokalit, neboť u těch jsou vzorky obecně kvalitnější než u mláďat. Během testování se podle potřeby designovaly nové primery, anebo měnilo fluorescenční značení. U některých lokusů se vyskytl problém s výskytem poly-A konců (Ppe02, Ppe09), které jsou velmi nestabilní (Hancock, 1999). Byly pro ně proto nadesignovány reversní primery s navázaným GTTT-koncem.

Výsledkem bylo celkem 7 dobře fungujících lokusů, které pak byly použity do navazujících analýz: Ppe02, Ppe06, Ppe08, Ppe09, Ppe10, Ppe13, Ppe60. V příloze č. 2 jsou uvedeny sekvence těchto lokusů se zvýrazněnými repetitivními úseky. V příloze č. 4 pak seznam lokusů s uvedenými sekvencemi primerů, jejich fluorescenčním značením, teplotou anealingu, motivem opakování mikrosatelitu, počtem a velikostí alel.

2.4. Celkový set lokusů pro další analýzy

Získala jsem celkem 18 lokusů (11 z cross-species amplifikace a 7 izolovaných *de novo*), které byly vhodné pro další práci. Nejprve však bylo nutné provést časově náročnou optimalizaci daných primerů. Jako první byla zjištěna vhodná teplota anealingu pro každý pár primerů prostřednictvím teplotního gradientu. To bylo provedeno na termocycleru Eppendorf. Následně se lokusy na základě této teploty a fluorescenčního značení rozdělily do několika multiplexů. Výsledkem velkého množství testovaných kombinací jsou čtyři dobře fungující primerové multiplexy a jedna dvojice primerů, která byla ampifikována zvlášť, neboť tento lokus byl velice polymorfní a nejlépe fungoval samostatně (Ppe02).

Složení multiplexů, anealingové teploty a množství forward/reverse primerů (0,1mM) a vody jsou uvedeny v následujících tabulkách (Tab.1 a Tab.2).

Multiplex	T _{an}	Lokus	F/R primer	H ₂ O
multiplex 1	56°C	ADL0020	1	73
		ADL0142	1	
		ADL0191	1	
		ADL0315	4	
		MCW0083	0,5	
		MCW0230	3	
		LEI0064	3	
multiplex 2	52°C	ADL0247	0,5	92
		ADL0262	0,5	
		ADL0306	2	
		CGCA9	1	
multiplex 3	56°C	Ppe06	2	94
		Ppe08	0,5	
		Ppe60	0,5	
multiplex 4	52°C	Ppe09	0,5	96
		Ppe10	0,5	
		Ppe13	1	
samostatně	56°C	Ppe02	1	98

Tab.1: Multiplexy primerů použité k analýzám adultních jedinců.

2.5. Analýza paternity

Pro analýzu paternity jsme vybrali již jen sedm nejlepších lokusů, které fungovaly v jediném multiplexu, což velmi usnadnilo a urychlilo práci (Tab. 2). Pro lokus ADL0142 bylo změněno fluorescenční značení forward primeru, aby nekolidoval s jinými lokusy. Místo PET jsme použily VIC. Pro Ppe02 a Ppe09 byly objednány nové reverse primery s navázaným GTTT-koncem proti nestabilním poly-A koncům.

T_{an}	Lokus	F/R primer	H₂O
56°C	ADL0142	1	80
	LEI0064	3	
	MCW0230	3	
	Ppe02	1	
	Ppe09	0,5	
	Ppe10	0,5	
	Ppe13	1	

Tab.2: Multiplex primerů použitý k analýze paternity mládřat.

Bylo vybráno celkem 15 hnízd ze všech tří studovaných lokalit, u kterých byla známá identita buď obou rodičů, anebo alespoň matky (Tab.3).

HNÍZDO	LOKALITA	ROK
12	Nová ves	2009
20	Nová ves	2009
24	Nová ves	2009
34	Nová ves	2009
37	Milešín	2009
38	Nová ves	2009
39	Nová ves	2009
EVA	Písecko	2003
PM	Písecko	2003
PT	Písecko	2003
CT	Stodůlky	2002
KA	Písecko	2003
PL	Písecko	2003
PK	Písecko	2003
SM	Stodůlky	2003

Tab.3: Vybraná hnízda pro analýzu paternity.

PCR směs pro amplifikaci jsem připravila následujícím způsobem.

PCR směs pro 1 vzorek:

Master-mix type-it kit 4 μ l

primery (0,1mM) 1 μ l

Tuto směs jsem rozpipetovala po 5 μ l do jamek a přidala k ní 3 μ l DNA. Následovala PCR reakce v termocycleru MJ research.

Program termocycleru pro PCR reakci:

5 min.	95°C		
30 s	95°C	}	29x
1 min. 30 s	52/56°C		
30 s	72°C		
30 min.	60°C		

Následně jsem k PCR produktu přidala formamid a velikostní standard (Gene Scan 500 Liz Size Standard (Applied Biosystems)).

Směs pro 1 vzorek:

formamid 9 μ l

size standard 0,25 μ l

Tuto směs jsem rozpipetovala po 9 μ l a přidala k ní 1 μ l PCR produktu. Následně byla provedena denaturace při teplotě 95°C po dobu 2 min. (termocycler Eppendorf).

Fragmentační analýza byla provedena v sekvenačním centru PřF UK, Viničná 7 na sekvenátoru ABI Prism 3100 Avant Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

2.6. Analýza dat

Nejprve byly v programu GeneMarker 1.9 (<http://www.softgenetics.com>) odečteny délky alel jednotlivých lokusů. Tabulky v příloze č. 5 a 6 udávají ID jedince, lokalitu a rok sběru vzorku, pohlaví a genotypy na jednotlivých lokusech. Lokusy jsou rozděleny do dvou souborů na lokusy pocházející z cross-amplifikace (příloha č. 5) a lokusy nově získané (příloha č. 6). Celkem jsem zgenotypovala 96 adultů. Do dalších analýz jsem využila 80 z nich, u kterých jsem získala genotypy na všech lokusech. Dále byly zpracovány vzorky mláďat z 18 hnízd. Tři hnízda byla však z analýz vyloučena z důvodů nekvalitní DNA. Ve výsledku jsem tedy získala genotypy 177 mláďat z 15ti hnízd z různých lokalit.

Základní charakteristiky lokusů byly zjištěny v několika programech. Cervus (Marshall et al., 1998; Kalinowski et al., 2007), byl použit k vypočítání množství alel na jednotlivých lokusech, očekávané a pozorované heterozygotnosti, Hardyho-Weinbergovy rovnováhy a frekvence nulových alel. Hodnota allelic richness pro jednotlivé lokusy byla získána programem FSTAT 2.9.3.2 (Goudet, 2001) a Genepop 4.0.10 (Rousset, 2008) poskytl údaje o vazebné nerovnováze (linkage disequilibrium) mezi páry lokusů (Markov chain parameters: dememorisation:1000, batches: 100, iterations per batch: 1000).

Korespondeční faktoriální analýza (AFC) umožňující mnohorozměrné zobrazení dat byla provedena programem Genetix 4.0.5.2. (Belkhir et al., 2004). Byla zvolena forma dvourozměrného grafu. Tentýž program poskytl i hodnotu koeficientu inbreedingu F_{IS} , který popisuje snížení heterozygotnosti v důsledku příbuzenského křížení.

GenAlEx 6.41 (Peakall & Smouse, 2006) jsme použili pro zjištění privátních alel, tedy alel, které se vyskytují pouze v jedné z populací. Dále pak k získání fixačního indexu F_{ST} , který opět popisuje snížení heterozygotnosti, tentokrát ale vlivem snížení toku genů mezi subpopulacemi, čímž jsou u nich fixovány odlišné alely. Na závěr byla provedena ještě analýza AMOVA, která vysvětluje míru genetické variability uvnitř a mezi populacemi.

Structure 2.3.1. (Pritchard et al., 2000) je program založený na hierarchické bayesiánské klastrovací analýze. Pritchard et al. (2000) vyvinul metodu postavenou na algoritmu MCMC (Markov chain Monte Carlo), která umožňuje klastrovat jedince do subpopulací a odhadovat pravděpodobnost jejich příslušnosti k jedné z populací (no-admixture model) nebo podíl příslušnosti k více populacím (admixture model). Existují tedy dva modely vztahující se k předpokládanému původu sledovaných jedinců. No-admixture

model předpokládá, že veškerý genetický materiál jedince pochází pouze z jedné z K-populací. Naproti tomu admixture model uvažuje i možnost, že jedinci mohou mít smíšený původ, tedy že jejich genetická výbava je odvozena v různých podílech z několika populací.

Počet testovaných K (tedy počet subpopulací, pro které je hledaná podpora v datech): 1-6, počet běhů programu pro každé K: 10, délka burn-in periody: 300 000 kroků a počet iterací: MCMC 600 000. Byl zvolen admixture a correlated allele frequencies model (předpokládá korelaci frekvencí alel mezi jednotlivými populacemi). Výsledné grafy byly upraveny a převedeny do názornější grafické podoby v programu Distruct 1.1 (Rosenberg, 2004).

Následně bylo potřeba ověřit, jaké K nejlépe vystihuje strukturovanost našich populací. K tomu byl použit program Corrsieve 1.6.-1. (Campana et al., 2011) a Structure-sum (volně stažitelný na stránkách University v Trosø <http://www2.uit.no>), což jsou programy pro zhodnocení výstupů programu Structure. Tyto programy nám graficky znázorní, jaké z námi zvolených K, nejlépe odpovídá skutečnosti. Program Corrsieve 1.6.-1. (Campana et al., 2011) se vyskytuje ve dvou verzích podle rozhraní, ve kterém je spouštěn. My jsme použily verzi pro Ruby (<http://www.mcdonald.cam.ac.uk/project/genetics/index/htm>). Ruby je volně stažitelný na <http://www.ruby-lang.org>.

Výsledky byly na závěr zpracovány v programu Distruct (Rosenberg et al., 2004), což je program designovaný pro práci s výstupy programu Structure (Pritchard et al, 2000). Každému jedinci je přidělen koeficient příslušnosti (membershift coefficient) v určité skupině (subpopulaci), což reprezentuje podíl jeho genetického materiálu, který má původ právě v této skupině (Rosenberg, 2004).

Detekci recentního bottlenecku ($2N_e-4N_e$ generací) a jeho vlivu na genetickou diversitu populací jsme provedli v programu Bottleneck 1.2.02. (Cornuet & Luikart, 1996). Populace, která v nedávné době prošla bottleneckem se projevuje redukcí počtu alel a heterozygotnosti. Vzácné alely se ale ztrácejí rychleji, než se snižuje heterozygotnost. Heterozygotnost (H_e) je tedy v takové populaci vyšší, než očekávaná heterozygotnost za předpokladu rovnovážného stavu mezi mutací a genetickým driftem (H_{eq}) (Cornuet & Luikart, 1996). Ta je totiž vypočítávána z aktuálního počtu alel v dané populaci. Nadbytek heterozygotnosti vyvolaný bottleneckem se udržuje pouze po krátkou dobu, než je opětovně ustanovena rovnováha mezi mutací a genetickým driftem. Detekovatelný je tedy pouze

takový bottleneck, který se odehrál v recentní době ($0,2N_e-4N_e$ generací) (Luikart & Cornuet, 1998).

Byl zadán two-phase mutační model (T.P.M.) a 1000 replikací. Výsledek Wilcoxonova testu byl však pro všechny tři populace nesignifikantní ($p\text{-value} > 0,05$), což mohlo být způsobeno nedostatečným množstvím polymorfních lokusů, které jsme měli k dispozici, anebo prostě tím, že se bottleneck odehrál již velmi dávno. Rozhodli jsem se proto použít jinou metodu.

Nejpoužívanější metodou pro odhad efektivní velikosti populace (N_e) byly ještě donedávna metody, které požadovaly dva a více údajů o populaci z různých časových období. Nové metody jako je například metoda založená na odhadu N_e na základě hodnot vazebné nerovnováhy (linkage disequilibrium) (Hill, 1981), vyžadují údaj pouze jeden. Tato metoda je použita programem LDNe (Waples & Do, 2008), který pro zjištění hodnot vazebné nerovnováhy využívá Burrowsovu statistiku Δ . V programu jsou zahrnuty dva modely odhadu N_e pro dva různé reprodukční systémy (Waples et al., 2006): náhodné páření versus trvalé páry (tj. monogamie). My jsme použili první zmíněný model. Program rovněž umožňuje zhodnocení efektů různých frekvencí alel tzn. poskytuje separátní odhady po vyloučení všech alel s frekvencí nižší než je jedna ze tří kritických hodnot ($P_{crit} = 0,05, 0,02$ a $0,01$). Efektivní velikost populace byla rovněž vypočítána za základě genotypů mláďat a jejich rodičů v programu Colony (Jones & Waples, 2010).

Základní parentální analýzy jsou založeny na jednoduchém mendelistickém principu. Potomek by měl na každém sledovaném lokusu zdědit jednu alelu po matce a druhou po otci. Kombinace alel matky a otce by tedy měla vysvětlit všechny alely vyskytující se u daného mláděte. Pokud by se u mláděte vyskytly alely, které jeho rodiče nevlastní, vedlo by to k závěrům, že předpokládání rodiče nejsou skutečnými biologickými rodiči a že mládě je výsledkem mimopárové paternity (pokud nesdílí žádnou alelu s otcem), anebo hnízdního parazitismu (pokud nesdílí alelu s matkou). Abychom však mohli se spolehlivostí říci, že tomu tak opravdu je, měla by se neshoda objevit alespoň na většině, ne-li na všech lokusech. Jinak totiž může být způsobena jinými příčinami jako jsou například vzácné mutace na daném lokusu či nulové alely.

Genotypy mláďat a předpokládaných rodičů jsem nejprve zkontrolovala okometricky. U hnízd, kde byla známá matka i otec, jsem ověřovala, zda obě alely mláděte na daném lokusu odpovídají kombinaci alel rodičů. U hnízd, kde byla známá jen matka, jsem se

pokusila zrekonstruovat genotyp otce a ověřit, že dané alely opravdu svědčí o přítomnosti jen jediného samce.

Výsledky okometrické kontroly jsme následně ověřili pomocí programu Colony (Jones & Wang, 2010), který rozděluje mláďata do x klastrů na základě jejich příbuznosti a přiřazuje jim nejpravděpodobnější rodiče. Analýzu jsme provedli dvakrát. Nejprve bez zadání matek jednotlivých hnízd, takže byl program nucen přiřadit mláďatům jak otce tak matku. (Touto cestou je možné zjistit přítomnost hnízdního parazitismu samic.) A poté se zadáním matek jednotlivých hnízd, tudíž byli přiřazováni pouze otci. Přiřazení matek, otců a sourozenců jednotlivým mláďatům jsme omezili vždy jen na jednu z populací (Stodůlky, Písecko, Milešín), ze které sledovaný jedinec pocházel.

Parametry zadané do programu byly následující: reprodukční systém samice/samce: polygamie; pravděpodobnost, že matka je zahrnuta v souboru samic: 0,95 (neboť známe matky všech hnízd), pravděpodobnost, že otec je zahrnut v souboru samců: 0,5 (neboť otce známe jen zhruba u poloviny hnízd); délka běhu: střední. Dále jsme udali přibližnou frekvenci nulových alel, která byla vypočítána na základě genotypů 80ti adultních jedinců, jež jsme používali pro prvotní testování lokusů, a 1% pravděpodobnost dalších chyb (mutace, špatně určený genotyp).

Jelikož program Colony (Jones & Wang, 2010) hledá nejpravděpodobnější možné řešení, průkaznost jeho výsledků jsme na závěr zkontrolovali v programu Kingroup v2_090501 (Konovalov et al., 2004). Tento program vzájemně porovnává genotypy jednotlivých mláďat a ověřuje, zda mají mláďata z jednoho hnízda jednoho nebo více otců. Testujeme tedy proti sobě dvě hypotézy, zda se jedná o úplné či poloviční sourozence. Parametry pro spuštění programu byly následující: H_0 =plní sourozenci (tzn. všechna mláďata z jednoho hnízda mají stejného otce) x H =poloviční sourozenci (mláďata z jednoho hnízda mají více než jednoho otce); počet simulovaných párů: 100 000.

2.7. Stanovení haplotypů mtDNA control region 1 (CR1)

Koroptev polní (*Perdix perdix*) se na území Evropy vyskytuje ve dvou liniích mitochondriální DNA, tzv. západním (MW) a východním (ME) kládu. Abychom zjistili, ke které z uvedených linií patří koroptve žijící na území České republiky, rozhodli jsme se osekvenovat oblasti control region 1 mtDNA několika náhodně vybraných vzorků.

Studie Luikkonen-Anttila et al. (2002) a Luikkonen (2006) nám poskytly známé haplotypy koroptve polní (*Perdix perdix*), které jsme zamýšleli použít do tvorby haplotypové sítě. Jejich seznam naleznete v příloze č. 9. Autoři měli k dispozici 227 (Luikkonen-Anttila et al., 2002) a 174 (Luikkonen, 2006) zvířat, u kterých osekvenovaly control region 1 (CR 1) mitochondriální DNA. Tato oblast čítá prvních 408 nukleotidů z celkových 1151 nukleotidů, jež tvoří celou kontrolní oblast (control region), a je nejvariabilnější doménou tohoto úseku DNA. Autoři touto cestou získali celkem 68 haplotypů (30 východních a 38 západních).

Haplotypy uvedené v jednom z článků (Luikkonen, 2006) jsou přístupné v GenBanku (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>), zatímco haplotypy z dřívější publikace zatím do GenBanku umístěny nebyly, a proto jsme si jejich sekvence museli odvodit sami na základě seznamu variabilních míst uvedených v této práci. Několik haplotypů ze zmíněných článků nebylo možno do tvorby haplotypové sítě zahrnout, neboť k tomuto účelu nebyly použity ani ve zdrojových studiích. Nevěděli bychom tedy, jaký počet jedinců pro daný haplotyp máme pro nákres haplotypové sítě použít.

Pro sekvenaci našich vzorků jsem použila primery převzaté ze studie Luikkonen-Anttila et al. (2002):

forward primer LPPGLU 5'CACTGTTGTTCTCAACTACAGG

reverse primer H414 5'GGTGTAGGGGGAAAGAATGGG

Rovněž program termocycleru pro PCR reakci pochází právě z této studie.

PCR směs pro 1 vzorek:

pufir	3 μ l
dNTPs (2mM)	3 μ l
MgCl ₂ (25 mM)	2,4 μ l
primer F LPPGLU (0,1 mM)	2 μ l
primer R H414 (0,1 mM)	2 μ l
Taq polymeráza	0,2 μ l
H ₂ O	7,4 μ l
DNA	10 μ l

Amplifikační směs jsem rozpipetovala po 20 μ l a přidala 10 μ l DNA.

Program termocycleru pro PCR reakci (termocycler Eppendorf):

2 min.	94°C	
1 min.	94°C	} 33x
30 s	59°C	
1 min.	72°C	
5 min.	72°C	

stálé udržení teploty 4°C

Odebrala jsem 5 μ l PCR produktů, přidala 5 μ l nanášecího pufu a nanesla na 2 % agarózový gel a pustila na 100 V. Po doběhnutí elektroforézy jsem gel vyfotila přístrojem Alpha Digi Dog. Vzorky, které ukázaly jasné proužky v oblasti 390 bp (Luikkonen-Anttila et al., 2002) byly odeslány na sekvenaci. Sekvence byla provedena na sekvenátoru ABI Prism 3100 Avant Genetic Analyzer (Applied Biosystems) v sekvenační laboratoři PřF UK, Viničná 7.

Osekvenováno bylo celkem 16 vzorků: 5 z Moravy, 7 z Písecka a 4 ze Stodůlek (Tab.4).

ID	Původ vzorku
34/8	Milešín
38/9	Milešín
38/10	Milešín
38/11	Milešín
38/12	Milešín
Pi1	Písecko
Pi2	Písecko
Pi3	Písecko
Pi4	Písecko
Pi7	Písecko
Pi8	Písecko
Pi26	Písecko
St64	Stodůlky
St65	Stodůlky
St69	Stodůlky
St94	Stodůlky

Tab.4: Vybrané vzorky k sekvenaci kontrolní oblasti 1 mtDNA.

Těchto 16 sekvencí bylo prohlédnuto a popřípadě poopraveno v programu CodonCode Aligner (<http://www.codoncode.com/aligner/>). Bylo zjištěno, že dohromady představují pouze pět odlišných haplotypů (jeden v Milešíně, dva na Písecku a rovněž dva ve Stodůlkách), proto se ze sekvencí náležejících ke shodnému haplotypu vytvořily contigy, se kterými jsme pak pracovali dál. Sekvence námi nalezených haplotypů jsou uvedeny v příloze č. 10.

Všechny sekvence (včetně 5 našich) jsme alignovaly v programu BioEdit 7.0.9. (<http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>) pomocí programu Clustal W (Thompson et al., 1994) a ve FaBoxu zkrátily na délku nejkratší z nich. V tomtéž programu jsme zkontrolovali, zda se naše haplotypy neshodují s jinými, již známými haplotypy.

Variabilní místa všech haplotypů byla vyhledána programem FaBox 1.35 (<http://users-birc.au.dk/biopv/php/fabox/>). Jsou uvedena v příloze č. 11.

Haplotypová síť byla vytvořena programem Network 4.6.0.0. (Bandelt et al., 1999) metodou median joining. Ta z daného souboru dat rekonstruuje všechny možné nejkratší a nejméně komplexní fylogenetické stromy. Takto získaná haplotypová síť byla na závěr ještě vyčištěna od nadbytečných spojnic a mediánových vektorů pomocí funkce MP (Polzin & Daneschmand, 2003).

3. Výsledky

Celkem jsem získala 18 lokusů, z nichž 11 pochází z cross-species amplifikace od blízce příbuzných druhů hrabavých (*Galliformes*) a 7 bylo nově vyizolováno specificky pro námi studovaný druh koroptev polní (*Perdix perdix*). Tyto lokusy byly testovány na jedincích pocházejících ze tří populací: Stodůlek, Písecka a Milešína. Celkem jsem zgenotypovala 96 adultů. Do dalších analýz jsem využila 80 z nich, u kterých jsem získala genotypy na všech lokusech. Dále byly zpracovány vzorky mládřat z 18ti hnízd. Čtyři hnízda byla však z analýz vyloučena z důvodů nekvalitní DNA. Ve výsledku jsem tedy získala genotypy 177 mládřat z 15 hnízd z různých lokalit.

Genotypy adultních jedinců jsou uvedeny v příloze č. 5 (lokusy z cross-species amplifikace) a příloze č. 6 (nové lokusy). Genotypy mládřat a jejich předpokládaných rodičů pak v příloze č. 8.

3.1. Charakteristika lokusů

V programu Cervus 3.0 (Marshall et al., 1998; Kalinowski et al., 2007) byl zjištěn počet alel na jednotlivých lokusech, pozorovaná a očekávaná heterozygotnost, Hardyho-Weinbergova rovnováha a frekvence nulových alel.

Lokus	k	N	HObs	HExp	HW	F(null)
ADL0191	2	86	0.081	0.079	ND	-0.0117
ADL0315	4	83	0.675	0.647	NS	-0.0306
MCW230	8	86	0.523	0.718	***	+0.1506
MCW0083	2	86	0.349	0.442	NS	+0.1146
ADL0020	5	86	0.616	0.675	NS	+0.0468
ADL0142	7	85	0.835	0.824	NS	-0.0088
LEI0064	14	85	0.871	0.902	NS	+0.0137
ADL0262	3	95	0.074	0.129	ND	+0.2640
CGCA9	5	94	0.457	0.673	***	+0.2000
ADL0247	2	95	0.558	0.502	NS	-0.0556
ADL0306	2	95	0.337	0.409	NS	+0.0942
Ppe02	22	96	0.917	0.921	NS	-0.0001
Ppe08	9	96	0.750	0.786	NS	+0.0228
Ppe60	6	96	0.698	0.665	NS	-0.0175
Ppe06	4	96	0.031	0.051	ND	+0.2068
Ppe10	5	92	0.446	0.517	NS	+0.0939
Ppe13	8	92	0.804	0.753	NS	-0.0343
Ppe09	6	92	0.685	0.666	NS	-0.0205

Tab.5: Charakteristika lokusů. Legenda: k-počet alel, N-počet jedinců, HObs-pozorovaná heterozygotnost, HExp-očekávaná heterozygotnost, HW-Hardyho-Weinbergova rovnováha (NS-neprůkazné, * ** *** stupně průkaznosti-málo, středně a vysoce průkazné, ND-nedefinovatelné), F(null)-frekvence nulových alel (signifikantní hodnoty > 0,05 jsou zvýrazněny tučně)

Počet alel na lokusech se pohyboval mezi 2 až 22 alelami. Nejpolymorfnejším lokusem je Ppe02. Očekávaná a pozorovaná heterozygotnost se pohybovala mezi 0,051-0,921 resp. 0,031-0,91. A frekvence nulových alel na jednotlivých lokusech se nacházela v rozmezí -0,0001 (Ppe02) - +0,2640 (ADL0262).

3.2. Charakteristika populací

3.2.1. Základní charakteristiky

Milešinská populace

Lokus	k	N	HObs	HExp	HW	F(null)
ADL0191	2	29	0.034	0.034	ND	-0.0026
ADL0315	3	28	0.500	0.495	NS	-0.0199
MCW230	8	29	0.586	0.785	NS	+0.1317
MCW0083	2	29	0.276	0.373	NS	+0.1407
ADL0020	5	29	0.724	0.699	NS	-0.0316
ADL0142	7	29	0.862	0.765	NS	-0.0771
LEI0064	12	29	0.828	0.859	NS	+0.0054
ADL0262	2	39	0.077	0.207	ND	+0.4465
CGCA9	5	39	0.385	0.434	NS	+0.0773
ADL0247	2	39	0.564	0.506	NS	-0.0606
ADL0306	2	39	0.154	0.226	ND	+0.1846
Ppe02	17	39	0.923	0.927	ND	-0.0048
Ppe08	6	39	0.692	0.698	NS	-0.0077
Ppe60	5	39	0.897	0.741	NS	-0.1028
Ppe06	3	39	0.026	0.076	ND	+0.3994
Ppe10	3	37	0.432	0.426	NS	-0.0073
Ppe13	8	37	0.838	0.778	NS	-0.0452
Ppe09	4	37	0.595	0.598	NS	-0.0167

Tab.6: Charakteristika populací – Milešín. Legenda: k-počet alel, N-počet jedinců, HObs-pozorovaná heterozygotnost, HExp-očekávaná heterozygotnost, HW-Hardyho-Weinbergova rovnováha (NS-neprůkazné, * ** *** stupně průkaznosti-málo, středně a vysoce průkazné, ND-nedefinovatelné), F(null)-frekvence nulových alel (signifikantní hodnoty > 0,05 jsou zvýrazněny tučně)

Hodnoty očekávané a pozorované heterozygotnosti se nacházeli mezi 0,0034-0,927 resp. 0,026-0,923. Frekvence nulových alel byla v rozmezí -0,0026 - +0,4465.

Písecká populace

Lokus	k	N	HObs	HExp	HW	F(null)
ADL0191	1	20	0.000	0.000	ND	ND
ADL0315	4	19	0.632	0.592	NS	-0.0648
MCW230	4	20	0.450	0.586	NS	+0.0879
MCW0083	2	20	0.350	0.296	ND	-0.0937
ADL0020	5	20	0.700	0.740	NS	+0.0241
ADL0142	6	20	0.800	0.697	NS	-0.0860
LEI0064	10	20	0.750	0.891	ND	+0.0769
ADL0262	2	20	0.050	0.050	ND	-0.0050
CGCA9	5	20	0.300	0.655	*	+0.3922
ADL0247	2	20	0.400	0.508	NS	+0.1061
ADL0306	2	20	0.400	0.467	NS	+0.0643
Ppe02	12	20	1.000	0.899	ND	-0.0686
Ppe08	6	20	0.700	0.745	NS	+0.0295
Ppe60	4	20	0.450	0.453	NS	+0.0229
Ppe06	1	20	0.000	0.000	ND	ND
Ppe10	4	19	0.158	0.329	ND	+0.3313
Ppe13	5	19	0.526	0.448	NS	-0.1341
Ppe09	4	19	0.737	0.559	NS	-0.1645

Tab.7: Charakteristika populací – Písecko. Legenda: k-počet alel, N-počet jedinců, HObs-pozorovaná heterozygotnost, HExp-očekávaná heterozygotnost, HW-Hardyho-Weinbergova rovnováha (NS-neprůkazné, * ** *** stupně průkaznosti-málo, středně a vysoce průkazné, ND-nedefinovatelné), F(null)-frekvence nulových alel (signifikantní hodnoty > 0,05 jsou zvýrazněny tučně)

Hodnoty očekávané a pozorované heterozygotnosti se pohybovaly mezi 0,05-0,899 resp. 0,05-1. Frekvence nulových alel byla v rozmezí -0,005 - +0,3922.

Stodůlecká populace

Lokus	k	N	HObs	HExp	HW	F(null)
ADL0191	2	37	0.162	0.151	ND	-0.0344
ADL0315	4	36	0.833	0.739	NS	-0.0722
MCW230	6	37	0.514	0.597	NS	+0.0735
MCW0083	2	37	0.405	0.505	NS	+0.1030
ADL0020	5	37	0.486	0.559	NS	+0.0657
ADL0142	7	36	0.833	0.832	NS	-0.0019
LEI0064	12	36	0.972	0.868	NS	-0.0654
ADL0262	3	36	0.083	0.082	ND	-0.0120
CGCA9	5	35	0.629	0.708	NS	+0.0574
ADL0247	2	36	0.639	0.504	NS	-0.1254
ADL0306	2	36	0.500	0.493	NS	-0.0141
Ppe02	9	37	0.865	0.816	NS	-0.0347
Ppe08	7	37	0.838	0.785	NS	-0.0387
Ppe60	5	37	0.622	0.612	NS	-0.0124
Ppe06	2	37	0.054	0.053	ND	-0.0058
Ppe10	4	36	0.611	0.658	NS	+0.0504
Ppe13	6	36	0.917	0.785	NS	-0.0854
Ppe09	5	36	0.750	0.682	NS	-0.0594

Tab.8: Charakteristika populací – Stodůlky. Legenda: k-počet alel, N-počet jedinců, HObs-pozorovaná heterozygotnost, HExp-očekávaná heterozygotnost, HW-Hardyho-Weinbergova rovnováha (NS-neprůkazné, * ** *** stupně průkaznosti-málo, středně a vysoce průkazné, ND-nedefinovatelné), F(null)-frekvence nulových alel (signifikantní hodnoty > 0,05 jsou zvýrazněny tučně)

Očekávaná a pozorovaná heterozygotnost dosahovala hodnot v rozmezí 0,053-0,868 resp. 0,054-0,972. Frekvence nulových alel byla mezi -0,0019 - +0,1030.

Odchyly od Hardyho-Weinbergovy rovnováhy mohou být způsobeny výskytem nulových alel, anebo tzv. Wahlundových efektem, který popisuje pokles heterozygotnosti v důsledku rozdělení populace na subpopulace.

Hodnoty vazebné nerovnováhy (linkage disequilibrium) mezi všemi kombinacemi dvojic lokusů v rámci studovaných populací jsou uvedeny v příloze č. 7.

3.2.2. Allelic richness

Allelic richness srovnává genetickou variabilitu nezávisle na počtu vzorků v jednotlivých populacích. V Milešíně bylo ovzorkováno 27, na Písecku 18 a ve Stodůlkách 35 jedinců.

	Milešín	Písecko	Stodůlky	všechny
ADL0191	1.667	1.000	1.990	1.839
ADL0315	2.990	4.000	4.000	3.989
MCW230	7.514	4.000	4.999	6.319
MCW0083	2.000	2.000	2.000	2.000
ADL0020	4.893	5.000	3.796	4.730
ADL0142	6.849	4.000	6.763	6.890
LEI0064	10.948	10.000	9.756	12.278
ADL0262	2.000	2.000	2.282	2.346
CGCA9	4.882	5.000	4.884	4.931
ADL0247	2.000	2.000	2.000	2.000
ADL0306	2.000	2.000	2.000	2.000
Ppe02	15.218	12.000	7.860	13.848
Ppe08	5.827	6.000	6.022	6.450
Ppe60	4.666	4.000	4.970	5.124
Ppe06	2.560	1.000	1.768	2.026
Ppe10	2.893	4.000	3.990	4.078
Ppe13	7.296	5.000	5.504	6.304
Ppe09	3.667	4.000	4.658	4.474

Tab.9: Allelic richness lokusů ve studovaných populacích.

Allelic richness dosahovala na lokusech celkově hodnot v rozmezí 1,839 (ADL0191)-13,848 (Ppe02). V jednotlivých populacích to bylo 1,667 (ADL0191)-15,218 (Ppe02) v Milešíně; 1,0 (ADL0191)-12,0 (Ppe02) na Písecku a 1,768 (Ppe06)-9,756 (LEI0064) ve Stodůlkách.

3.2.3. Privátní alely

Privátní alely jsou takové alely, které se vyskytují pouze v jedné z populací. V tabulce je uvedena délka alely, lokus, na kterém se vyskytuje, a její frekvence v dané populaci.

Populace	Lokus	Alela	Frekvence
Milešín	MCW230	265	0,148
Milešín	MCW230	275	0,019
Milešín	Ppe02	227	0,093
Milešín	Ppe02	252	0,037
Milešín	Ppe02	268	0,093
Milešín	Ppe02	272	0,019
Milešín	Ppe02	276	0,074
Milešín	Ppe02	301	0,037
Milešín	Ppe02	310	0,019
Milešín	Ppe02	318	0,019
Milešín	Ppe08	182	0,056
Milešín	Ppe06	181	0,037
Milešín	Ppe06	188	0,019
Milešín	Ppe13	171	0,019
Milešín	Ppe13	199	0,019
Písecko	Ppe02	264	0,056
Písecko	Ppe02	280	0,056
Písecko	Ppe02	284	0,028
Písecko	Ppe02	314	0,056
Písecko	Ppe08	185	0,083
Písecko	Ppe60	248	0,028
Písecko	Ppe10	281	0,028
Písecko	Ppe09	243	0,056
Stodůlky	LEI0064	286	0,114
Stodůlky	Ppe02	260	0,057
Stodůlky	Ppe08	176	0,014
Stodůlky	Ppe08	183	0,014
Stodůlky	Ppe06	183	0,029
Stodůlky	Ppe09	251	0,043

Tab.10: Privátní alely v jednotlivých populacích.

3.2.4. F_{IS} (koeficient inbreedingu)

Koeficient inbreedingu F_{IS} popisuje snížení heterozygotnosti v důsledku příbuzenského křížení. Může nabývat hodnot od -1 (v populaci se nevyskytují žádné homozygoti) do +1 (v populaci se nevyskytují žádné heterozygoti). Čím vyšších hodnot tedy tato statistika nabývá, tím větší je pravděpodobnost výskytu inbreedingu.

Populace	F_{IS}
Milešín	0.05253
Písecko	0.07616
Stodůlky	-0.03080

Tab.11: Koeficienty inbreedingu (F_{IS}) studovaných populací.

Hodnoty statistiky F_{IS} dosahovaly u našich populací nízkých hodnot, což naznačuje, že tyto populace nejsou ohroženy výskytem příbuzenského křížení.

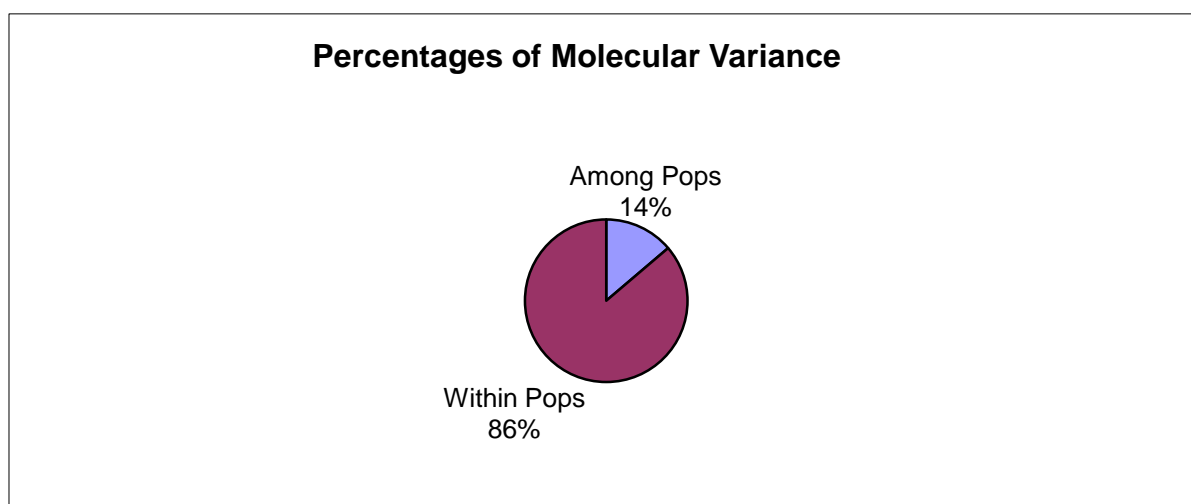
3.2.5. AMOVA (analýza molekulární variance):

Analýza AMOVA znázorňuje procentuální rozdělení variability uvnitř a mezi populacemi.

Zdroj variability	d.f.	Odhad variability	% variability
mezi populacemi	2	1,621	14%
uvnitř populací	77	10,143	86%
celková hodnota	79	11,764	100%

Statistika	Hodnota	Průkaznost
F_{ST}	0,138	0,000

Tab.12: Výsledky analýzy molekulární variance.



Graf 1: AMOVA. Vysvětlení genetické variability uvnitř a mezi populacemi.

V koláčovém grafu (Graf 1) vidíme, že 86% genetické variability je vysvětleno variabilitou uvnitř populací, zatímco pouze 14% vysvětluje rozdělení na populace.

F_{ST} (fixační index) popisuje snížení heterozygotnosti v důsledku rozdělení populace na subpopulace. Snížení toku genů mezi nimi vede k fixaci odlišných alel v těchto populacích. Může nabývat hodnot 0 (absence genetické diferenciace) až 1 (úplná genetická diferenciace). Stupně diferenciace jsou následující (Wright, 1978): $< 0,05$ slabá, $0,05-0,15$ střední, $0,15-0,25$ silná a $> 0,25$ velmi silná.

Hodnota této statistiky svědčí o střední genetické diferenciaci a je jednoznačně průkazná.

3.2.6. Párové Θ_{ST} mezi populacemi

Párové Θ_{ST} bylo vypočítáno podle Weir & Cockerham (1984). Vzájemně jsme porovnali studované populace, abychom mohli posoudit míru jejich genetické diferenciace.

	Milešín	Písecko	Stodůlky
Milešín			
Písecko	0,149		
Stodůlky	0,122	0,152	

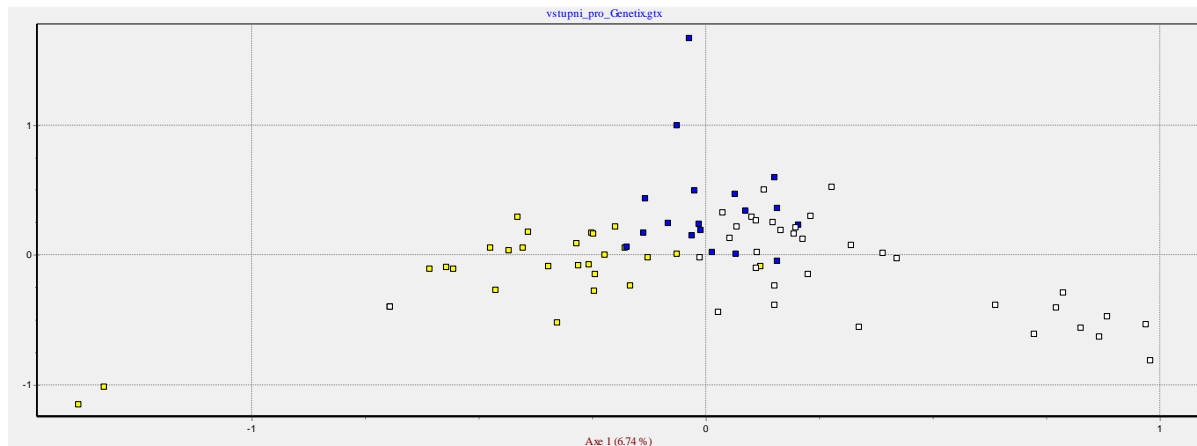
Tab.13: Párové Θ_{ST} mezi dvojicemi populací.

Hodnoty párového Θ_{ST} svědčí o střední genetické diferenciaci populací.

Genetická diferenciace populací odráží jejich geografickou vzdálenost a s tím související nepřítomnost genového toku mezi nimi. Koroptev polní je značně sedentárním druhem, což rovněž napomáhá geografické segregaci studovaných populací.

3.2.7. AFC (korespondenční faktoriální analýza)

Korespondenční faktoriální analýza patří mezi mnohorozměrné klastrovací analýzy, které nám graficky znázorní vztahy mezi jednotlivými populacemi (Obr.5). Jedinci tvoří očividné shluky, které odpovídají jejich geografickému původu, což potvrzuje přítomnost genetické diferenciace mezi studovanými populacemi.

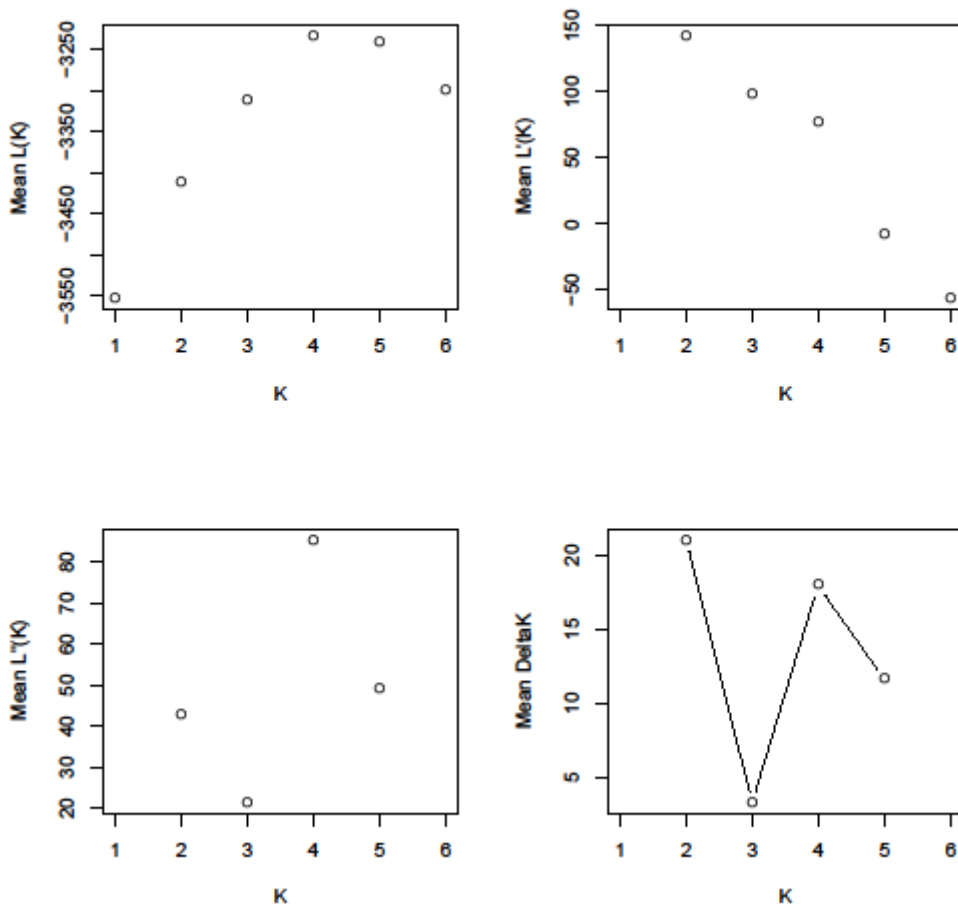


Obr.5: AFC (korespondenční faktoriální analýza). Legenda: bílá-Milešín, žlutá-Písecko, modrá-Stodůlky.

3.2.8. Hodnoty optimálního K

3.2.8.1. Delta K

Evanno et al. (2005) vyvinul grafickou metodu, která umožňuje detekci reálného počtu subpopulací (K). Je založena na určení posteriorní pravděpodobnosti $L(K)$ zařazení jedince do určitého klastru a výpočtu ΔK statistiky. Tato metoda je nejpoužívanější metodou pro odhad optimálního K.

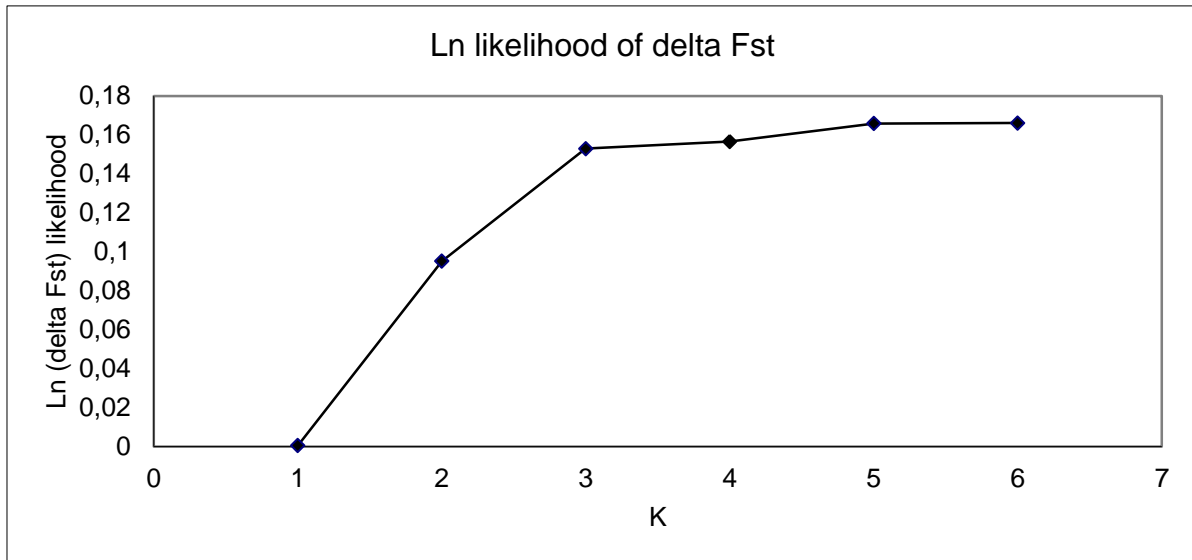


Graf 2: Metoda stanovení optimálního K podle Evanno et al. (2005).

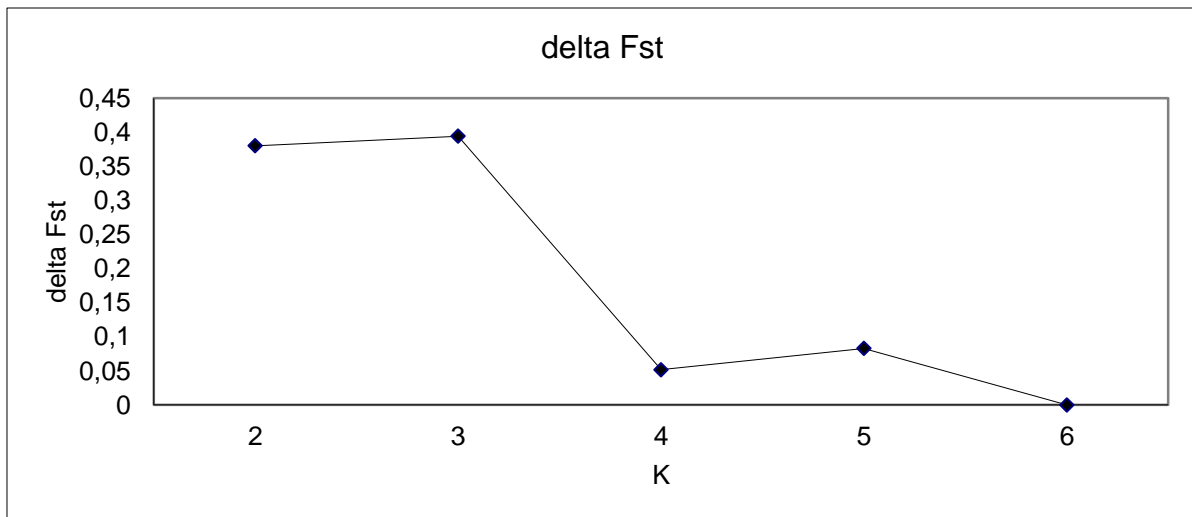
Z grafů vyplývá, že optimální K má hodnoty 2 nebo 4.

3.2.8.2. Delta F_{ST}

Alternativní způsob určení optimálního K vytvořil Falush et al. (2003). ΔF_{ST} statistika je vypočítána na základě změn hodnot F_{ST} pro různá K .



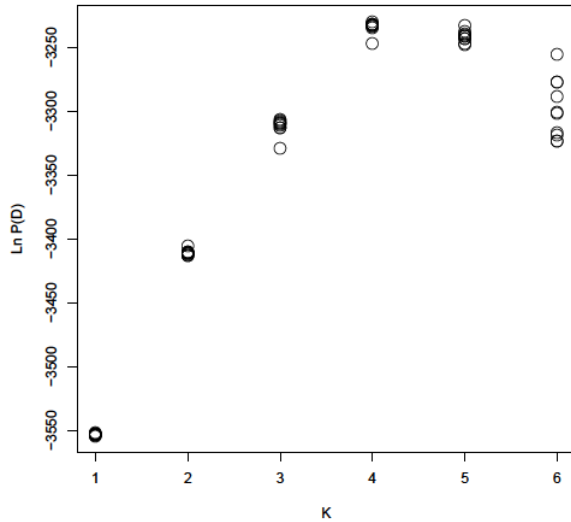
Graf 3: Průměrné hodnoty F_{ST} .



Graf 4: Hodnoty ΔF_{ST} pro testovaný počet K . Optimální počet K je 3 (maximum grafu).

3.2.8.3. Ln P(D)

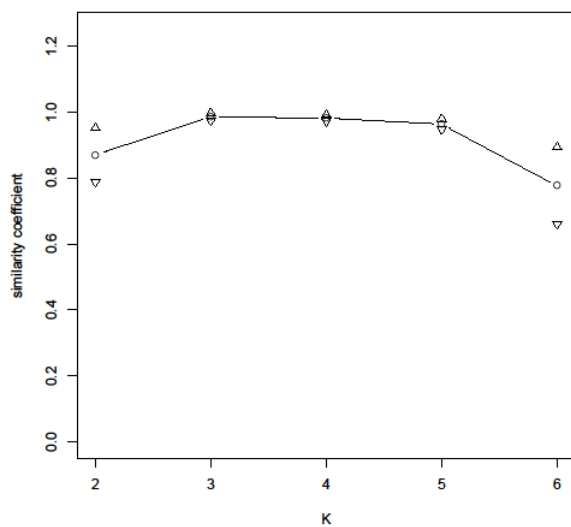
Ln P(D) udává odhad posteriorní pravděpodobnosti pro jednotlivá K.



Graf 5: LnP(D). Optimální počet K není jednoznačný a dá se jen těžko odhadnout, nejspíše 4.

3.2.8.4. Similarity coefficient

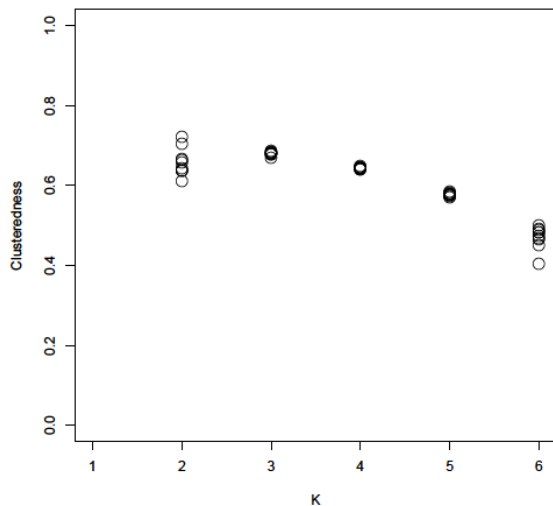
Similarity coefficient zobrazuje podobnost jednotlivých běhů pro každé K.



Graf 5: Similarity coefficient. Optimální počet K je 3 nebo 4.

3.2.8.5. Coefficient of clusteredness

Coefficient of clusteredness zobrazuje pravděpodobnost zařazení jedinců do jednotlivých skupin, tedy zda jsou spíše zařazeni do jedné anebo do kombinace více skupin.



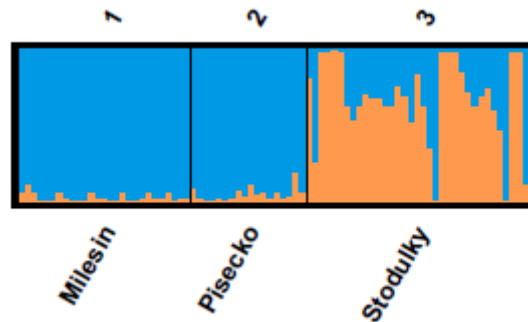
Graf 6: Coefficient of clusteredness. Optimální počet K je 4.

Z předcházejících grafů vyplývá, že nejsmysluplnější hodnotou K, tedy hodnotou, která se v nich nejčastěji objevovala jakožto optimální K, jsou čtyři. Jelikož však víme, že studované populace jsou ve skutečnosti jen tři, je tento výsledek překvapivý. Domnívám se však, že je to způsobeno velkou genetickou diversitou populace ze Stodůlek, která bude dobře patrná z výstupů programu Distruct, jež následují v další kapitole. Populace z Milešína a Písecka se zdají být naopak poměrně homogenní.

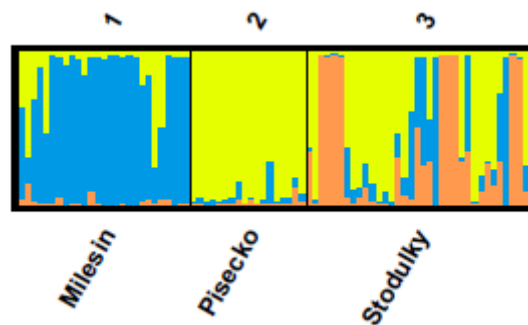
3.2.9. Distruct

Distruct (Rosenberg et al., 2004) je program pro grafickou úpravu výstupů programu Structure (Pritchard et al, 2000). Každému jedinci je přidělen koeficient příslušnosti (membership coefficient) v určité skupině (subpopulaci), což reprezentuje podíl jeho genetického materiálu, který má původ právě v této skupině (Rosenberg, 2004).

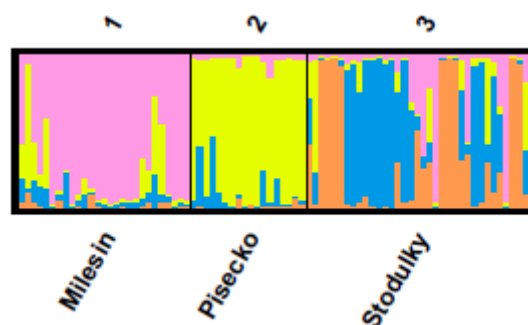
K=2



K=3



K=4



Obr.6: Distruct. Subpopulce jsou representovány různými barvami. Jedinci jsou pak znázorněni jako segmenty rozdělené do K-barevných částí, které korespondují s podílem jejich příslušností k dané skupině.

3.2.10. Efektivní velikost populace (N_e)

Efektivní velikost populace (N_e) po bottlenecku dosahuje nízkých hodnot. Malé N_e tedy indikuje přítomnost recentního bottlenecku ($0,2N_e-4N_e$ generací) (Luikart & Cornuet, 1998). Výsledek Wilcoxonova testu v programu Bottleneck 1.2.02. (Cornuet Luikart, 1996) byl však u všech tří studovaných populací nesignifikantní ($p\text{-value} > 0,05$). To ale mohlo být způsobeno jen nedostatečným množstvím polymorfních lokusů, které jsme měli k dispozici, anebo prostě tím, že se bottleneck odehrál již velmi dávno. Rozhodli jsem se proto použít jinou metodu, která je založena na odhadu N_e na základě hodnot vazebné nerovnováhy (linkage disequilibrium) (Hill, 1981). Tato metoda je použita programem LDNe (Waples & Do, 2008).

Nejnižší použitá frekvence alel			0.05000	0.02000	0.01000
Populace 1	Ne[^]		27.8	38.7	51.6
	95% CIs pro Ne[^]	parametrický	20.3 40.8	27.4 60.9	35.0 89.9
		JackKnife	19.2 44.7	26.8 63.4	34.5 92.6
	Populace 2	Ne[^]		13.0	17.1
95% CIs pro Ne[^]		parametrický	9.2 19.5	11.8 26.7	11.8 26.7
		JackKnife	9.1 19.8	12.2 25.4	12.2 25.4
Populace 3		Ne[^]		10.2	8.9
	95% CIs pro Ne[^]	parametrický	8.1 12.7	7.3 10.7	12.0 17.2
		JackKnife	8.0 12.9	6.6 11.6	11.1 18.6

Tab.14: Odhad efektivní velikosti populace (N_e) programem LDNe. Nejnižší použitá frekvence alel ($P_{crit} = 0,05, 0,02$ a $0,01$) nám říká, jakou musí mít alely frekvenci výskytu, aby ještě byly zahrnuty do analýzy. Jsou udány dva různé konfidenční intervaly (CI) dle použité metody výpočtu: parametrický a JackKnife.

Efektivní velikost populace (N_e) byla rovněž vypočítána na základě genotypů mláďat a jejich rodičů v programu Colony (Jones & Wang, 2010) a to za předpokladu náhodného a nenáhodného párování:

náhodné párování	Alpha	0.00
	Ne	27
	CI95(L)	17
	CI95(U)	48
nenáhodné párování	Alpha	0.02
	Ne	26
	CI95(L)	16
	CI95(U)	46

Tab.15: Odhad efektivní velikosti populace (N_e) programem Colony.

Hodnoty efektivní velikosti populace (N_e) vyšly podle očekávání nízké, což tedy svědčí o tom, že námi studované populace v nedávné době skutečně prošly bottleneckem.

3.3. Analýza paternity

Parentální analýzy jsou založeny na jednoduchém mendelistickém principu. Potomek by měl na každém sledovaném lokusu zdědit jednu alelu po matce a druhou po otci. Kombinace alel matky a otce by tedy měla vysvětlit všechny alely vyskytující se u daného mláděte.

Genotypy mlád'at a rodičů jsou uvedeny v tabulce v příloze č. 8. Okometricky jsem zkontrolovala shodu rodičovských genotypů a genotypů mlád'at. Pokud by se u mláděte vyskytly na daném lokusu alely, které jeho rodiče nevlastní, vedlo by to k závěrům, že předpokládání rodiče nejsou skutečnými biologickými rodiči a že mládě je výsledkem mimopárové paternity (pokud nesdílí alelu s otcem), anebo hnízdního parazitismu (pokud nesdílí alelu s matkou). Abychom uvažovali o některém ze zmíněných jevů, musely by se neshody u daného mláděte vyskytnout na více lokusech najednou. Jinak se pravděpodobně jedná jen o chybu způsobenou například špatně přečteným genotypem, výskytem nulové alely či mutací.

Výsledky okometrické kontroly byly následně ověřeny v programu Colony (Jones & Wang, 2010) a průkaznost jeho výstupů pak za pomoci programu Kingroup (Konovalov et al., 2004). Jeho výstupní data jsme ještě zpřesnili použitím Bonferroniho korekce, která snižuje hladinu významnosti podle počtu provedených testů.

Neshoda mezi genotypem mlád'at a genotypy rodičů se vyskytla hned u několika hnízd. V hnízdě EVA z Písecka se vyskytují tři mlád'ata, která jsou na lokusu MCW230 zdánlivě nekompatibilní se svou matkou. Domníváme se však, že je to způsobeno jen přítomností nulové alely v genotypu matky. Ta je tedy ve skutečnosti heterozygotem pro 261/263. Program Colony skutečně těmto mlád'atům přiřadil stejnou matku označenou jako Pi1 a mlád'ata určil jako plné sourozence. Tento výsledek byl statisticky průkazný.

Rovněž alela 244 na lokusu Ppe02 u mláděte KA18 a alela 301 na tomtéž lokusu u mláděte PT4 mají zřejmě stejné vysvětlení. Tyto alely by měla mlád'ata zdědit od otce, ten je však ve svém genotypu nemá. Colony jedinci KA18 přiřadil jakožto otce Pi25, který je otcem i všech ostatních mlád'at v daném hnízdě. Tento výsledek byl statisticky průkazný. Avšak PT4 byl při analýze, kde byly programu zadány matky hnízd, přiřazen jiný otec než ostatním mlád'atům v hnízdě PT (naopak v analýze s nezadanými matkami byli všechny mlád'ata

připsány jedinému otci). Tento výsledek však nebyl statisticky průkazný a dané mládě je zjevně plným sourozencem ostatních mlád'at v tomto hnízdě.

Hnízda PM a PT pocházející z Písecka mají shodnou matku označenou jako Pi8. Zjistili jsme, že mlád'ata z těchto hnízd vlastní rovněž totožného otce (kterého však v našem setu otců nemáme). To je docela dobře možné, neboť obě hnízda pochází z roku 2003 a samice zřejmě tento rok zahnízdila dvakrát a to s tím samým samcem. Tento výsledek byl také statisticky průkazný.

Program Colony v analýze bez zadaných matek, přiřadil k některým jedincům ještě jinou možnou matku nebo jiného potenciálního otce. Jak je ale vidět z tabulky (Tab.16), první přiřazená matka či otec (a ve všech případech to skutečně byla známá matka či otec daného hnízda) má mnohem větší pravděpodobnost, že je matkou daného mláděte.

ID	matka 1	p-value	matka 2	p-value
20_2	719	0.974	717	0.026
20_16	719	0.983	701	0.017
34_6	725	0.999	718	0.001
37_3	701	0.866	675	0.121
37_11	701	0.962	719	0.024
37_12	701	0.871	719	0.113
39_2	717	0.993	725	0.007
39_3	717	0.904	725	0.096

ID	otec 1	p-value	otec 2	p-value
SM8	St38	0.992	St89	0.008

Tab.16: Přiřazení alternativních matek či otců vybraným mlád'atům.

Mlád'atům z hnízd PL a 37 byli přiřazeny dva různé otcové. Tento výsledek však nebyl příliš přesvědčivým, protože oba domnělé otce přiřadil v obou analýzách (bez a se známými matkami) jiným způsobem, tedy k jiným mlád'atům, a navíc se jednalo o hnízda, kde se již při manuální kontrole nevyskytl žádný problém. Výsledek navíc vyšel neprůkazně.

V hnízdech CT ze Stodůlek a 39 z Nové vsi vidíme nesrovnalosti mezi genotypem otce a jeho předpokládaných mlád'at hned na několika lokusech. Očividně je to způsobeno špatným přiřazením otce k tomuto hnízdu a nikoli mimopárovou paternitou. Tu bychom totiž uvažovali v případě, že by se na daném lokusu u mlád'at vyskytovaly více jak dvě otcovské alely.

Jedince 20_2 a 34_7 jsme naproti tomu už na základě okomoterické kontroly považovali za výsledek mimopárové paternity, neboť na některých lokusech vlastní jiné otcovské alely, než ostatní mlád'ata v daném hnízdě. Colony jim opravdu připsal jiného otce, než měla ostatní mlád'ata v daném hnízdě. Mělo by se dokonce jednat o otce totožného, což je dost dobře možné, protože obě hnízda (20 a 34) pochází ze stejné lokality (Nová ves) a stejného roku (2009). Pro mládě 20_2 program našel dva potenciální otce (Tab.17). Pravděpodobnost, že je jeden z těchto samců skutečně otcem tohoto mláděte je však malá a daného otce tak zřejmě v našem souboru nemáme.

ID	otec 1	p-value	otec 2	p-value
20_2	729	0.010	678	0.001

Tab.17: Přiřazení dvojice alternativních otců mláděti 20_2.

Také mládě 39_20 by podle výsledků z Colony mělo mít jiného otce, než zbytek mlád'at v daném hnízdě. Při kontrole, zda jsou tyto výsledky průkazné, se ukázalo následující. Mládě 20_2 průkazně nepochází od jiného otce než zbytek sourozenců. Rovněž mládě 39_20 je plným sourozencem ostatních mlád'at v hnízdě 39. Avšak mládě 34_7 průkazně není plným sourozencem alespoň s jedním z mlád'at v daném hnízdě (34_3). Získali jsme tedy průkazně důkaz pouze o jediném mimopárovém mláděti. Tento výsledek potvrzuje přítomnost mimopárové paternity, avšak abychom mohli vyvodit závěry ohledně toho, jak běžný je tento jev u námi studované koroptve polní, bylo by třeba zpracovat mnohem větší množství hnízd.

Na tomto místě je také potřeba zmínit, že pro analýzu paternity jsem omylem vybrala dva lokusy (ADL0142 a Ppe10), které by na základě hodnot vazebné nerovnováhy (linkage disequilibrium, viz. příloha č. 7) mohly být ve vazbě. V programu Cervus (Marshall et al., 1998; Kalinowski et al., 2007) jsem proto vypočítala combined non-exclusion probability pro celkový set sedmi lokusů a následně pro sadu lokusů bez jednoho (ADL0142) a bez druhého (Ppe10) problematického lokusu (Tab.18).

Combined non-exclusion probability pro všech sedm lokusů zvolených pro analýzu paternity:

	všechny pop.	Milešín	Písecko	Stodůlky
matka	0.01516458	0.02334855	0.07355401	0.03796241
otec	0.00126226	0.00223044	0.01130985	0.00396848

Combined non-exclusion probability šesti lokusů po vyloučení ADL0142:

	všechny pop.	Milešín	Písecko	Stodůlky
matka	0.02856468	0.03700532	0.09984192	0.07157569
otec	0.00354475	0.00497280	0.01971480	0.01116539

Combined non-exclusion probability šesti lokusů po vyloučení Ppe10:

	všechny pop.	Milešín	Písecko	Stodůlky
matka	0.01763084	0.02561158	0.07763854	0.04949492
otec	0.00177425	0.00274592	0.01365303	0.00663132

Tab.18: Pravděpodobnost ne-vyloučení rodičů (combined non-exclusion probability).

Pokud by se hodnoty pravděpodobnosti pro ne-vyloučení otce, pohybovaly nad hranicí $p > 0,05$ znamenalo by to snížení spolehlivosti následné analýzy paternity tzn. z otcovství by nebyli vyloučeni samci, kteří by skutečně nebyli rodiči daných mláďat. To se však nestalo a nadále jsme tedy mohli pracovat s celkovým setem sedmi lokusů.

3.4. Haplotypy oblasti control region 1 mtDNA koroptve polní (*P. perdix*)

Osekvenováno bylo celkem 16 vzorků: 5 z Milešína, 7 s Písecka a 4 ze Stodůlek. U milešínských koroptví byl nalezen pouze jeden haplotyp, u píseckých dva a u stodůleckých rovněž dva. Žádný z našich haplotypů nebyl nově nalezeným, ale všechny odpovídaly již známým haplotypům (MW, W4 a W13), které pochází ze studie Liukkonen-Anttila et al. (2002).

ID	Původ vzorku	Haplotyp
34/8	Milešín	MW
38/9	Milešín	MW
38/10	Milešín	MW
38/11	Milešín	MW
38/12	Milešín	MW
Pi1	Písecko	MW
Pi2	Písecko	MW
Pi3	Písecko	W4
Pi4	Písecko	W4
Pi7	Písecko	MW
Pi8	Písecko	MW
Pi26	Písecko	W4
St64	Stodůlky	MW
St65	Stodůlky	MW
St69	Stodůlky	MW
St94	Stodůlky	W13

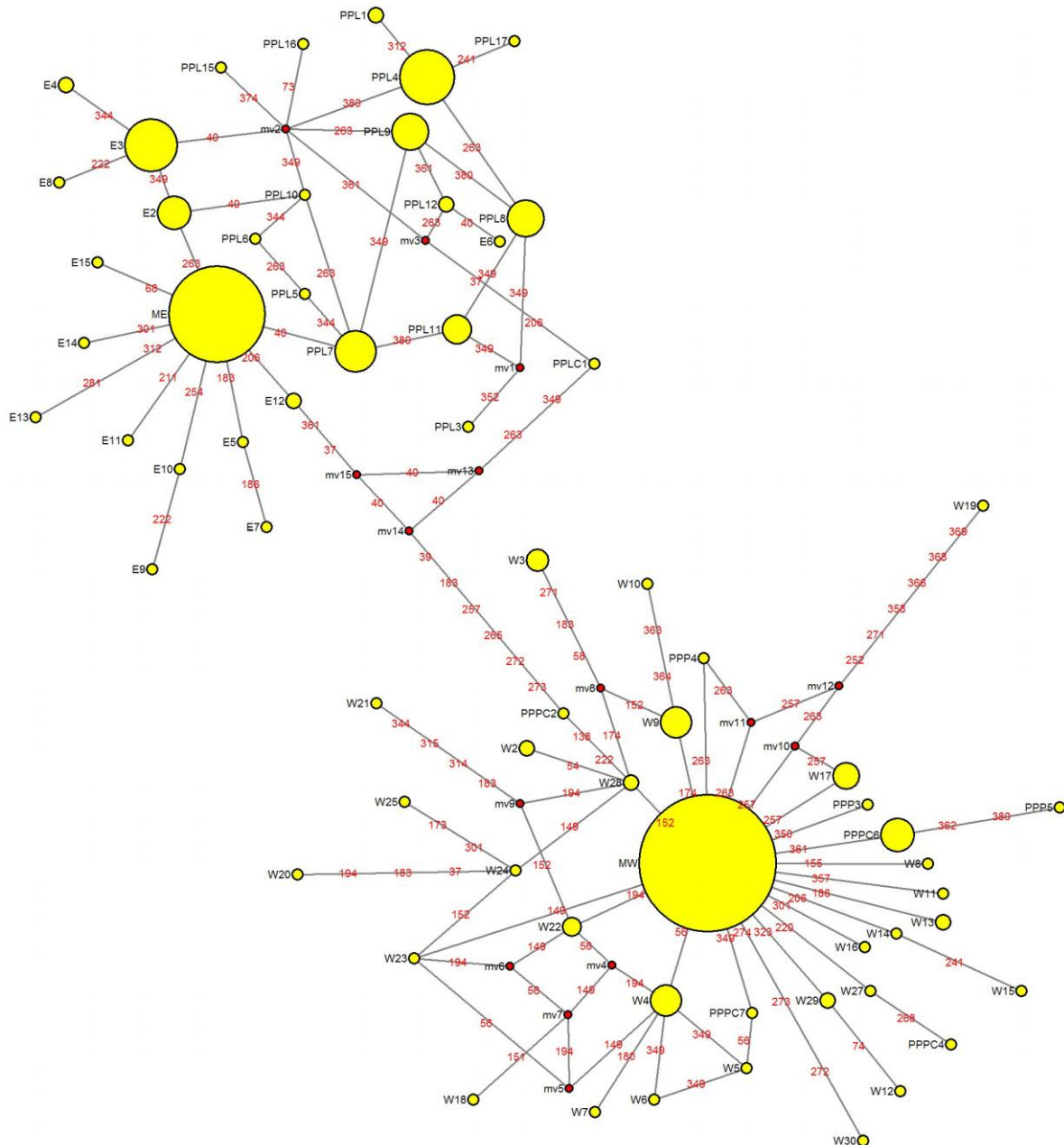
Tab.19: Haplotypy kontrolní oblasti 1 mtDNA vybraných vzorků.

V příloze jsou uvedeny sekvence oblasti control region 1 mtDNA námi nalezených haplotypů (příloha č. 10) a seznam variabilních míst všech sekvencí (příloha č. 11), které byly použity pro tvorbu haplotypové sítě v programu Network 4.5.1.6. (Bandelt et al., 1999).

Seznam všech haplotypů, které jsme nakonec použili pro tvorbu haplotypové sítě naleznete v příloze č. 9. Přístupové kódy do Genbanku (www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/) jsou uvedeny jen u haplotypů pocházejících ze studie Liukkonen-Anttila et al. (2002), neboť haplotypy z druhého zdroje (Liukkonen 2006), zatím nebyly do Genbanku umístěny. Rovněž je uvedeno osm haplotypů, které nebylo možno ke tvorbě haplotypové sítě použít, protože k tomuto účelu nebyly použity ani ve zdrojových studiích (a tudíž bychom nevěděli, jaké množství jedinců máme pro daný haplotyp uvést).

3.4.1. Median joining network haplotypů mtDNA koroptve polní (*Perdix perdix*)

Struktura median joining network jasně ukazuje přítomnost dvou odlišných linií. Každá z nich má jeden bazální haplotyp, kolem kterého jsou seskupeny další, jim blíže příbuzné, a celkově jsou tedy patrné dva velké haplotypové klastry.



Obr. 7: Median joining network. Kolečka s popisky představují jednotlivé haplotypy. Jejich velikost je přímo úměrná velikosti vzorku. Označení „mv“ indikuje mediánové vektory, které upozorňují na hypotetické haplotypy, které by se v daných místech měly nacházet, avšak mezi našimi známými haplotypy se nevyskytovaly. Pozice mutací jsou označeny červenými popisky.

4. Diskuze

4.1. Mikrosatelity pro studium koroptve polní (*Perdix perdix*)

Mikrosatelity jsou v současné době nepoužívanějšími genetickými markery. Využívají se například v populační genetice, genetickém mapování a v neposlední řadě při parentálních analýzách. Specifické mikrosatelitové lokusy pro koroptev polní (*Perdix perdix*) nebyly dosud známy, avšak u několika blízkce příbuzných druhů ze třídy hrabavých (*Galliformes*) bylo v posledních letech vyvinuto poměrně značné úsilí, co se týká jejich izolace a rovněž testování cross-species amplifikace mezi různými druhy. Proto jsem se ve své práci rozhodla v první řadě využít transferability mikrosatelitů a otestovat na vzorcích koroptví DNA lokusy, které byly nalezeny u jiných druhů hrabavých ptáků (*Galliformes*). Mezi nimi je nejvíce mikrosatelitů známých u kura domácího (*Gallus gallus*) jakožto modelového organismu. Proto jsem převážnou většinu lokusů převzala právě od něho. Jinými blízkce příbuznými druhy, jejichž lokusy se rovněž amplifikovaly u koroptve polní, byl krocan domácí (*Meleagris gallopavo*) a tetřívěk pelyňkový (*Centrocercus urophasianus*).

Celkově jsem však touto cestou získala pouhých 11 lokusů, které jsou použitelné i k amplifikaci koroptví DNA, což bylo vcelku překvapivé vzhledem k tomu, že jsem jich otestovala poměrně značné množství. Například jen u kura domácího (*Gallus gallus*) bylo odzkoušeno více jak 50 lokusů. Nevýhodným aspektem cross-species amplifikace je navíc fakt, že homologní mikrosatelitové markery poskytují při amplifikaci u blízkce příbuzného druhu kratší a méně polymorfní produkty a rovněž také větší frekvenci nulových alel (Ellegren et al., 1995). Je proto vždy výhodnější pracovat s lokusy, které jsou specifické pro studovaný druh.

Jak jsem již uvedla, specifické mikrosatelitové lokusy pro koroptev polní (*Perdix perdix*) nebyly dosud známy, a proto se cílem mé práce stalo takové lokusy nalézt. Výsledkem náročné izolace mikrosatelitů bylo získání 7 nových mikrosatelitových markerů. Celkově jsem tak získala set 18 lokusů (11 z cross-species amplifikace a 7 izolovaných *de novo*), které jsem pak použila k otestování charakteristik populační struktury studovaných populací koroptví a rovněž k paternální analýze u vybraného vzorku hnízd, jejímž cílem bylo zjistit, zda u tohoto údajně monogamního druhu ptáka nenaleznu důkaz o výskytu mimopárové paternity. Získaný set lokusů se ukázal být vhodným nástrojem pro oba typy zmíněných analýz.

4.2. Pokles stavů koroptve polní (*Perdix perdix*)

Získaný set mikrosatelitových lokusů mi poskytl nástroj ke studiu charakteristik tří studovaných populací koroptví ze Stodůlek, Písecka a Milešína. Výsledky ukazují na vysokou strukturovanost těchto populací a nízké hodnoty jejich efektivní velikosti (N_e) svědčí o přítomnosti recentního bottlenecku, tedy výrazného snížení populačních stavů. Ačkoli nám výsledek Wilcoxonova testu v programu Bottleneck 1.2.02. (Cornuet Luikart, 1996) vyšel neprůkazně, další dvě analýzy použité pro odhad efektivní velikosti studovaných populací nám poskytly jasné důkazy o přítomnosti recentního bottlenecku. To odpovídá historickým datům, neboť koroptev polní (*Perdix perdix*) je jedním z ptačích druhů typických pro kulturní zemědělskou krajinu, které v posledních desetiletích zaznamenaly drastický pokles stavů (Tucker & Heath, 1994).

Úbytek je patrný zejména od 50. let minulého století (Potts, 1986) a je přičítán především moderním zemědělským postupům (De Leo et al., 2004), jejichž vlivem dochází ke ztrátě přirozených úkrytů, prostoru k hnízdění a snížení potravní nabídky. V tomto ohledu má největší dopad používání pesticidů, které způsobuje úbytek hmyzu, jež je hlavní složkou potravy mláďat, a má tedy klíčový vliv na jejich přežívání (Kuijper et al., 2009). V některých oblastech jako je například Irsko, Norsko a Švýcarsko je tento druh dokonce na pokraji vyhynutí (Aebischer & Kavanagh, 1997).

Celoevropský pokles početnosti se nevyhnul ani České republice. Ještě ve 30. letech byla koroptev polní hojným druhem. V roce 1935 dosahovaly její stavy 6 milionů kusů. Nicméně do roku 1965 poklesly na pouhých 772 842 jedinců (Hudec & Šťastný, 2005). Navzdory umělému odchovu a opakovaným reintrodukcím spolu s omezením jejich lovu, se dosud nepodařilo zvýšit jejich počty na původní hodnoty. Koroptev polní je v současnosti uvedena na Červeném seznamu (Šťastný & Bejček, 2003) v kategorii druh téměř ohrožený.

4.3. Mitochondriální linie koroptve polní (*Perdix perdix*)

Koroptev polní (*Perdix perdix*) se na území Evropy vyskytuje ve dvou liniích mitochondriální DNA (Liukkonen-Antilla, 2002), které jsou podle geografického původu označovány jako západní a východní. Zajímalo mě, ke které z mitochondriálních linií patří námi studované, potažmo obecně české populace koroptví, a proto jsem nechala osekvenovat několik náhodně vybraných vzorků z každé ze studovaných populací. Objevila jsem tak celkem pět různých haplotypů náležejících k západní linii mitochondriální DNA.

Tento výsledek souhlasí s představou, jakým způsobem jsou obě mitochondriální linie distribuovány v rámci evropského areálu rozšíření. Jejich výskyt je zjevně odvozen od odlišných glaciálních refugií, které po skončení poslední doby ledové, sloužily jako zdroje pro opětovnou rekolonizaci Evropy. Podle Hewita (2000) existovaly během dob ledových celkem tři refugia: Pyrenejský poloostrov, Balkánský poloostrov a Kavkaz. Populace koroptve polní (*Perdix perdix*) se zřejmě během glaciálního období rozdělily a využily všechna zmíněná útočiště. Severní oblasti Evropy byly rekolonizovány z Pyrenejského a Balkánského poloostrova a východní linie se šířila rovněž z Balkánu a také z Kavkazu (Taberlet et al., 1998). Z mapy znázorňující předpokládané rekolonizační cesty (Obr.1), kterou jsem přiložila do úvodu, je patrné, že Česká republika leží v oblasti, kudy zřejmě vedla západní rekolonizační cesta z Pyrenejského poloostrova.

Příslušnost český koroptví k západní mitochondriální linii a tedy poddruhu *P.p. perdix* je podporována i faktem, že v okolních státech jako je Německo či Polsko, byl rovněž potvrzen výskyt haplotypů náležejících k této linii. Linie *perdix* se dále vyskytuje například ve Velké Británii, Francii či Itálii. Zatímco linie *lucida* je rozšířena například ve Finsku, Řecku nebo Kazachstánu, tedy státech, které jsou naší republice poměrně vzdálené.

4.4. Extrapárové kopulace a analýza paternity

Analýza paternity u vybraného vzorku hnízd skutečně přinesla výsledky, které naznačují, že u koroptví dochází k mimopárovým kopulacím, a zpochybňují tak její předpokládanou striktní monogamii.

Koroptev polní (*Perdix perdix*) je v literatuře vždy uváděna jako druh výhradně monogamní (Jenkins 1961), avšak behaviorální data naznačují, že by tomu tak být nemuselo. Typickým znakem koroptvích populací je totiž poměr pohlaví ve prospěch samců (Jenkins, 1961), jež během reprodukčního období vyúsťuje v množství nespárovaných jedinců tzv. floaterů (Ligon, 1999), kteří se nomadicky pohybují od páru k páru a snaží se získat již spárovanou samici. To vede k myšlence, že koroptev možná není striktně monogamní, jak je obvykle uváděno, neboť přítomnost nespárovaných samců v blízkosti párů by mohla napomáhat výskytu extrapárových kopulací.

Koroptev polní je jedním z druhů, jimž byla monogamie připsána jen díky terénnímu pozorování. Je však zřejmé, že závěry učiněné výlučně na základě behaviorálních dat, jsou často velmi nedostatečné. Už David Lack (1968) se domníval, že si více jak 90% ptačích druhů osvojilo monogamní způsob života, avšak moderní molekulární metody tuto domněnku hravě vyvrátily a prokázaly, že skutečná genetická monogamie se vyskytuje jen u méně než 25% sociálně monogamních druhů ptáků (Griffith et al., 2002). Je proto nezbytně nutné získaná terénní data ověřovat rovněž na genetické úrovni.

Výsledky námi provedené paternální analýzy skutečně poskytly důkaz o výskytu mimopárové paternity. Abychom však mohli vyvodit přesvědčivý závěr o tom, jak často se tento jev u koroptví objevuje, bylo by třeba zpracovat mnohem větší množství hnízd.

Zajímavou otázkou je, zda je pozorovaná sociální monogamie koroptví skutečně původní reprodukční strategií tohoto druhu. Monogamie totiž může být pouze vynucena přítomností podmínek, které zabraňují danému jedinci zvolit jinou reprodukční strategii. Například v situaci, kdy jedinec nemá šanci získat další partnery díky nedostatku jedinců opačného pohlaví. Tzv. nevyvážený poměr pohlaví (unbalanced sex ratio), který se objevuje i u koroptví, je opravdu jedním z nejčastějších důvodů vzniku monogamních svazků. U většiny ptačích druhů je totiž charakteristická přítomnost většího množství samců než samic v populaci, což je způsobeno rozdílnou mortalitou obou pohlaví (Breitwisch, 1989). Je tomu tak v důsledku výraznější disperze samic, neboť u ptáků jsou fylopatrickým pohlavím samci,

a také značnou zranitelností samic během inkubace. Tehdy jsou totiž obzvláště vystaveny nebezpečí ze strany predátorů. Tento faktor je velmi výrazný zejména u na zemi hnízdících druhů jako je většina hrabavých (*Galliformes*). Poměr pohlaví ve prospěch samců s sebou nese zvýšenou míru intrasexuální kompetice o partnerky. Samice má v tuto chvíli pro samce mnohem vyšší hodnotu, než kdyby byl poměr pohlaví vyvážený, vyplatí se mu proto si ji monopolizovat pouze pro sebe. Je možné, že právě tak tomu je i u koroptve polní.

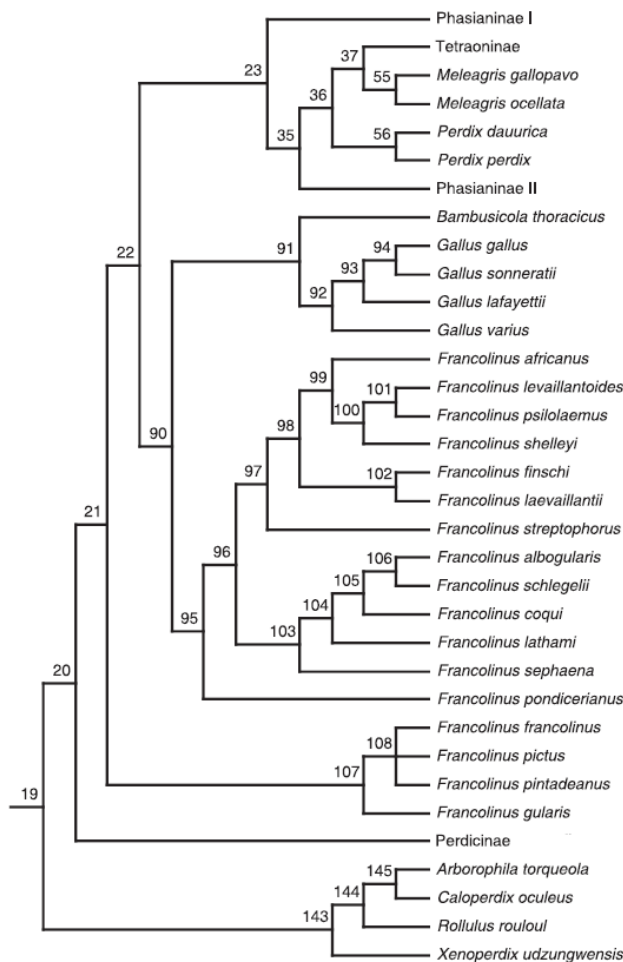
Mezi hrabavými (*Galliformes*) je koroptev polní jedním z mála druhů, které si osvojily monogamní způsob života, neboť nejméně jedna třetina rodů ze šesti rodin, které tato ptačí třída obsahuje (Cramp & Simmons, 1987), se vyznačuje polygamií či promiskuitou. Hrabaví však zatím obdrželi jen velmi malou pozornost, co se parentálních analýz týká, a je proto těžké posoudit, zda skutečně vlastní reprodukční systémy, které jim jsou přisouzeny jen na základě behaviorálních dat.

Z fylogenetického stromu přiloženého na další stránce je patrné v blízkosti jakých druhů se koroptev polní (*Perdix perdix*) nachází. Tetřevovití (*Tetraoninae*) jsou známi svou nezvykle vysokou frekvencí polygynních reprodukčních systémů (Cramp & Simmons, 1987; Hoyo del et al., 1994). Ze 17 druhů, které skupina obsahuje, jich šest vlastní typickou lekovou strategii (rody *Centrocercus*, *Tympanuchus* a *Tetrao tetrix*) pět druhů je monogamních (rody *Lagopus*, *Tetraogallus*, *Colinus* a druhy *Bonasa bonasia*, *Bonasa sewerzowi*,) a zbylých šest je uváděno jako druhy přechodné (*Tetrao urogallus*, *Bonasa umbellus*, *Dendragapus*, *Falcipecten*). Pro lekující druhy je typická genetická monogamie samic. Ty se údajně páří jen jedenkrát za sezónu a vlastní tak zřejmě nějaký mechanismus, kterým dokáží zjistit, zda došlo k úspěšnému přenosu spermií a tedy oplození vajíček. Zatímco studie paternity u druhu *Tetrao tetrix* (tetřívka obecná) skutečně potvrdili jejich genetickou monogamii (Alatalo et al., 1996; Lebirge et al., 2007), tatáž studie u tetřívka pelyňkového (*Centrocercus urophasianus*) naopak ukázala přítomnost násobné paternity u mlád'at z jednoho hnízda (Semple et al., 2001).

Krocanovití (*Meleagrididae*) patří mezi druhy polygynní (Hoyo del et al., 1994), kdy si samec obhazuje skupinu samic, které se páří výhradně jen s ním. Avšak u druhu *Meleagris gallopavo* (krocan divoký) byla provedena studie (Krakauer, 2008) zaměřená na studium paternity, jejímž výsledkem bylo vůbec první zjištění přítomnosti násobné paternity mlád'at u divoce žijící populace tohoto druhu.

U bažantů (rody *Phasianus*, *Chrysolophus*, *Crossoptilon*, *Syrmaticus*, *Lophura*, *Lophophorus* a *Tragopan*) se nejčastěji uplatňuje harémová polygynie a zřídka také monogamie (Hoyo del et al., 1994). Bažanti se v tomto fylogenetickém stromu skrývají v podčeledi *Phasianinae* II. *Phasianinae* I pak zahrnují pávi (rody, *Pavo*, *Afropavo*, *Argusianus*, *Polyplectron*), kteří se stejně tak jako kur domácí (*Gallus gallus*) vyznačují harémovou polygynií.

Do podčeledi *Perdicinae* jsou pak zahrnuty orebice (rod *Alectoris*) a frankolíni (rod *Francolinus*), kteří jsou monogamní (Cramp & Simmons, 1987), a křepelky (rod *Coturnix*), jež mají značně variabilní reprodukční strategii přecházející z monogamie, přes polygynii, polyandrii až k úplné promiskuitě (Cramp & Simmons, 1987).



Obr.8: *Phasianidae*. Jedna z větví fylogenetického stromu skupiny *Galloanserae*, kterou vytvořil Eo et al. (2009) metodou supertree method matrix na základě 400 fylogenetických stromů publikovaných v literatuře mezi lety 1971-2006.

Z tohoto výčtu je zjevné, že čeleď bažantovitých (*Phasianidae*) zahrnuje druhy s nejrůznějšími reprodukčními strategiemi, od monogamie po úplnou promiskuitu. Polygamní a promiskuitní reprodukční systémy však znatelně převažují, a proto se můžeme domnívat, že původním reprodukčním systémem předka této vysoce diversifikované skupiny jistě nebyla monogamie. Ta je tedy znakem odvozeným a jak už jsem uvedla výše, může být pouze důsledkem omezujících podmínek, které některým druhům znemožnily osvojit si strategii jinou.

5. Závěr

Mikrosatelity jsou v současné době nejpoužívanějšími genetickými markery. Využívají se například v populační genetice, genetickém mapování a v neposlední řadě při parentálních analýzách. U koroptve polní (*Perdix perdix*) nebyly do této chvíle známe žádné specifické mikrosatelitové lokusy, které by mohly sloužit ke studiu tohoto druhu, a proto jsem se rozhodla tuto mezeru vyplnit. Výsledkem mé práce je sedm nových specifických lokusů pro daný druh. Rovněž jsem otestovala další lokusy pocházející od blízké příbuzných druhů ze třídy hrabavých (*Galliformes*). Jedenáct z nich se ukázalo být použitelných i u koroptve. Celkově jsem tak získala set osmnácti lokusů, které jsem pak použila k otestování charakteristik populační struktury studovaných populací koroptví a rovněž k paternální analýze u vybraného vzorku hnízd, jejímž cílem bylo zjistit, zda u tohoto údajně monogamního druhu ptáka nenaleznu důkaz o výskytu mimopárové paternity. Výsledky naznačují, že se mimopárová paternita u koroptve polní (*Perdix perdix*) skutečně vyskytuje, avšak abychom byli schopni říci, jak běžný jev to u studovaného druhu je, bylo by potřeba zpracovat mnohem větší množství hnízd. V každém případě se ukázalo, že získaný set mikrosatelitových lokusů je vhodným nástrojem pro oba typy zmíněných analýz.

Koroptev polní (*Perdix perdix*) se v rámci svého evropského areálu rozšíření vyskytuje ve dvou hluboce oddělených liniích mitochondriální DNA. Dosud nebylo známo, ke které z nich patří populace žijící na území České republiky, a proto jsem se rozhodla osekvenovat několik náhodně vybraných vzorků DNA. Výsledkem mé práce je zjištění, že námi studované populace koroptví a tedy obecně populace české vlastní haplotypy náležející k západní linii mitochondriální DNA.

6. Použitá literatura

Aebischer N. & Kavanagh B. (1997): Grey Partridge. In: The EBCC Atlas of European Breeding Birds. Their distribution and abundance (Hagemeijer W.M.J. & Blair M.J. eds.), T&A.D. Poyser, London, 212-213.

Alatalo R.V., Burke T., Dann J., Hanotte O., Höglund J., Lundberg A., Moss R. & Rintamäki P.T. (1996): Paternity, copulation disturbance and female choice in lekking black grouse. *Animal Behaviour* 52, 861-873.

Bandelt H.J. , Forster P. & Röhl A. (1999): Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution* 16 (1), 37-48.

Belkhir K., Borsa P., Chikhi L., Raufaste N. & Bonhomme F. (2004): GENETIX 4.05. Logiciel sous Windows TM pour la génétique des populations. Laboratoire Génome, Populations, Interactions, CNRS UMR 5000, Université de Montpellier II, Montpellier (France).

Birkhead T.R. & Biggins J.D. (1998): Sperm competition mechanisms in birds: models and data. *Behavioral Ecology* 9, 253-260.

Birkhead T.R. & Brillard J.P. (2007): Reproductive isolation in birds: postcopulatory prezygotic barriers. *Trends in Ecology & Evolution* 22, 266-272.

Birkhead T.R. & Møller A.P. (1992): Sperm Competition in Birds: Evolutionary Causes and Consequences. Academic Press, London.

Breitwisch R. (1989): Mortality patterns, sex ratios, and parental investment in monogamous birds. In: *Current ornithology* Vol. 6 (Power D.M. ed.). Plenum Press, New York, 1-49.

Campana M.G., Hunt H.V., Jones H. & White J. (2011): CORRSIEVE: software for summarizing and evaluating Structure output. *Molecular Ecology Resources* 11, 349-352.

Cornuet J. M. & Luikart G. (1996): Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. *Genetics* 144, 2001-2014.

Cramp S. & Simmons K.E.L. eds. (1987): Handbook of the Birds of Europe, the Middle East and North Africa. The Birds of the Western Palearctic. Vol. II. Hawks to Bustards. Oxford University Press, Oxford-London-New York. 382-528.

Croojmans R.P.M.A., Dijkhof R.J.M., van der Poel J.J. & Groenen M.A.M.(1997): New microsatellite markers in chicken optimized for automated fluorescent genotyping. *Animal Genetics* 28, 427-437.

De Leo G.A., Focardi S., Gatto M. & Cattadori I.M. (2004): The decline of the Grey Partridge in Europe: comparing demographics in traditional and modern agricultural landscapes. *Ecological Modelling* 177: 313-335.

Dušková E. (2009): Praktikum izolace mikrosatelitů a designování mikrosatelitových primerů.

Ellegren H., Primmer C.R. & Sheldon B.C. (1995): Microsatellite evolution: Directionality or bias in locus selection? *Nature Genetics* 11, 60-62.

Eo S.H., Bininda-Emonds O.R.P. & Carroll J.P. (2009): A phylogenetic supertree of the fowls (*Galloanserae*, *Aves*). *Zoologica Scripta* 38 (5), 465-481.

Evanno G., Regnaut S. & Goudet J. (2005): Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology* 14, 2611-2620.

Falush D., Stephens M. & Pritchard J.K. (2003): Inference of population structure using multilocus genotype data: linked loci and correlated allele frequencies. *Genetics* 164, 1567-1587.

Gibbs M., Dawson D.A., McCamley C., Wardle A.F., Armour J.A.L. & Burke T. (1997): Chicken microsatellite markers isolated from libraries enriched for simple tandem repeats. *Animal Genetics* 28, 401-417.

Goudet J. (2001): FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9.3).

Griffith S.C. & Immler S. (2009): Female infidelity and genetic compatibility in birds: the role of the genetically loaded raffle in understanding the function of extrapair paternity. *Journal of Avian Biology* 40 , 97-101.

- Griffith S.C., Owens I.P.F. & Thuman K.A. (2002):** Extrapair paternity in birds: a review of interspecific variation and adaptive function. *Mol. Ecol.* 11, 2195-2212.
- Hancock J.M. (1999):** Microsatellites and other simple sequences: Genomic context and mutational mechanisms. In: Goldstein D.B. and Schlotterer C. (eds.) *Microsatellites: Evolution and Applications*. Oxford University Press, New York, 1-9.
- Hewitt G. (2000):** The genetic legacy of the Quaternary ice ages. *Nature* 405, 907-913.
- Hill W.G. (1981):** Estimation of effective population size from data on linkage disequilibrium. *Genetical Research* 38, 209-216.
- Hoyo del J., Elliott A., Sargatal J. eds. (1994):** *Handbook of the Birds of the World. Vol. 2. New World Vultures to Guinea-fowl*. Lynx Edicions, Barcelona, 227-567.
- Hudec K. & Štátný K. a kol. (2005):** Fauna ČR. Ptáci II/1. Academia, Praha. 261-322.
- Cheng H.H. & Crittenden L.B. (1994):** Microsatellite markers for genetic mapping in the chicken. *Journal of Poultry Science* 73 (4), 539-546.
- Jenkins D. (1961):** Social behaviour in the partridge *Perdix perdix*. *Ibis* 103a (2), 155-189.
- Jennions M.D. & Petrie M. (2000):** Why do females mate multiply? A review of genetic benefits. *Biology Review* 75, 21-64.
- Jones O.R. & Wang J.I. (2010):** COLONY: a program for parentage and sibship inference from multilocus genotype data. *Molecular Ecology Resources* 10, 551-555.
- Kalinowski S.T., Taper M.L. & Marshall T.C. (2007):** Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. *Molecular Ecology* 16, 1099-1106.
- Konovalov D.A., Manning C. & Henshaw M.T. (2004):** KINGROUP: a program for pedigree relationship reconstruction and kin group assignments using genetic markers. *Molecular Ecology Notes* 4, 779-782.
- Krakauer A.H. (2008):** Sexual selection and the genetic mating system of wild turkeys. *The Condor* 110 (1), 1-12.

- Kuijper D.P.J., Oosterveld E. & Wymenga E.** (2009): Decline and potential recovery of the European Grey Partridge (*Perdix perdix*) population—a review. *European Journal of Wildlife Research* 55, 455-463.
- Lack D.** (1968): *Ecological adaptations for breeding in birds.* Chapman & Hall, London.
- Lebirge C., Alatalo V., Siitari H. & Parri S.** (2007): Restrictive mating by females on black grouse leks. *Molecular Ecology* 16, 4380-4389.
- Li Y.Ch., Korol A.B., Fahima T., Beiles A. & Nevo E.** (2002): Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutational mechanisms: a review. *Molecular Ecology* 11, 2453-2465.
- Ligon J.D.** (1999): *The Evolution of Avian Breeding Systems.* Oxford University Press, New York. 259-311.
- Liukkonen T.** (2006): Finnish native grey partridge (*Perdix perdix*) population differs clearly in mitochondrial DNA from the farm stock used for releases. *Ann. Zool. Fennici* 43, 271-279.
- Liukkonen-Anttila T., Uimaniemi L., Orell M & Lumme J.** (2002): Mitochondrial DNA and the phylogeography of the grey partridge (*Perdix perdix*) in Europe: from Pleistocene history to present day populations. *Journal of Evolutionary Biology* 15, 971-982.
- Luikart G. & Cornuet J.-M.** (1998): Empirical evaluation of a test for identifying recently bottlenecked populations from allele frequency data. *Conservation Biology* 12 (1), 228-237.
- Marshall T.C., Slate J., Kruuk L.E.B. & Pemberton J.M.** (1998): Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. *Molecular Ecology* 7, 639-655.
- Mautner S., Gmeiner M., Hammer S. & Suchentrunk F.** (unpublished): Characterization of five cross-species amplified microsatellite loci for grey partridge (*Perdix perdix*).
- Oliveira E.J., Pádua J.G., Zucchi M.I., Vencovsky R. & Carneiro Vieira M.L.** (2006): Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. *Genetics and Molecular Biology* 29 (2), 294-307.
- Oring L.W.** (1982): Avian mating systems. In *Avian biology*, Vol. 6 (ed. Farner D.S., King J.S. Parkes K.C.). Academic Press, New York. 1-92.

Parker G.A. (1990): Sperm competition games-raffles and roles. *Proceedings of the Royal Society B* 242, 120-126.

Peakall R. & Smouse P.E. (2006): GENALEX 6: Genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes* 6 (1), 288-295.

Polzin T. & Daneschmand S.V. (2003): On Steiner trees and minimum spanning trees in hypergraphs. *Operations Research Letters* 31, 12-20.

Potts G.R. (1986): *The partridge: pesticides, predation and conservation*. Collins, London.

Price T.D. & Bouvier M.M. (2002): The evolution of F-1 postzygotic incompatibilities in birds. *Evolution* 56, 2083-2089.

Primmer C.R., Raudsepp T., Chowdhary B.P., Møller A.P. & Ellegren H. (2011): Low frequency of microsatellites in the avian genome. *Genome Research* 7, 471-482.

Pritchard J. K., Matthew Stephens M. & Donnelly P. (2000): Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155: 945-959.

Reed K.M., Mendoza K.M. & Beattie C.W. (2000): Comparative analysis of microsatellite loci in chicken and turkey. *Genome* 43, 796-802.

Rosenberg N.A. (2004): DISTRUCT: a program for the graphical display of population structure, *Molecular Ecology Notes* 4, 137-138.

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

Semple K., Wayne R.K. & Gibson R.M. (2001): Microsatellite analysis of female mating behaviour in lek-breeding sage grouse. *Molecular Ecology* 10, 2043-2048.

Sia E.A., Butler C.A., Dominska A., Greenwell P., Fox T.D. & Peters T.D. (2000): Analysis of microsatellite mutations in the mitochondrial DNA of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proceeding of the National Academy of Sciences* 97, 250-255.

Šťastný K. & Bejček V. (2003): Červený seznam ptáků České republiky. In: Plesník J., Hanzal J., Brejšková L. (eds.): Červený seznam ohrožených druhů České republiky: Obratlovci. *Příroda* 22, Praha, 82-103.

- Taberlet P., Fumagalli L., Wust-Saucy A.G., Cossons J.F. (1998):** Comparative phylogeography and postglacial colonization routes in Europe. *Molecular Ecology* 7, 453-464.
- Tautz D. (1989):** Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucleic Acids Research* 17, 6463-6471.
- Taylor S.E., Oyler-McCance S.J. & Quinn T.W. (2003):** Isolation and characterization of microsatellite loci in Greater Sage-Grouse (*Centrocercus urophasianus*). *Molecular Ecology Notes* 3, 262-264.
- Thompson J.D., Higgins D.G., Gibson T.J. (1994):** CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* 22, 4673-4680.
- Tóth G., Gáspári Z. & Jurka J. (2000):** Microsatellites in different eukaryotic genomes: Survey and analysis. *Genome research* 10, 967-981.
- Trivers R.L. (1972):** Parental investment and sexual selection. In *Sexual selection and the descent of man, 1871-1971* (ed. Campbell B.), Aldine, Chicago. 136-179.
- Tucker G.M. & Heath M.F. (1994):** Birds in Europe, their conservation status. Birdlife conservation series no. 3. Birdlife International, Cambridge.
- Waples R.S. & Do Ch. (2008):** LDNE: a program for estimating effective population size from data on linkage disequilibrium. *Molecular Ecology Resources* 8, 753-756.
- Waples R.S. (2006):** A bias correction for estimates of effective population size based on linkage disequilibrium at unlinked gene loci. *Conservation Genetics* 7, 167-184.
- Weir B.S. & Cockerham C.C. (1984):** Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution* 38 (6), 1358-1370.
- Yasui Y. (1998):** The genetic benefits of female multiple mating reconsidered. *Trends in Ecology and Evolution* 13, 246-250.
- Zane L., Bargelloni L. & Patarnello T. (2002):** Strategies for microsatellite isolation: a review. *Molecular Ecology* 11, 1-16.

7. Přílohy

Příloha č. 1: Izolace mikrosatelitů a designování mikrosatelitových primerů

Níže zmíněný postup je podle protokolu pro Praktikum izolace mikrosatelitů a designování mikrosatelitových primerů (Dušková, 2009).

Základem je poměrně velké množství vstupní DNA, optimálně 6-10 μl , o koncentraci 500-1000 $\text{ng}/\mu\text{l}$.

1. Restrikce

Pro restrikci jsem použila tři restrikční enzymy od Fermentas: HaeII, AluI, RsaI. Pro každý ze jmenovaných enzymů jsem připravila restrikční směs zvlášť, štěpení každého vzorku tak probíhalo ve třech různých mikrozkušavkách najednou.

Restrikční směs pro 1 vzorek:

DNA	4 μl
restrikční pufr	0,9 μl
ddH ₂ O	3,1 μl
restrikční enzym	1,0 μl

Zkušavky s restrikční směsí jsem následně umístila do termocycleru na program:

3 hod	37°C
10 min	65°C

2. Ligace

K rozštěpené DNA jsem poté připojila adaptory, které mi umožnily amplifikaci DNA fragmentů:

5' 3'

21-mer CTC TTG CTT ACG CGT GGA CTA

25-mer PO₄ TAG TCC ACG CGT AAG CAA GAG CAC A

Ligační směs pro 1 vzorek:

rozštěpená DNA 27 μ l (všechny tři restriční produkty se smíchají dohromady)

10x ligační pufr	1 μ l
adaptory (10 pmol/ μ l)	3 μ l
ATP (10 mM)	2,5 μ l
50% PEG 4000	3,5 μ l
T4 ligáza (5U/ μ l) Fermentas	3 μ l

Mikrozkumavky s ligační směsí jsem nechala inkubovat 3-4 hod. při 22°C.

3. Extrakce DNA fragmentů z gelu

Ligační směs jsem smíchala s nanášecí barvičkou LoadingDye a nanasla na agarózový gel. Po dokončení elektroforézy byl gel vyfocen přístrojem Kodak Gel Logic 100 a fragmenty o délce 400-1000 bp vyříznuty a vloženy do zkumavek. DNA z gelu jsem vyextrahovala prostřednictvím kitu DNA mini elute (QIA). Koncentraci přečištěného produktu jsem změřila na Nanodropu. Vzorky s koncentrací 100 ng/ μ l byly použity rovnou, vzorky s koncentrací vyšší jsem naředila.

4. Preamplifikace

K amplifikaci fragmentů jsem použila primer komplementární k sekvenci adaptorů – 21-mer. Vyzkoušela jsem tři různé teploty anealingu a dvě koncentrace DNA.

Preamplifikační směs pro 1 vzorek:

ddH ₂ O	17,4 μl
10x pufr	2,1 μl
dNTP	0,4 μl
primer 21-mer	0,3 μl
JSRT polymeráza	0,5 μl
DNA	0,5/1 μl

Mikrozkumavky jsme umístila do termocycleru s programem:

1 min.	94°C	
50 s	94°C	} 30x
1 min.	53/55/57°C	
2 min.	72°C	
10 min.	72°C	

Výsledek jsem zkontrolovala pomocí elektroforézy. Produkt by se měl nacházet v rozmezí 400-1000 bp. Úspěšně amplifikované produkty jsem smíchala a přečistila kitem Jet-Quick PCR product purification kit (Genomed). Na nanodropu byla pak změřena koncentrace produktu. Pro další práci jsem použila DNA s koncentrací v rozmezí 50-80 ng/μl.

5. Hybridizace biotynilovaných oligonukleotidů s DNA fragmenty

DNA fragmenty jsem hybridizovala s mikrosatelitovými oligonukleotidy, které na svém 5' konci nesou biotin:

5' 3'

BIO-(GAA)₈ biotin - GAA GAA GAA GAA GAA GAA GAA GAA

BIO-(GA)₁₁ biotin - GA GA GA GA GA GA GA GA GA GA GA

BIO-(CA)₁₀ biotin - CA CA CA CA CA CA CA CA CA CA

Hybridizační směs pro 1 vzorek:

6x SSC	100 µl
oligonukleotidy	1,5 µl (každého)
purifikované DNA fragmenty	3 µl

Mikrozkumavky s hybridizační směsí jsem pak umístila do termocycleru s programem:

5 min.	95°C
1 hod.	60°C

6. Magnetická separace fragmentů s mikrosatelitovými oblastmi

Pro magnetickou separaci fragmentů s mikrosatelitovými oblastmi jsem použila magnetické kuličky Streptavidin MagneSpher Paramagnetic Particles (Promega). Ty na svém povrchu prezentují streptavidin, na nějž se váže biotinin tzn. magnetické kuličky mají schopnost vychytat fragmenty obsahující mikrosatelit.

Ke směsi kuliček rozpuštěných v 6x SSC jsem přidala hybridizovanou denaturovanou směs. Zkumavky jsem umístila do termobloku předehřátého na 60°C a inkubovala za mírného třepání 15 min. Poté jsem je umístila do magnetického stojánku, odpipetovala supernatant a ke kuličkám ihned přidala 300 μ l 6x SSC. Inkubovala jsem je po dobu 15. min. při pokojové teplotě. Magnetickou separaci jsem provedla ještě jednou a tentokrát inkubovala 15 min. při 60°C. Na závěr jsem je ještě dvakrát rychle promyla.

Následujícím krokem je vymytí fragmentů s mikrosatelity tj. přerušování vazby mezi biotinem a streptavidinem. Ke kuličkám jsem přidala 100 μ l 0,1M NaOH (předehřátý na 60°C) a 5 min. inkubovala při 60°C za mírného třepání. Poté jsem přidala ještě 100 μ l Tris-HCl (pH 7,5), krátce zcentrifugovala a odpipetovala supernatant do označené zkumavky. Získaný eluát jsem přečistila pomocí purifikačního kitu Jet Quick PCR product purification spin kit (Genomed). Koncentraci získaného produktu jsem změřila na Nanodropu. Optimální je koncentrace mezi 5-30 ng/ μ l.

7. Amplifikace produktu obohaceného o mikrosatelitové fragmenty

Opět jsem amplifikovala prostřednictvím primeru 21-mer. A opět jsem použila tři různé teploty anealingu.

Preamplifikační směs pro 1 vzorek:

ddH ₂ O	17,4 μl
10x pufr	2,1 μl
dNTP	0,4 μl
primer 21-mer	0,4 μl
JSRT polymeráza	0,5 μl
DNA	1 μl

Mikrozkumavky jsem umístila do termocycleru s programem:

1 min.	94°C	
50 s	94°C	} 30x
1 min.	53/55/57°C	
2 min.	72°C	
10 min.	72°C	

Produkt jsem zkontrolovala na agarózovém gelu a úspěšně amplifikované produkty jsem smíchala a přečistila pomocí purifikačního kitu Jet Quick-PCR product purification kit (Genomed). Koncentraci produktu jsem změřila na Nanodropu. Pro klonování jsem použila vzorky s koncentrací 5-20 ng/μl.

8. Ligace amplifikovaných fragmentů do pGEM-Teasy vektoru (Promega)

Ligační směs pro 1 vzorek:

2x ligační pufr	1,66 μ l
pGEM-T vektor	0,33 μ l
T4 ligáza	0,33 μ l
DNA	1,0 μ l

Zkumavky s ligační směsí jsem vložila do polystyrenové krabice s vodou o pokojové teplotě. Tu jsem umístila do lednice a nechala inkubovat přes noc.

9. Transformace do kompetentních buněk

Do 2 ml zkumavek jsem přepipetovala 1 μ l ligační směsi a k ní jsem přidala 20 μ l kompetentních buněk. Směs jsem jemně protřepala v ruce a nechala 20 min. inkubovat na ledu. Poté jsem zkumavky vložila do předehřátého termomixéru spolu se zkumavkou s vodou, do které jsem umístila teploměr. Po dosažení 42°C jsem je nechala inkubovat 45-50 s. Tato teplota představuje pro buňky teplotní šok, při kterém se rozruší buněčná stěna, a tudíž se do ní může integrovat plazmid. Vzorky jsem pak umístila na 2 min. na led a následně k nim přidala 470 μ l LB média. Zkumavky jsem položila v horizontální poloze do inkubátoru a připevnila je izolepou. Nechala jsem je inkubovat po dobu 60-80 min. při teplotě 37°C a rychlosti třepání 150 rpm.

10. Vysévání buněk na plotnu

Na LB ampicilinové plotny jsem nanasla 60 μ l IPTG (10mM) a 60 μ l X-Galu (2% roztok v dimethylformamidu) a rozetřela pomocí sterilní hokejky po celé ploše plotny. Následně jsem na ně nanasla 70 μ l kompetentních buněk a opět jemně rozetřela po celé ploše. Každý vzorek jsem rozpipetovala na 5 ploten a ty jsem pak vložila dnem vzhůru do inkubátoru a nechala při 37°C inkubovat přes noc.

11. PCR úspěšných kolonií

Přes noc mi na plotnách vyrostly bakteriální kolonie. Ty byly buď bílé (obsahovaly insert), nebo modré (buňky bez insertu). Bílé kolonie posloužily jako templát pro následnou PCR reakci, do které jsem použila primery M13F a M13R, které nasedají na sekvenci vektoru v blízkosti insertu. Výsledným produktem je tedy fragment, který začíná krátkým úsekem vektorové DNA, ve středu je pak námi hledaný úsek, který jsme vnesli do vektoru, a na konci je opět krátký úsek vektorové DNA.

Směs pro 1 vzorek:

ddH ₂ O	17,4 μl
10x pufr	2,1 μl
dNTP	0,4 μl
primery M13F a M13R	0,2 μl
JSRT polymeráza	0,5 μl

DNA - část kolonie přenesená sterilním párátkem

Mikrozkumavky jsem umístila do termocycleru s programem:

1 min.	94°C	
50 s	94°C	} 35x
1 min.	56°C	
1 min. 30 s	72°C	
10 min.	72°C	

Produkt jsem opět nanesla na gel a zkontrolovala výsledek amplifikace. Produkty s délkou v rozmezí 400-1100 bp byly odeslány na sekvenaci do Macro genu.

Příloha č. 2: Sekvence mikrosatelitů

seq Ppe02

CCAGCCCCATTACCTGCATGGGCAGTGAGGAGTGG**gggatggatggagggga**
Gggatgggagggatggaggggatggatggatggatggatggatggatggatg
Gatggatggatgggttaggtggatgagtagatagaaggatgaacggatgga
aggatggaGGTAGTAAAAGACGAGGTGTCCATACAAACAGAAGAGGGACC
CTGAAGGCAAAACCAACCCCATCTCTACCCTGACTATGCAGATGCATCTC
ATCCACCGCTCTTTATTGCTACTGGACTTGGCCTTGACCGTGAACCCTAA
AGCACAGGTCAATATCTCATAAATTTGGCCTTTTCAAAGGCTTTAAAAC
GGCACCGAAAGGAATCAAAGCAGCTCCAGAAATCTAATTCATAGAAATGA
CTGCCCCAAGGAAGTCAATGCTATGACTTCCAAATGCAGCTTGCTGTTTT
AAAACAGAGGTGCAGTGAAACACCTCTGCGATACCAGATTACATCCCTGC
TGCCTGCGCTCTGGGTACCGGAGGGGCAGCTCATATGCTGCAGCCTGTGG
ATCCTGGGAGCTACATACCCATATTAGAGATGAATTACCATTACTTTTCT
CTGAAAACCCCTGCGTAGT

seq Ppe06

ACTTAAGGGCCAGGGTTAGGTCCTGCTCCTACAGACAGATCTCACCACAC
TTAGCAGGAGAGACAACCTTTCTTCCAAGCTGTGTGTAAACTCAGTTCCAG
CGTGACAGCTCTGCCAGTCCCTGGGACACGCTACCACAACCACAGGAGC
TCTGTGTTCCAGTTGAGCTGCTGCACCTTTGTTCTGTGGCTGTGCCCCAG
CTCCGCCTGTACAGCAGCCGATGCAGTCACAGCAGCAGCCGCCACAACCA
GCATCCCAGCAAAGTGTAGTGATTGTCAGCCAGCCAGCTCAGCAAGGTCA
AACGTATGCACCAGCCATTCACCAAATAGTGCTTGCTAATCCAGCTTCTA
TTCCCTCCTGGTCAGACTGTTTCAGTTGACTGGACAGCCAAGCATTACTCCA
TCTTCTTACCATCTCCAGGTCCGGTTACAAACAATCAAGTCCCTACAGT
TATGTCATCTTCTATCTACCCCTTCTCAGTCACAAGGACCCCTCCTACTG
TCAGCCAGATGCTTTCTGTAAAGAGA**cagcagcaacagcagcagcagcaa**
caacaATTCACCAGCATCTTCACAGCAACAGG

seq Ppe08

CCCTCTGCTTGCCAGAAGGGGCAGACT**gcggttgctatgagacttggagcat**
Cctcatgaaacagagagagagagagagagagagagagagagagaaaggggaagagagaga
Gagagaaaggggggggagagagagagagagagagagagagagagagagaa**tagtaa**
agcacGTCCACATTGTATAGATGCTGCTATGCTGCTCACACACAGCTCAC
CAGTCAGTACAGAAGACAGTCTCTGTACAACAAACAGAAGTGAAGTATGG
AAGATGAATACTTGGCCAACCCTCGTGCAGCAGGGATGCG

seq Ppe09

CTCCAAGCTCCATTTGCAGCGAGACAGCCTGGGCTCGTGCG**cacacaca**
cacacacacacacacacacagacacacacacacacCCTGCACATCTAAAC
TTGGGGGGTTTGGCCCCAGGACACTTCTCTCAGCCCCCCCCAGCAGCAGCC
CTGCAGCACAGGGATGGGCTGTGTTGCAGCAAAGTCTCAGCTCTTTGCTT
CCAACAGTTTGGGGGACAAAAGCAGTTCTGAGCTGTTTTTCTGGCTTGC
CCTTCTATCCTTCTAGAGAACATGGAACGAAAGTGTGCGTGGGGGAAATA
ATATCCTGGACAGGAGGGGGAGAGTGGTCCGCACCAGTCTCCGAGATCCT
CCCAAAGG

seq Ppe10

CTAAAAACAAGAATTAAAATCTGGCTGCT**tggtggtggtggtggtggtg**
gtggtggtgGTGAATGGAGATCAGAATATATTTAATTAGACAGACTTGTG
GATGAGAAGCCCCTGAATTTGTCTATCTGGATTTAACTATTGGCTTAGA
TGAACCTAAAATGTTAGGCTCATTGGAAAAACAATAGGGATAGTGAAAAG
ATCACTGTGCACTGATTCTCCTATTCTTTCTTCTTCCAAGAGACACAA
ACAGAGATGGCTGTTAGATAGTTTACCCTACTGCTGGTGTCTCTGTAA
TGCAGTTTCAACTCATTGTCATGGCTTACCTTGTGACTCAGAAG

seq Ppe13

CCGTTTGCAGTGTGTGGCAGAGCAAGTGAAGCAGAGGAGACTGCTTTTCT
TGCATCACCTGTGTTCTCTCTGTCCAGGGAGCTC**ccatccatccatc**
catccatccatccatccatccatccatccatccatccatccatccatccatcca
cccaccaccCTGGATTCTGTTTTAGCAATGCCTGAAGTGTCTTCATG
TAAAAGCTTCAGTACTTCAACCCAAACATTCCTCGCACTCTAACATCCAA
AGTTAGTTCAAATTACTCTCTTTAGAAAGGGGGAAAAAATATCTCCTTC
CTTGCTGGTAAAGTTTGTCTTCTTTCTTTCTTTCTTATGCTAGGCAATGG
CTTTCCATAGCATCACAAATAAAGCAGCAGCTTGATGAGTGTCTCAT
AGATGGACCAGAGAGGGACTGTGGAAAGTGGCTGCATCTGAGGACTGTTA
ACCAAGTATTTTAAATGCTGTAGCCAATTTAAAAAGT

seq Ppe60

ACATAAACAGCCCAATGTTTTCAAACAGCTGCTAAATGTTGAGCTCTTAT
GTGTGTGTTTGGGGCACCTGATTTTCAGCATTCTGCCATAATTCTAGGGT
TACAGCAAATTGCATTTTCTCAAGGTTATAAATCCTATAATAATTTCTGT
GAGAATTCCTCAGTAGCAGTTATCCTTTAAGAATACAGACTTGCTTATTT
TGCTGCTATCAATCATTATTTATTTCTTTCTTACCT**Ggtggtggtggtg**
tggtggtgatgGAGAAAAAATAAGTATGGGATGTCTCCTCTCTATT
GTTCTGAGAGCCCTGCAGCAAGAAGTGCATGACGGCATGGCTTGAA
CTGATCTGGCAATTGCTGTTGAAGATCATTGCTCCTGCTCATGCTTC
TCTCCTTTGCTGTGAGCTCTGTGGTTCTGTCCCTCCTCACTGCTGCCCTT
TAGTGAGTCCGTTTCACTATCTCTGTCTATTTACATTTTCCCATGTTAT
GTTTTACTGGAGCCAAATTGTTTCACTGAGGCTGTGTCTATACTAGGTAA
TAAAATATGACAGGGACTGTTCTCTGGACTCAGAGTTAAGTGGAAAGGTT
GCACTCTAGCTTGGGCTTCTCCCAAACCAGAGTGGCTGCATCTGAATTG
CCAATGGAGAGCAGTTCACTGTTTGGCCTCTGCTGTCCCTTAACCCTGC
CTGAGCATTATCTGGGAGAACCAAGCTGAGATGGGCCAAAATGGTGT
CAAAGAGAGCACTAACAGTGTGGCTCGAGCCTGT

Příloha č. 3: Seznam mikrosatelitových lokusů z cross-species amplifikace

Název lokusu	Původ primeru	Reference	Kód v Genbanku	Sekvence primeru (5' - 3')	T _{an} (°C)	Rozmezí alel (bp)	Počet alel	Barevné značení
ADL0020	Gallus gallus	Cheng & Crittenden (1994)	L23888	F: TAGATAAAAATCCTTCCCTT R: GCACTCAAAAAGAAAACAAAT	56	111 - 120	5	PET
ADL0142	Gallus gallus	Mautner et al. (unpublished)	G01567	F: CAGCCAATAGGGATAAAAGC R: CTGTAGATGCCAAGGAGTGC	56	213 - 227	7	PET
ADL0191	Gallus gallus	Cheng (unpublished)	G01612	F: AAAGGAAAGCCTATGTGAAT R: AAAGCACCAAGCGAGATACA	56	117 - 119	2	6-FAM
ADL0247	Gallus gallus	Cheng (unpublished)	G01667	F: CTCTTGTGTCTGTCTTGTG R: TGCACTGTTGTCAGTTTTCAG	52	168 - 172	2	VIC
ADL0262	Gallus gallus	Cheng (unpublished)	G01682	F: GTGCAGACACAGAGGGAAAG R: TCACATGCACACAGAGATGC	52	107 - 112	3	6-FAM
ADL0306	Gallus gallus/Meleagris gallopavo	Reed et al. (2000)	G01721	F: GTTACTGTATCTTGGCTCAT R: TCAGTTTGACTTTCCTTCAT	52	112 - 117	2	NED
ADL0315	Gallus gallus	Mautner et al. (unpublished)	G16117	F: TCCTTGGCAGTAGTTTCAA R: CTCCCATGTTGCTTCTTAG	56	248 - 255	4	6-FAM
CGCA9	Centrocercus urophasianus	Taylor et al. (2003)	AY190932	F: TGCTAGAATAAGATTTATGGAG R: TCTGCATGTGTGTGTCAGC	52	310 - 314	5	6-FAM
LEI0064	Gallus gallus	Gibbs et al. (1997)	X82808	F: TGGTTGTCTCAATACAACGTC R: CTGTAAAGATTTCTCAGAAACAG	56	284 - 308	14	PET
MCW0083	Gallus gallus	Croojimans et al. (1997)	G31946	F: GCCTTTCACCCATCTTACTGT R: TACATTTCAGAAGGAATGTTGC	56	83 - 85	2	PET
MCW0230	Gallus gallus/Meleagris gallopavo	Croojimans et al. (1997)	G32001	F: TGCACAGAGCCAAGCTGCTTC R: GATCCTCTGATGGCTGCCG	56	250 - 275	8	NED

Příloha č. 4: Seznam specifických mikrosatelitových lokusů izolovaných *de novo*

Název lokusu	Původ primeru	Sekvence primeru (5' - 3')	T _{an} (°C)	Motiv opakování	Velikost (bp)	Rozmezí alel (bp)	Počet alel	Barevné značení
Ppe02	nově designované	F: CATTACCTGCATGGGCAGT R: GTT T-GGGTAGAGATGGGGTTGGTT	56	(ggat) ₁₉ *	223	223 - 318	22	6-FAM
Ppe06	nově designované	F: GGACAGCCAAGCATTACTCC R: GCTGTGAAGATGCTGGTGAA	56	(cag) ₂ caa (cag) ₄ (caa) ₂ ca	196	181 - 188	4	VIC
Ppe08	nově designované	F: CTTGCAGAAGGGGCAGACT R: TGAGCAGCATAGCAGCATCT	56	(ga) ₃₁ *	181	169 - 188	4	6-FAM
Ppe09	nově designované	F: TCCATTTGCAGCGAGACA R: GTT T-TAGAAGGGCAAGCCAGAAAA	52	(ca) ₁₄ ga (ca) ₆ c	248	239 - 251	6	PET
Ppe10	nově designované	F: CAAGAATTAATAATCTGGCTGCT R: GAAGGACACCAGCAGTAGGG	52	(tg) ₁₅	288	281 - 304	5	VIC
Ppe13	nově designované	F: GCATCACCTGTGTTCTCT R: AGAGTGCAGGAATGTTTGG	52	(tcca) ₁₆ (cca) ₂ ccc	190	171 - 199	8	PET
Ppe60	nově designované	F: GCAAATTGCATTTTCTCAAGG R: GTGCAATCGCACTTCTTGCT	56	(gt) ₁₂ atg	233	231 - 248	6	VIC

* značí nedokonalé opakování repetitivní sekvence

Příloha č. 5: Genotypy adultů, lokusy z cross-species amplifikace (Milešín a Nová ves)

ID	LOKALITA	ROK	ad./ml.	SEX	ADL0020	ADL0142	ADL0191	ADL0247	ADL0262	ADL0306	ADL0315	CGCA9	LEI0064	MCW0083	MCW230											
701	Milešín	2009	ad.	F	116	116	215	221	117	119	168	172	112	112	112	112	250	250	311	311	297	300	83	85	261	261
703	Milešín	2009	ad.	F	116	120	217	225	119	119	172	172	112	112	112	112	250	250	310	310	300	300	83	83	261	263
704	Milešín	2009	ad.	F	116	116	215	225	119	119	168	172	112	112	112	112	248	250	310	313	284	300	83	83	263	263
707	Milešín	2009	ad.	F	116	116	215	217	119	119	168	172	112	112	112	117	250	250	311	313	288	300	83	85	269	269
708	Milešín	2009	ad.	M	116	116	215	217	119	119	172	172	112	112	112	112	248	250	311	313	284	302	83	83	261	261
712	Nová ves	2009	ad.	M	114	116	213	217	119	119	168	172	107	107	112	112	250	250	311	311	284	297	85	85	250	271
721	Nová ves	2009	ad.	M	116	120	213	225	119	119	172	172	112	112	112	112	250	250	311	314	297	300	83	85	271	271
723	Nová ves	2009	ad.	F	114	116	215	215	119	119	168	172	112	112	112	112	250	250	311	311	295	297	83	83	261	271
724	Nová ves	2009	ad.	M	114	116	215	217	119	119	168	172	107	107	112	117	250	250	311	314	284	297	85	85	250	250
725	Nová ves	2009	ad.	F	114	116	213	227	119	119	168	172	107	112	117	117	249	250	311	313	296	297	83	83	261	271
726	Nová ves	2009	ad.	F	116	120	213	213	119	119	168	172	112	112	117	117	248	248	311	314	296	296	83	83	263	271
729	Nová ves	2009	ad.	M	114	120	215	223	119	119	168	172	112	112	112	112	248	250	310	311	284	297	83	85	261	261
734	Nová ves	2009	ad.	M	118	118	215	221	119	119	168	172	112	112	112	117	250	250	311	311	297	298	83	83	265	265
735	Nová ves	2009	ad.	M	116	116	215	221	119	119	168	168	112	112	112	112	248	250	311	311	292	298	83	83	261	265
736	Nová ves	2009	ad.	M	116	118	213	215	119	119	168	168	112	112	112	112	248	250	311	311	297	297	83	83	261	261
737	Nová ves	2009	ad.	M	114	118	215	227	119	119	168	168	112	112	112	112	250	250	311	311	300	308	83	83	261	265
738	Nová ves	2009	ad.	F	116	118	215	227	119	119	168	168	112	112	112	117	248	250	311	311	298	300	83	83	261	265
739	Nová ves	2009	ad.	M	116	120	215	215	119	119	172	172	112	112	112	112	248	250	311	311	297	297	83	83	261	261
740	Nová ves	2009	ad.	M	116	118	215	221	119	119	168	172	112	112	112	112	250	250	311	311	304	308	83	83	261	265
742	Nová ves	2009	ad.	F	120	120	213	221	119	119	168	172	112	112	112	112	248	250	310	312	308	308	83	83	250	263
744	Nová ves	2009	ad.	F	114	116	213	217	119	119	168	168	112	112	112	112	250	250	311	311	292	295	83	85	261	271
745	Nová ves	2009	ad.		111	120	213	227	119	119	172	172	112	112	112	117	248	250	311	314	295	298	83	85	271	273
746	Nová ves	2009	ad.	M	111	118	213	215	119	119	172	172	107	112	112	117	248	250	311	312	290	296	83	85	261	273
748	Nová ves	2009	ad.		116	116	215	223	119	119	168	172	107	112	112	112	248	250	311	311	300	304	83	85	265	269
749	Nová ves	2009	ad.	M	114	116	213	215	119	119	168	172	112	112	112	112	249	249	311	314	290	297	83	83	265	275
750	Nová ves	2009	ad.	M	114	116	213	215	119	119	168	168	112	112	112	112	248	249	311	311	297	300	83	83	261	271
766	Nová ves	2009	ad.		118	120	215	221	119	119	168	168	107	107	112	112	248	250	310	314	297	300	83	83	261	261

Příloha č. 5: Genotypy adultů, lokusy z cross-species amplifikace (Písecko)

ID	LOKALITA	ROK	ad./ml.	SEX	ADL0020	ADL0142	ADL0191	ADL0247	ADL0262	ADL0306	ADL0315	CGCA9	LEI0064	MCW0083	MCW230											
Pi1	Písecko	2003	ad.	F	116	116	221	227	119	119	168	172	112	112	112	112	248	250	310	312	295	295	83	85	263	263
Pi11	Písecko	2003	ad.	M	114	120	215	217	119	119	168	172	112	112	112	117	250	250	313	314	290	306	83	85	261	261
Pi12	Písecko	2003	ad.	F	116	120	217	221	119	119	172	172	112	112	112	112	248	248	311	311	295	306	83	83	261	263
Pi13	Písecko	2003	ad.	M	111	114	215	217	119	119	168	172	110	112	112	112	250	255	313	313	298	306	83	83	261	261
Pi14	Písecko	2003	ad.	F	111	120	217	221	119	119	168	168	112	112	117	117	248	250	313	313	296	298	83	83	261	263
Pi15	Písecko	2003	ad.	M	116	120	221	227	119	119	168	172	112	112	112	112	248	250	310	312	295	295	83	85	263	263
Pi2	Písecko	2003	ad.	M	116	118	221	221	119	119	172	172	112	112	112	117	248	250	312	312	296	298	83	83	261	261
Pi24	Písecko	2003	ad.	F	116	118	217	221	119	119	168	172	112	112	117	117	249	250	312	312	292	292	83	83	271	271
Pi26	Písecko	2003	ad.	F	120	120	217	217	119	119	168	172	112	112	112	112	250	250	312	312	290	292	83	83	261	263
Pi27	Písecko	2003	ad.	F	120	120	217	221	119	119	168	172	112	112	112	117	250	250	312	312	292	298	83	83	261	261
Pi28	Písecko	2003	ad.	M	120	120	217	221	119	119	172	172	112	112	112	117	250	250	312	312	292	298	83	83	261	261
Pi29	Písecko	2004	ad.	M	111	120	215	217	119	119	168	168	112	112	112	117	250	250	312	312	288	297	83	83	261	263
Pi3	Písecko	2003	ad.	F	114	116	215	217	119	119	168	168	112	112	112	117	249	250	311	311	290	295	83	85	261	263
Pi30	Písecko	2004	ad.	M	120	120	215	221	119	119	168	168	112	112	117	117	248	255	312	312	298	298	83	83	261	263
Pi31	Písecko	2004	ad.	F	114	120	217	217	119	119	168	168	112	112	112	112	249	250	311	314	288	295	83	83	261	263
Pi4	Písecko	2003	ad.	F	114	120	217	221	119	119	168	168	112	112	112	117	249	250	311	314	288	295	83	83	261	261
Pi7	Písecko	2003	ad.	M	116	120	221	221	119	119	172	172	112	112	112	112	249	250	312	312	300	300	83	85	261	261
Pi9	Písecko	2003	ad.	M	116	116	217	221	119	119	168	168	112	112	112	112	250	255	312	312	300	302	83	85	273	273

Příloha č. 5: Genotypy adultů, lokusy z cross-species amplifikace (Stodůlky)

ID	LOKALITA	ROK	ad./ml.	SEX	ADL0020	ADL0142	ADL0191	ADL0247	ADL0262	ADL0306	ADL0315	CGCA9	LEI0064	MCW0083	MCW230											
St1	Stodůlky	2001	ad.	F	120	120	217	221	119	119	168	172	112	112	117	117	248	249	312	312	300	304	85	85	261	261
St10	Stodůlky	2001	ad.	M	116	116	221	227	119	119	168	172	112	112	112	112	255	255	312	312	295	298	83	83	261	271
St13	Stodůlky	2001	ad.	F	116	120	223	225	119	119	168	168	112	112	117	117	249	250	312	312	286	300	83	85	261	271
St14	Stodůlky	2001	ad.	F	116	120	223	225	117	119	168	172	112	112	112	117	249	250	310	312	286	300	83	85	261	271
St15	Stodůlky	2001	ad.	F	116	120	223	223	117	119	168	168	112	112	117	117	249	255	312	312	288	300	85	85	261	271
St17	Stodůlky	2001	ad.	F	116	120	215	223	119	119	168	168	112	112	112	117	249	250	311	312	300	302	85	85	271	271
St18	Stodůlky	2001	ad.	F	116	120	215	227	119	119	172	172	112	112	112	117	248	250	311	313	295	304	83	85	263	271
St19	Stodůlky	2001	ad.	M	116	120	215	227	119	119	168	172	112	112	112	112	248	255	311	312	295	304	83	83	261	271
St2	Stodůlky	2001	ad.	F	116	116	217	227	119	119	168	172	112	112	112	117	248	250	311	312	288	304	83	85	263	271
St21	Stodůlky	2001	ad.	M	116	120	215	215	119	119	172	172	112	112	112	112	248	255	313	313	286	300	83	85	271	271
St22	Stodůlky	2001	ad.	M	116	116	215	215	119	119	168	172	112	112	112	117	250	250	311	312	302	306	83	85	271	271
St23	Stodůlky	2001	ad.	M	116	120	215	221	119	119	168	172	112	112	112	112	250	255	312	313	288	304	83	83	271	271
St24	Stodůlky	2001	ad.	M	116	120	215	221	119	119	168	172	112	112	112	112	249	255	311	314	297	304	83	83	271	271
St25	Stodůlky	2001	ad.	M	116	120	215	221	119	119	168	172	112	112	112	112	250	255	313	314	288	295	83	83	263	271
St28	Stodůlky	2001	ad.	F	116	116	217	227	119	119	168	172	112	112	112	117	248	255	310	311	288	304	83	85	261	271
St29	Stodůlky	2001	ad.	F	116	120	215	215	117	119	172	172	112	112	112	117	248	250	311	313	300	306	83	85	271	271
St3	Stodůlky	2001	ad.	M	116	116	225	227	119	119	168	168	112	112	112	112	250	255	311	311	295	304	83	83	261	271
St30	Stodůlky	2001	ad.	F	116	118	223	227	119	119	168	172	112	112	112	117	248	250	311	311	300	300	83	85	271	271
St31	Stodůlky	2001	ad.	F	116	116	213	223	119	119	168	172	112	112	112	117	248	250	311	311	284	300	83	85	271	271
St4	Stodůlky	2001	ad.	F	116	116	217	225	119	119	172	172	112	112	112	117	248	250	311	312	288	300	85	85	261	261
St40	Stodůlky	2003	ad.	M	116	116	217	221	119	119	168	172	107	112	112	117	248	248	311	311	288	297	83	83	250	273
St41	Stodůlky	2001	ad.	M	120	120	223	225	117	119	168	168	112	112	117	117	249	250	311	312	286	302	83	85	261	261
St42	Stodůlky	2001	ad.	M	120	120	223	225	117	119	168	172	112	112	117	117	249	250	310	312	300	302	85	85	261	271
St43	Stodůlky	2001	ad.	M	120	120	223	225	117	119	168	172	112	112	117	117	249	250	310	312	286	288	83	85	271	271
St44	Stodůlky	2001	ad.	M	120	120	217	221	119	119	168	168	112	112	112	112	250	255	311	312	288	300	83	85	261	271
St47	Stodůlky	2001	ad.	F	116	118	213	223	119	119	168	168	112	112	112	117	250	250	311	311	300	308	83	85	271	271
St5	Stodůlky	2001	ad.	M	116	120	221	227	119	119	168	172	112	112	112	112	248	249	311	314	288	295	83	83	263	271
St55	Stodůlky	2002	ad.	F	116	120	215	215	119	119	168	168	112	112	112	117	248	248	312	313	288	295	85	85	271	271
St57	Stodůlky	2002	ad.	M	116	120	215	221	119	119	172	172	112	112	112	112	249	255	310	311	286	300	83	85	261	261
St58	Stodůlky	2002	ad.	F	111	120	223	227	119	119	168	172	112	112	112	112	248	250	311	313	288	290	83	83	271	271
St6	Stodůlky	2002	ad.	F	114	120	215	221	119	119	168	172	112	112	112	117	250	255	311	311	297	302	85	85	261	271
St62	Stodůlky	2002	ad.	M	116	116	217	221	119	119	168	172	107	112	112	117	248	248	311	311	288	297	83	83	250	273
St7	Stodůlky	2001	ad.	M	120	120	223	225	119	119	168	172	112	112	112	117	249	250	310	312	286	300	85	85	261	271
St8	Stodůlky	2001	ad.	M	120	120	215	223	119	119	168	172	112	112	112	117	250	255	310	312	286	288	85	85	261	261
St9	Stodůlky	2001	ad.	M	120	120	215	217	119	119	168	172	110	112	112	117	250	255	312	312	300	302	83	83	261	269

Příloha č. 6: Genotypy adultů, nové lokusy (Milešín a Nová ves)

ID	LOKALITA	ROK	ad./ml.	SEX	Ppe02	Ppe06	Ppe08	Ppe09	Ppe10	Ppe13	Ppe60							
701	Milešín	2009	ad.	F	268	297	184	184	180	181	239	247	290	296	175	179	233	233
703	Milešín	2009	ad.	F	223	235	184	184	169	181	247	247	296	296	183	187	233	233
704	Milešín	2009	ad.	F	235	239	184	184	169	169	247	247	290	296	187	195	233	237
707	Milešín	2009	ad.	F	243	268	184	184	182	182	247	247	296	296	187	187	233	237
708	Milešín	2009	ad.	M	223	235	184	184	169	181	239	247	290	296	183	195	235	237
712	Nová ves	2009	ad.	M	227	247	181	181	177	177	247	247	296	296	179	179	233	235
721	Nová ves	2009	ad.	M	252	272	184	184	169	181	239	247	296	296	187	191	235	235
723	Nová ves	2009	ad.	F	293	301	184	184	179	181	247	247	290	290	179	191	235	237
724	Nová ves	2009	ad.	M	227	252	184	184	169	177	239	247	296	296	179	199	235	237
725	Nová ves	2009	ad.	F	227	301	184	184	179	181	245	247	296	296	179	179	231	235
726	Nová ves	2009	ad.	F	231	318	184	184	181	181	247	247	296	296	175	187	231	235
729	Nová ves	2009	ad.	M	231	268	184	184	169	181	247	247	292	296	179	179	233	235
734	Nová ves	2009	ad.	M	231	239	184	184	169	169	239	247	290	296	175	179	231	233
735	Nová ves	2009	ad.	M	231	305	184	184	169	169	245	245	290	296	175	179	231	233
736	Nová ves	2009	ad.	M	227	243	184	184	169	181	245	247	290	296	191	195	233	235
737	Nová ves	2009	ad.	M	276	293	184	184	169	169	245	245	290	296	175	179	233	237
738	Nová ves	2009	ad.	F	293	305	184	184	169	181	245	245	290	296	175	191	233	237
739	Nová ves	2009	ad.	M	227	243	184	184	169	169	245	247	290	290	175	179	231	237
740	Nová ves	2009	ad.	M	231	310	184	184	181	181	245	247	290	296	179	195	231	233
742	Nová ves	2009	ad.	F	231	243	184	184	169	181	239	245	296	296	171	175	233	235
744	Nová ves	2009	ad.	F	239	276	184	184	177	179	239	248	296	296	175	179	233	235
745	Nová ves	2009	ad.		243	268	184	184	180	181	239	247	296	296	179	179	233	237
746	Nová ves	2009	ad.	M	297	297	184	184	169	181	239	239	296	296	175	183	231	241
748	Nová ves	2009	ad.		223	223	184	184	169	182	247	247	290	292	175	195	233	237
749	Nová ves	2009	ad.	M	223	268	184	184	169	181	245	247	296	296	179	191	235	237
750	Nová ves	2009	ad.	M	243	276	184	188	177	181	239	247	290	296	175	179	233	235
766	Nová ves	2009	ad.		276	293	184	184	169	177	245	247	296	296	179	191	233	235

Příloha č. 6: Genotypy adultů, nové lokusy (Písecko)

ID	LOKALITA	ROK	ad./ml.	SEX	Ppe02	Ppe06	Ppe08	Ppe09	Ppe10	Ppe13	Ppe60							
Pi1	Písecko	2003	ad.	F	235	293	184	184	177	181	239	247	296	296	179	179	233	233
Pi11	Písecko	2003	ad.	M	264	280	184	184	177	185	239	247	290	290	179	179	233	233
Pi12	Písecko	2003	ad.	F	235	284	184	184	179	181	239	247	296	296	179	179	233	233
Pi13	Písecko	2003	ad.	M	264	280	184	184	179	185	239	243	290	290	179	183	233	235
Pi14	Písecko	2003	ad.	F	243	293	184	184	177	181	239	239	296	296	179	195	233	237
Pi15	Písecko	2003	ad.	M	235	247	184	184	181	181	239	247	281	296	179	179	233	248
Pi2	Písecko	2003	ad.	M	235	305	184	184	181	181	239	247	296	296	179	179	233	233
Pi24	Písecko	2003	ad.	F	223	235	184	184	169	169	239	247	296	296	179	183	235	237
Pi26	Písecko	2003	ad.	F	243	314	184	184	179	181	239	239	296	296	179	179	233	235
Pi27	Písecko	2003	ad.	F	243	305	184	184	179	181	239	247	296	296	179	179	233	233
Pi28	Písecko	2003	ad.	M	293	314	184	184	179	181	239	239	296	296	179	179	233	235
Pi29	Písecko	2004	ad.	M	235	243	184	184	177	180	243	247	296	304	179	195	233	233
Pi3	Písecko	2003	ad.	F	223	235	184	184	169	181	239	247	296	296	175	179	233	235
Pi30	Písecko	2004	ad.	M	231	243	184	184	181	185	239	239	296	304	179	195	235	237
Pi31	Písecko	2004	ad.	F	223	297	184	184	181	181	239	247	296	296	175	179	233	233
Pi4	Písecko	2003	ad.	F	223	297	184	184	181	181	239	239	296	296	175	179	233	233
Pi7	Písecko	2003	ad.	M	223	297	184	184	169	177	239	245	296	296	179	179	233	233
Pi9	Písecko	2003	ad.	M	223	243	184	184	181	181	239	247	296	296	179	187	233	233

Příloha č. 6: Genotypy adultů, nové lokusy (Stodůlky)

ID	LOKALITA	ROK	ad./ml.	SEX	Ppe02	Ppe06	Ppe08	Ppe09	Ppe10	Ppe13	Ppe60							
St1	Stodůlky	2001	ad.	F	239	305	184	184	169	181	239	239	290	304	179	187	231	233
St10	Stodůlky	2001	ad.	M	293	305	184	184	177	181	247	247	296	296	175	179	233	237
St13	Stodůlky	2001	ad.	F	239	305	184	184	177	179	239	239	296	296	175	183	233	233
St14	Stodůlky	2001	ad.	F	243	305	184	184	169	177	239	247	296	296	175	191	233	241
St15	Stodůlky	2001	ad.	F	239	305	184	184	169	179	239	239	292	296	183	191	233	233
St17	Stodůlky	2001	ad.	F	239	305	184	184	177	179	239	247	290	292	175	183	233	233
St18	Stodůlky	2001	ad.	F	235	239	184	184	169	179	245	245	290	296	175	191	231	233
St19	Stodůlky	2001	ad.	M	239	293	184	184	180	181	247	251	290	296	175	175	237	237
St2	Stodůlky	2001	ad.	F	231	239	184	184	179	181	239	247	296	296	175	179	233	233
St21	Stodůlky	2001	ad.	M	231	243	184	184	177	180	247	247	290	290	175	183	233	235
St22	Stodůlky	2001	ad.	M	231	293	184	184	179	179	239	245	304	304	175	179	231	235
St23	Stodůlky	2001	ad.	M	243	293	184	184	179	180	239	251	290	304	179	183	231	233
St24	Stodůlky	2001	ad.	M	243	293	184	184	169	180	239	251	290	304	183	187	233	233
St25	Stodůlky	2001	ad.	M	243	293	184	184	179	179	239	245	290	304	179	183	231	233
St28	Stodůlky	2001	ad.	F	239	239	184	184	169	181	239	247	296	296	175	179	233	241
St29	Stodůlky	2001	ad.	F	231	293	184	184	179	180	239	247	290	304	175	183	231	235
St3	Stodůlky	2001	ad.	M	239	305	184	184	180	181	245	247	296	296	175	175	235	237
St30	Stodůlky	2001	ad.	F	239	305	183	184	169	179	239	245	296	296	175	191	235	241
St31	Stodůlky	2001	ad.	F	239	239	184	184	169	169	239	245	296	304	191	195	233	235
St4	Stodůlky	2001	ad.	F	247	305	184	184	179	183	239	247	290	296	175	179	233	237
St40	Stodůlky	2003	ad.	M	260	305	184	184	169	169	245	248	296	296	179	187	233	235
St41	Stodůlky	2001	ad.	M	239	239	184	184	169	179	239	247	292	296	179	183	233	233
St42	Stodůlky	2001	ad.	M	239	243	184	184	177	179	239	247	296	296	179	191	233	241
St43	Stodůlky	2001	ad.	M	243	305	184	184	169	177	239	247	292	296	175	191	233	233
St44	Stodůlky	2001	ad.	M	239	293	184	184	169	179	239	239	290	296	175	179	233	233
St47	Stodůlky	2001	ad.	F	231	305	184	184	177	179	245	247	296	304	175	191	233	241
St5	Stodůlky	2001	ad.	M	293	293	184	184	179	179	239	245	296	304	183	187	233	233
St55	Stodůlky	2002	ad.	F	260	293	184	184	179	181	239	245	290	304	175	191	233	233
St57	Stodůlky	2002	ad.	M	223	235	184	184	177	179	239	239	296	304	179	183	233	233
St58	Stodůlky	2002	ad.	F	231	239	184	184	179	180	239	245	296	296	179	179	233	241
St6	Stodůlky	2002	ad.	F	231	239	184	184	176	177	239	247	290	296	175	179	233	233
St62	Stodůlky	2002	ad.	M	260	305	184	184	169	169	245	248	296	296	179	187	233	235
St7	Stodůlky	2001	ad.	M	239	305	183	184	169	177	239	239	292	296	175	191	233	241
St8	Stodůlky	2001	ad.	M	239	239	184	184	169	179	239	247	290	292	179	183	233	241
St9	Stodůlky	2001	ad.	M	235	260	184	184	169	181	245	247	296	296	183	187	231	241

Příloha č. 7: Vazebná nerovnováha (linkage disequilibrium)

P-hodnoty vazebné nerovnováhy mezi všemi kombinacemi párů lokusů. Hodnoty $p < 0,05$ které by mohly naznačovat vazbu mezi lokusy, jsou označeny tučně.

Lokus 1	Lokus2	Milešín	Písecko	Stodůlky
ADL0191	ADL0315	0.55539		0.157170
ADL0191	MCW230	1.000000		0.792880
ADL0315	MCW230	0.162850	0.585970	0.217530
ADL0191	MCW0083	0.359160		0.160070
ADL0315	MCW0083	0.739530	0.956760	0.201170
MCW230	MCW0083	0.100480	0.101540	0.157560
ADL0191	ADL0020	0.748220		0.271070
ADL0315	ADL0020	0.624640	0.267850	0.139020
MCW230	ADL0020	0.013600	0.563310	0.302440
MCW0083	ADL0020	0.499110	0.069940	0.331550
ADL0191	ADL0142	1.000000		0.055960
ADL0315	ADL0142	0.473700	0.773770	0.000000
MCW230	ADL0142	0.206930	0.128000	0.047380
MCW0083	ADL0142	0.512790	0.268010	0.091990
ADL0020	ADL0142	0.249030	0.986230	0.001840
ADL0191	LEI0064	1.000000		0.727050
ADL0315	LEI0064	0.675050	0.000550	0.182630
MCW230	LEI0064	0.089480	0.325480	0.364010
MCW0083	LEI0064	0.564080	0.076450	0.125130
ADL0020	LEI0064	0.864940	0.045760	0.006190
ADL0142	LEI0064	0.643750	0.188670	0.020200
ADL0191	ADL0262	1.000000		1.000000
ADL0315	ADL0262	0.497820	0.219300	0.099530
MCW230	ADL0262	0.263420	1.000000	0.000000
MCW0083	ADL0262	0.016660	1.000000	0.084040
ADL0020	ADL0262	0.439840	0.114650	0.260360
ADL0142	ADL0262	0.968130	0.624270	0.090210
LEI0064	ADL0262	0.802890	0.539440	0.179820
ADL0191	Cgca9	1.000000		0.389610
ADL0315	Cgca9	0.670040	0.204920	0.044310
MCW230	Cgca9	0.014370	0.401680	0.290970
MCW0083	Cgca9	0.908230	0.125520	0.364570
ADL0020	Cgca9	0.053810	0.040150	0.029720
ADL0142	Cgca9	0.018910	0.521750	0.306680
LEI0064	Cgca9	0.646460	0.044900	0.301090
ADL0262	Cgca9	0.385810	0.495040	0.425430
ADL0191	ADL0247	1.000000		0.822380

Lokus 1	Lokus2	Milešín	Písecko	Stodůlky
ADL0315	ADL0247	0.715340	0.887010	0.447000
MCW0083	ADL0247	0.393150	1.000000	0.149670
ADL0020	ADL0247	0.108150	0.701670	0.626860
ADL0142	ADL0247	0.559870	0.280860	0.386330
LEI0064	ADL0247	0.483800	0.374730	0.722010
ADL0262	ADL0247	0.789000	1.000000	0.813770
Cgca9	ADL0247	0.147310	0.463450	0.169880
ADL0191	ADL0306	1.000000		0.002360
ADL0315	ADL0306	0.046450	0.357280	0.002610
MCW230	ADL0306	0.047490	0.104360	0.706510
MCW0083	ADL0306	0.437180	0.306650	0.003020
ADL0020	ADL0306	0.608630	0.354920	0.064150
ADL0142	ADL0306	0.471670	0.282430	0.045140
LEI0064	ADL0306	0.111350	0.407250	0.864590
ADL0262	ADL0306	0.655650	1.000000	0.637730
Cgca9	ADL0306	0.553800	0.835260	0.205840
ADL0247	ADL0306	0.683250	0.765590	0.549150
ADL0191	Ppe02	0.708590		0.352330
ADL0315	Ppe02	0.786260	0.008910	0.070590
MCW230	Ppe02	0.510450	0.374390	0.090480
MCW0083	Ppe02	0.037850	1.000000	0.076300
ADL0020	Ppe02	1.000000	0.428500	0.445450
ADL0142	Ppe02	1.000000	0.715140	0.000400
LEI0064	Ppe02	0.204510	0.149920	0.531250
ADL0262	Ppe02	0.457070	0.827600	0.021160
Cgca9	Ppe02	0.754780	0.771420	0.106740
ADL0247	Ppe02	0.436590	0.475800	0.038670
ADL0306	Ppe02	0.084510	0.914170	0.065230
ADL0191	Ppe08	0.479730		0.747220
ADL0315	Ppe08	0.429830	0.025200	0.026830
MCW230	Ppe08	0.300070	0.905170	0.178570
MCW0083	Ppe08	0.004930	0.347290	0.210040
ADL0020	Ppe08	0.847000	0.080370	0.102090
ADL0142	Ppe08	0.395150	0.400730	0.133380
LEI0064	Ppe08	1.000000	0.060050	0.000000
ADL0262	Ppe08	0.010060	0.382450	0.209400
Cgca9	Ppe08	0.960340	0.335240	0.027790
ADL0247	Ppe08	0.796180	0.653430	0.191970
ADL0306	Ppe08	0.693980	0.408880	0.360750
Ppe02	Ppe08	0.511220	0.336640	0.039740
ADL0191	Ppe60	0.264330		0.714650
ADL0315	Ppe60	0.312970	0.727770	0.262390
MCW230	Ppe60	0.100840	0.410190	0.092410

Lokus 1	Lokus2	Milešín	Písecko	Stodůlky
MCW0083	Ppe60	0.476780	0.551990	0.593650
ADL0142	Ppe60	0.005870	0.642180	0.010580
LEI0064	Ppe60	0.314720	0.834720	0.357530
ADL0262	Ppe60	0.385610	0.436500	0.012670
Cgca9	Ppe60	0.353310	0.443270	0.073140
ADL0247	Ppe60	0.248170	1.000000	0.325310
ADL0306	Ppe60	0.017410	0.012960	0.740450
Ppe02	Ppe60	0.533670	0.218950	0.124230
Ppe08	Ppe60	0.637260	0.206350	0.011770
ADL0191	Ppe06	1.000000		1.000000
ADL0315	Ppe06	0.145610		1.000000
MCW230	Ppe06	0.524800		1.000000
MCW0083	Ppe06	0.143840		0.722360
ADL0020	Ppe06	1.000000		0.136510
ADL0142	Ppe06	0.678550		0.774580
LEI0064	Ppe06	1.000000		0.569440
ADL0262	Ppe06	0.400110		1.000000
Cgca9	Ppe06	1.000000		0.918500
ADL0247	Ppe06	0.739400		0.707830
ADL0306	Ppe06	1.000000		0.486170
Ppe02	Ppe06	0.458430		0.783790
Ppe08	Ppe06	0.030400		0.951130
Ppe60	Ppe06	1.000000		0.160300
ADL0191	Ppe10	0.519540		0.133670
ADL0315	Ppe10	0.973600	0.279290	0.236430
MCW230	Ppe10	0.563550	0.302120	0.304980
MCW0083	Ppe10	0.081190	0.509050	0.231290
ADL0020	Ppe10	0.042490	0.680870	0.278320
ADL0142	Ppe10	0.018230	0.028900	0.000000
LEI0064	Ppe10	0.734950	0.327510	0.052560
ADL0262	Ppe10	0.104250	0.279390	0.870480
Cgca9	Ppe10	0.053610	0.208750	0.078550
ADL0247	Ppe10	0.561030	0.142830	0.520520
ADL0306	Ppe10	0.637570	0.902660	0.290620
Ppe02	Ppe10	0.852710	0.064150	0.052260
Ppe08	Ppe10	0.236580	0.051260	0.211940
Ppe60	Ppe10	0.455420	0.323480	0.363010
Ppe06	Ppe10	0.774360		0.775550
ADL0191	Ppe13	1.000000		0.184370
ADL0315	Ppe13	0.887550	0.039540	0.109310
MCW230	Ppe13	0.232150	0.046860	0.038950
MCW0083	Ppe13	0.375190	0.334720	0.032970
ADL0020	Ppe13	0.323280	0.014190	0.003670

Lokus 1	Lokus2	Milešín	Písecko	Stodůlky
ADL0142	Ppe13	0.108760	0.976780	0.002470
LEI0064	Ppe13	0.124240	0.036810	0.015800
ADL0262	Ppe13	0.409250	0.165210	0.046320
Cgca9	Ppe13	0.012600	0.169500	0.100150
ADL0247	Ppe13	0.413600	0.000000	0.561490
ADL0306	Ppe13	0.390140	0.121720	0.071130
Ppe02	Ppe13	1.000000	0.807250	0.035550
Ppe08	Ppe13	0.322880	0.099040	0.066610
Ppe60	Ppe13	0.431200	0.490450	0.093970
Ppe06	Ppe13	0.945780		0.438900
Ppe10	Ppe13	0.251020	0.296640	0.686460
ADL0191	Ppe09	0.706220		0.197450
ADL0315	Ppe09	0.870660	0.847920	0.004220
MCW230	Ppe09	0.192570	0.884940	0.005200
MCW0083	Ppe09	0.165700	0.120970	0.015580
ADL0020	Ppe09	0.268780	0.167390	0.306720
ADL0142	Ppe09	0.126830	0.398620	0.000010
LEI0064	Ppe09	0.020290	0.830700	0.000070
ADL0262	Ppe09	0.751840	0.171850	0.003610
Cgca9	Ppe09	0.593900	0.745630	0.021540
ADL0247	Ppe09	0.027290	0.612260	0.339110
ADL0306	Ppe09	0.557500	0.772550	0.008460
Ppe02	Ppe09	0.586710	0.902540	0.003920
Ppe08	Ppe09	0.968590	0.247260	0.138830
Ppe60	Ppe09	0.842640	0.567320	0.053980
Ppe06	Ppe09	1.000000		0.769370
Ppe10	Ppe09	0.610890	0.183210	0.366060
Ppe13	Ppe09	0.416520	0.352710	0.538870

Příloha č. 8: Genotypy mládřat a rodičů. Alely matky jsou označeny červeně. Neshoda mezi genotypem mládřat a genotypem jednoho z rodičů je zvýrazněna žlutě. Zeleně jsou pak zvýrazněny alely rodiče, které se nevyskytují v genotypech mládřat daného hnízda. (Některá mládřata vlastní shodné genotypy, PM2=PT6 a PK4=PK15).

HNÍZDO	ID	LOKALITA	ROK	ad./ml.	ADL0142		LEI0064		MCW230		Ppe02		Ppe09		Ppe10		Ppe13	
MATKA	Pi1	Písecko	2003	ad.	219	225	295	295	263	263	235	293	243	251	296	296	179	179
EVA	EVA1	Písecko	2003	ml.	219	219			261	263	231	293	243	251	296	296	179	195
EVA	EVA2	Písecko	2003	ml.	215	225			261	263	235	285	243	243	296	296	179	195
EVA	EVA3	Písecko	2003	ml.	215	225			261	263	285	293	243	243	296	296	179	195
EVA	EVA4	Písecko	2003	ml.	215	219	295	298	261	261	231	235	243	243	296	296	179	179
EVA	EVA5	Písecko	2003	ml.	215	225	295	296	261	261	285	293	251	251	296	296	179	179
EVA	EVA6	Písecko	2003	ml.	219	219	295	298	261	261	231	293	243	243	296	296	179	195

HNÍZDO	ID	LOKALITA	ROK	ad./ml.	ADL0142		LEI0064		MCW230		Ppe02		Ppe09		Ppe10		Ppe13	
MATKA	Pi38	Písecko	2003	ad.	215	223	290	290	261	261	231	239	243	247	296	296	179	183
OTEC	Pi25	Písecko	2003	ad.	215	225	290	306	261	263	305	314	243	243	296	296	179	179
KA	KA1	Písecko	2003	ml.	215	223	290	306	261	261	231	314	243	247	296	296	179	183
KA	KA2	Písecko	2003	ml.	223	225	290	290	261	263	231	314	243	243	296	296	179	183
KA	KA3	Písecko	2003	ml.	223	225	290	306	261	261	231	305	243	243	296	296	179	183
KA	KA4	Písecko	2003	ml.	223	225	290	306	261	261	231	305	243	247	296	296	179	183
KA	KA5	Písecko	2003	ml.	215	215	290	306	261	261	239	314	243	247	296	296	179	183
KA	KA6	Písecko	2003	ml.	215	225	290	290	261	261	231	305	243	243	296	296	179	179
KA	KA7	Písecko	2003	ml.	215	215	290	306	261	261	231	314	243	247	296	296	179	183
KA	KA9	Písecko	2003	ml.	223	225					231	314	243	247	296	296	179	183
KA	KA10	Písecko	2003	ml.	223	225	290	290	261	263	231	305	243	247	296	296	179	179
KA	KA11	Písecko	2003	ml.	215	225	290	290	261	261	239	314	243	247	296	296	179	179
KA	KA12	Písecko	2003	ml.	223	225	290	290	261	263	239	305	243	243	296	296	179	183
KA	KA13	Písecko	2003	ml.	215	225	290	306	261	261	231	314	243	247	296	296	179	183
KA	KA14	Písecko	2003	ml.	223	225	290	306	261	261	231	305	243	247	296	296	179	179
KA	KA17	Písecko	2003	ml.	215	215	290	290	261	261	239	314	243	243	296	296	179	179
KA	KA18	Písecko	2003	ml.	215	223	290	290	261	261	244	305	243	247	296	296	179	183

HNÍZDO	ID	LOKALITA	ROK	ad./ml.	ADL0142		LEI0064		MCW230		Ppe02		Ppe09		Ppe10		Ppe13	
MATKA	Pi8	Písecko	2003	ad.	219	223	290	300	261	263	223	297	243	249	296	296	175	179
PM	PM1	Písecko	2003	ml.	223	223	288	290	261	263	223	223	243	249	296	296	175	179
PM	PM2	Písecko	2003	ml.	219	223	300	300	261	261	223	297	243	249	296	296	175	179

Příloha č. 8: Genotypy mláďat a rodičů (pokračování)

HNÍZDO	ID	LOKALITA	ROK	ad./ml.	ADL0142		LEI0064		MCW230		Ppe02		Ppe09		Ppe10		Ppe13	
MATKA	Pi21	Písecko	2003	ad.	213	223	290	295	261	261	235	293	251	251	296	304	179	179
OTEC	Pi20	Písecko	2003	ad.	219	219	283	296	261	261	223	293	243	251	296	296	179	179
PK	PK2	Písecko	2003	ml.	219	223	283	290	261	261	223	293	251	251	296	296	179	179
PK	PK3	Písecko	2003	ml.	219	223	290	296	261	261	223	293	243	251	296	296	179	179
PK	PK4	Písecko	2003	ml.	213	219	283	290	261	261	223	293	251	251	296	304	179	179
PK	PK5	Písecko	2003	ml.	219	223	283	290							296	296	179	179
PK	PK7	Písecko	2003	ml.	213	219	295	296	261	261	293	293	243	251	296	304	179	179
PK	PK8	Písecko	2003	ml.	219	223	295	296	261	261	223	235	243	251	296	296	179	179
PK	PK9	Písecko	2003	ml.	213	219	283	295	261	261	223	293	243	251	296	304	179	179
PK	PK10	Písecko	2003	ml.	219	223	283	290	261	261	223	235	251	251	296	296	179	179
PK	PK11	Písecko	2003	ml.	213	219	283	295	261	261	235	293	243	251	296	304	179	179
PK	PK13	Písecko	2003	ml.	213	219	283	290	261	261	223	235	243	251	296	304	179	179
PK	PK14	Písecko	2003	ml.	219	223	290	296	261	261	223	235	251	251	296	296	179	179
PK	PK15	Písecko	2003	ml.	213	219	283	290	261	261	223	293	251	251	296	304	179	179
PK	PK16	Písecko	2003	ml.	213	219	283	295	261	261	223	235	243	251	296	304	179	179
PK	PK17	Písecko	2003	ml.	213	219	290	296	261	261	223	293	251	251	296	304	179	179
PK	PK18	Písecko	2003	ml.	219	223	290	296	261	261	235	293	243	251	296	296	179	179

HNÍZDO	ID	LOKALITA	ROK	ad./ml.	ADL0142		LEI0064		MCW230		Ppe02		Ppe09		Ppe10		Ppe13	
MATKA	Pi8	Písecko	2003	ad.	219	223	290	300	261	263	223	297	243	249	296	296	175	179
PT	PT2	Písecko	2003	ml.	223	223	290	300	261	261	223	223	243	249	296	296	175	179
PT	PT3	Písecko	2003	ml.	219	223	288	300	261	263	223	297	243	243	296	296	175	179
PT	PT4	Písecko	2003	ml.	219	223	290	300	261	263	223	301	243	249	296	296	175	179
PT	PT5	Písecko	2003	ml.	219	223	290	300	261	263	223	223	243	249	296	296	179	179
PT	PT6	Písecko	2003	ml.	219	223	300	300	261	261	223	297	243	249	296	296	175	179
PT	PT7	Písecko	2003	ml.	223	223	288	300	261	263	223	297	243	243	296	296	175	179
PT	PT8	Písecko	2003	ml.	223	223	288	300	261	261	223	297	243	249	296	296	175	175
PT	PT10	Písecko	2003	ml.	223	223	290	300	261	263	223	223	243	249	296	296	175	179
PT	PT11	Písecko	2003	ml.	219	223	300	300	261	261	223	297	243	249	296	296	179	179
PT	PT12	Písecko	2003	ml.	219	223	300	300	261	263	223	223	249	249	296	296	175	175
PT	PT13	Písecko	2003	ml.	219	223	300	300	261	263	223	297	243	243	296	296	175	175

Příloha č. 8: Genotypy mláďat a rodičů (pokračování)

HNÍZDO	ID	LOKALITA	ROK	ad./ml.	ADL0142		LEI0064		MCW230		Ppe02		Ppe09		Ppe10		Ppe13	
MATKA	PI24	Písecko	2003	ad.	215	219	292	292	271	271	223	235	243	251	296	296	179	183
PL	PL1	Písecko	2003	ml.	219	219	292	300	261	271	223	235	243	243	296	296	175	183
PL	PL2	Písecko	2003	ml.	211	219	290	292	261	271	223	227	251	251	296	304	179	179
PL	PL3	Písecko	2003	ml.	211	215	290	292	261	271	223	227	251	251	296	304	179	179
PL	PL4	Písecko	2003	ml.	219	219	292	300	261	271	227	235	243	251	296	296	175	179
PL	PL5	Písecko	2003	ml.	215	219	290	292	271	271	223	223	243	243	296	296	179	183
PL	PL6	Písecko	2003	ml.	211	219	290	292	261	271	223	227	243	251	296	304	175	179
PL	PL7	Písecko	2003	ml.	211	215	290	292	261	271	227	235	243	251	296	304	175	179
PL	PL8	Písecko	2003	ml.	211	219	292	300	271	271	223	227	251	251	296	304	179	179
PL	PL9	Písecko	2003	ml.	215	219	292	300	271	271	223	235	251	251	296	296	175	183
PL	PL10	Písecko	2003	ml.	215	219	290	292	271	271	223	235	243	251	296	296	175	179
PL	PL11	Písecko	2003	ml.	211	215	290	292	271	271	223	235	243	251	296	304	175	183
PL	PL12	Písecko	2003	ml.	211	219	290	292	261	271	223	227	243	251	296	304	175	183
PL	PL13	Písecko	2003	ml.	219	219	292	300	271	271	223	223	243	243	296	296	175	183
PL	PL14	Písecko	2003	ml.	219	219	292	300	261	271			243	243	296	296	175	183
PL	PL15	Písecko	2003	ml.			292	300	271	271	223	235	243	243	296	304	175	183
PL	PL16	Písecko	2003	ml.	211	215	292	300	261	271	223	235	243	243	296	304	175	179
PL	PL17	Písecko	2003	ml.	219	219	292	300	261	271	223	235	243	251	296	296	175	179
PL	PL18	Písecko	2003	ml.	211	215	292	300	271	271	223	235	243	251	296	304	175	183
PL	PL19	Písecko	2003	ml.	219	219	292	300	271	271	223	227	251	251	296	296	179	183

Příloha č. 8: Genotypy mláďat a rodičů (pokračování)

HNÍZDO	ID	LOKALITA	ROK	ad./ml.	ADL0142		LEI0064		MCW230		Ppe02		Ppe09		Ppe10		Ppe13	
MATKA	St90	Stodůlky	2002	ad.	213	215	288	304	263	271	223	231	243	249	296	296	175	191
OTEC	St89	Stodůlky	2002	ad.	219	225	288	300	263	271	239	293	249	249	296	304	175	179
CT	CT3	Stodůlky	2002	ml.	213	219	288	295	271	271	223	293	243	249	296	304	175	187
CT	CT4	Stodůlky	2002	ml.	215	225	288	288	263	271	231	293	243	249	296	296	175	187
CT	CT5	Stodůlky	2002	ml.	215	219	288	304	271	271	231	293	243	243	296	304	175	187
CT	CT6	Stodůlky	2002	ml.	213	219	288	304	263	271	223	293	243	249	296	304	175	183
CT	CT7	Stodůlky	2002	ml.	215	219	295	304	271	271	223	293	243	243	296	304	187	191
CT	CT8	Stodůlky	2002	ml.	213	219	288	295	263	263	231	293	243	249	296	304	187	191
HNÍZDO	ID	LOKALITA	ROK	ad./ml.	ADL0142		LEI0064		MCW230		Ppe02		Ppe09		Ppe10		Ppe13	
MATKA	St39	Stodůlky	2003	ad.	215	225	288	300	261	271	223	235	243	251	296	296	175	179
OTEC	St38	Stodůlky	2003	ad.	215	219	288	300	271	271	239	293	243	243	290	296	175	179
SM	SM1	Stodůlky	2003	ml.	219	225	288	288	271	271	223	293	243	243	296	296	175	179
SM	SM2	Stodůlky	2003	ml.	215	225	288	300	271	271	223	239	243	251	290	296	175	179
SM	SM3	Stodůlky	2003	ml.	215	219	288	288			235	293	243	243	296	296	179	179
SM	SM4	Stodůlky	2003	ml.	219	225	288	288	261	271	235	239	243	251	296	296	175	179
SM	SM5	Stodůlky	2003	ml.	215	215	300	300	271	271	235	239			290	296	179	179
SM	SM8	Stodůlky	2003	ml.	219	225					223	239			296	296	179	179
SM	SM11	Stodůlky	2003	ml.	215	215	288	300			223	239	243	251	290	296	179	179
SM	SM13	Stodůlky	2003	ml.	215	225	300	300	271	271	235	239	243	251	290	296	175	175

Příloha č. 8: Genotypy mláďat a rodičů (pokračování)

HNÍZDO	ID	LOKALITA	ROK	ad./ml.	ADL0142		LEI0064		MCW230		Ppe02		Ppe09		Ppe10		Ppe13	
MATKA	742	Nová ves	2009	ad.	211	219	308	308	250	263	231	244	243	249	296	296	171	175
OTEC	750	Nová ves	2009	ad.	211	213	297	300	261	271	244	277	243	251	290	296	175	179
12	12_1	Nová ves	2009	ml.	211	213	297	308	263	271	231	277	243	251	290	296	171	179
12	12_3	Nová ves	2009	ml.	213	219	297	308	261	263	244	244	249	251	290	296	171	175
12	12_5	Nová ves	2009	ml.	213	219	300	308	263	271	244	277	243	249	290	296	171	179
12	12_6	Nová ves	2009	ml.	213	219	297	308	261	263	244	277	243	249	290	296	175	175
12	12_9	Nová ves	2009	ml.	211	219	297	308	263	271	244	277	243	249	296	296	171	179
12	12_10	Nová ves	2009	ml.	213	219	300	308	250	271	231	277	243	243	290	296	175	179
12	12_11	Nová ves	2009	ml.	211	211	300	308	261	263	244	277	243	251	296	296	171	179
12	12_12	Nová ves	2009	ml.	211	211	297	308	250	261	231	244	243	243	296	296	175	175
12	12_14	Nová ves	2009	ml.	211	219	300	308	250	261	244	277	249	251	296	296	175	179
12	12_15	Nová ves	2009	ml.	211	213			250	271			243	243	296	296	171	179
12	12_16	Nová ves	2009	ml.	211	213	297	308	250	271	231	277	249	251	290	296	175	175
12	12_17	Nová ves	2009	ml.	213	219	297	308	263	271	244	277	243	249	290	296	171	175
12	12_18	Nová ves	2009	ml.	213	219	300	308	263	271	244	277	243	243	290	296	175	179

HNÍZDO	ID	LOKALITA	ROK	ad./ml.	ADL0142		LEI0064		MCW230		Ppe02		Ppe09		Ppe10		Ppe13	
MATKA	719	Nová ves	2009	ad.	211	219	297	300	261	261	231	252	249	251	296	296	187	191
20	20_2	Nová ves	2009	ml.	211	211	284	300	261	261			249	251	296	296	187	195
20	20_3	Nová ves	2009	ml.	209	211	297	300	261	261	231	252	249	251	296	296	191	191
20	20_8	Nová ves	2009	ml.	209	211	297	300	261	261	231	244	243	249	296	296	183	187
20	20_9	Nová ves	2009	ml.	209	211	290	300	261	261	231	244	249	251	296	296	179	191
20	20_11	Nová ves	2009	ml.	211	221	300	300	261	261	231	244	243	249	292	296	183	191
20	20_14	Nová ves	2009	ml.	211	221	290	297	261	261	231	231	243	249	292	296	187	191
20	20_16	Nová ves	2009	ml.	209	219			261	261			251	251	296	296		

Příloha č. 8: Genotypy mláďat a rodičů (pokračování)

HNÍZDO	ID	LOKALITA	ROK	ad./ml.	ADL0142		LEI0064		MCW230		Ppe02		Ppe09		Ppe10		Ppe13	
MATKA	723	Nová ves	2009	ad.	213	213	295	297	261	271	293	301	251	251	290	290	179	191
OTEC	729	Nová ves	2009	ad.	213	221	284	297	261	261	231	268	251	251	292	296	179	179
24	24_1	Nová ves	2009	ml.	213	213	284	297	261	261	268	293	251	251	290	296	179	179
24	24_2	Nová ves	2009	ml.	213	221	284	297	261	271	268	301	251	251	290	292	179	191
24	24_3	Nová ves	2009	ml.	213	221	297	297	261	261	268	301	251	251	290	292	179	191
24	24_4	Nová ves	2009	ml.	213	213	295	297	261	271	231	301	251	251	290	296	179	191
24	24_5	Nová ves	2009	ml.	213	221	297	297	261	261	231	301	251	251			179	179
24	24_6	Nová ves	2009	ml.	213	221	284	295	261	271	268	301	251	251			179	191
24	24_7	Nová ves	2009	ml.	213	213	284	297	261	271	268	301	251	251	290	296	179	179
24	24_8	Nová ves	2009	ml.	213	221	297	297	261	271	268	293	251	251	290	292	179	191
24	24_9	Nová ves	2009	ml.	213	213	295	297	261	271	268	293	251	251	290	296	179	191
24	24_10	Nová ves	2009	ml.	213	213	295	297	261	261	268	301	251	251	290	296	179	179
24	24_11	Nová ves	2009	ml.	213	213	284	295	261	271	231	293	251	251	290	296	179	191
24	24_12	Nová ves	2009	ml.	213	221	295	297	261	261	268	293	251	251	290	292	179	179
24	24_15	Nová ves	2009	ml.	213	213	284	297	261	261	268	293	251	251	290	296	179	191
HNÍZDO	ID	LOKALITA	ROK	ad./ml.	ADL0142		LEI0064		MCW230		Ppe02		Ppe09		Ppe10		Ppe13	
MATKA	725	Nová ves	2009	ad.	211	225	296	297	261	271	227	301	249	251	296	296	179	179
34	34_2	Nová ves	2009	ml.	213	225	297	304	250	261	235	301	249	251	296	296	179	179
34	34_3	Nová ves	2009	ml.	211	215	297	304	261	271	272	301	251	251	296	296	179	191
34	34_4	Nová ves	2009	ml.	213	225	297	297	261	271	227	272	251	251	296	296	179	179
34	34_5	Nová ves	2009	ml.	213	225	297	304	261	271	227	235	249	251	296	296	179	191
34	34_6	Nová ves	2009	ml.	211	213	297	297	261	271	235	301	251	251	296	296	179	191
34	34_7	Nová ves	2009	ml.	213	225	286	297	263	271	223	227	249	251	296	296	179	195
34	34_8	Nová ves	2009	ml.	213	225	297	297	261	271	227	272	243	251	296	296	179	191
34	34_9	Nová ves	2009	ml.	215	225	297	304			235	301	243	249	296	296	179	191
34	34_10	Nová ves	2009	ml.	215	225	296	304	250	261	227	235	249	251	296	296	179	179
34	34_11	Nová ves	2009	ml.	213	225	297	304	261	271	227	272	251	251	296	296	179	179

Příloha č. 8: Genotypy mláďat a rodičů (pokračování)

HNÍZDO	ID	LOKALITA	ROK	ad./ml.	ADL0142		LEI0064		MCW230		Ppe02		Ppe09		Ppe10		Ppe13	
MATKA	701	Milešín	2009	ad.	213	219	297	300	261	261	268	297	243	251	290	296	175	179
37	37_2	Milešín	2009	ml.	219	219	297	300	261	261	223	297	251	251	296	296	175	187
37	37_3	Milešín	2009	ml.	213	215	297	297	261	261			249	251	296	296	179	179
37	37_4	Milešín	2009	ml.	213	215	297	300	261	261	223	297	251	251	290	296	179	187
37	37_5	Milešín	2009	ml.	213	219	297	300	261	261	223	297	251	251	290	296	175	187
37	37_6	Milešín	2009	ml.	219	219	297	297	261	261	223	297	243	251	296	296	179	187
37	37_7	Milešín	2009	ml.	215	219	297	300	261	261	223	268	251	251	296	296	175	179
37	37_8	Milešín	2009	ml.	219	219	297	300	261	261	223	297	243	251	296	296	175	179
37	37_9	Milešín	2009	ml.	215	219	297	300	261	261	223	297	249	251	296	296	179	179
37	37_10	Milešín	2009	ml.	215	219	297	297	261	261			251	251	296	296	175	179
37	37_11	Milešín	2009	ml.	215	219	297	300	261	261			243	251	296	296	179	187
37	37_12	Milešín	2009	ml.	215	219	297	300	261	261			249	251	296	296		
37	37_13	Milešín	2009	ml.	215	219	297	300	261	261	223	268	243	251	296	296	175	187
37	37_14	Milešín	2009	ml.	213	219	297	300	261	261	223	297	243	251	290	296	175	179
37	37_15	Milešín	2009	ml.	215	219	297	297	261	261					296	296	179	179
37	37_16	Milešín	2009	ml.	215	219	300	300	261	261	223	268	243	251	296	296	179	179
37	37_17	Milešín	2009	ml.	215	219	297	300	261	261	223	297			296	296	179	179
37	37_18	Milešín	2009	ml.	219	219	300	300	261	261	223	297	243	251	296	296	175	179
37	37_19	Milešín	2009	ml.	213	219	300	300	261	261	223	268	251	251	296	296	175	179
37	37_20	Milešín	2009	ml.	219	219	297	300	261	261	223	297	251	251	296	296	175	179

Příloha č. 8: Genotypy mláďat a rodičů (pokračování)

HNÍZDO	ID	LOKALITA	ROK	ad./ml.	ADL0142	LEI0064	MCW230	Ppe02	Ppe09	Ppe10	Ppe13							
MATKA	718	Nová ves	2009	ad.	213	215	295	297	271	271	301	301	251	251	290	296	179	191
OTEC	676	Nová ves	2009	ad.	211	213	297	297	261	261	244	293	249	251	290	296	175	191
38	38_1	Nová ves	2009	ml.	213	215	295	297	261	271	293	301	251	251	290	296	175	191
38	38_4	Nová ves	2009	ml.	211	213	297	297	261	271	244	301	251	251	290	296	175	191
38	38_5	Nová ves	2009	ml.	211	215	295	297	261	271	293	301	251	251	296	296	175	179
38	38_6	Nová ves	2009	ml.	211	213	295	297	261	271	293	301	249	251	290	296	191	191
38	38_7	Nová ves	2009	ml.	211	213	297	297	261	271	293	301	251	251	290	296	191	191
38	38_8	Nová ves	2009	ml.	211	213	297	297	261	271	293	301	251	251	290	296	179	191
38	38_9	Nová ves	2009	ml.	213	215	295	297	261	271	244	301	251	251	290	296	191	191
38	38_10	Nová ves	2009	ml.	211	213	295	297	261	271	244	301	251	251	290	296	179	191
38	38_11	Nová ves	2009	ml.	211	213	297	297	261	271	293	301	251	251	290	296	175	179
38	38_12	Nová ves	2009	ml.	211	213	297	297	261	271	293	301	249	251	290	296	191	191
38	38_13	Nová ves	2009	ml.	211	215	297	297	261	271	244	301	251	251	296	296	175	191
38	38_14	Nová ves	2009	ml.	213	213	295	297	261	271	244	301	251	251	290	290	175	191
38	38_16	Nová ves	2009	ml.	213	213	295	297	261	271	244	301	249	251	290	290	179	191
38	38_17	Nová ves	2009	ml.	213	213	297	297	261	271	244	301	249	251	290	290	179	191
38	38_19	Nová ves	2009	ml.	211	213	295	297	261	271	244	301	249	251	290	296	179	191

Příloha č. 8: Genotypy mláďat a rodičů (pokračování)

HNÍZDO	ID	LOKALITA	ROK	ad./ml.	ADL0142		LEI0064		MCW230		Ppe02		Ppe09		Ppe10		Ppe13	
MATKA	717	Nová ves	2009	ad.	211	225	284	292	250	261	239	244	243	249	296	296	175	179
OTEC	676	Nová ves	2009	ad.	211	213	297	297	261	261	244	293	249	251	290	296	175	191
39	39_2	Nová ves	2009	ml.	215	225			261	261			249	249	296	296	179	179
39	39_3	Nová ves	2009	ml.	215	225			250	261			249	251	296	296	179	179
39	39_4	Nová ves	2009	ml.	211	225	292	297	250	261	223	239	243	251	296	296	179	179
39	39_5	Nová ves	2009	ml.	211	211	284	300	261	261	223	239	243	249	296	296	179	179
39	39_6	Nová ves	2009	ml.	211	225	292	300	250	261	223	244	249	249	296	296	175	179
39	39_7	Nová ves	2009	ml.	211	225	292	300	261	261	239	244	243	251	296	296	179	179
39	39_8	Nová ves	2009	ml.	215	225	292	300	250	261	244	244	243	249	296	296	179	179
39	39_10	Nová ves	2009	ml.	215	225	292	300	261	261	239	244	243	251	296	296	179	179
39	39_11	Nová ves	2009	ml.	215	225	292	297	261	261	223	239	249	249	296	296	175	179
39	39_12	Nová ves	2009	ml.	211	225	284	300	261	261	223	244			296	296	179	179
39	39_13	Nová ves	2009	ml.	215	225	284	297	250	261	244	244			296	296	179	179
39	39_14	Nová ves	2009	ml.	211	225	284	300	250	261	239	244	249	251	296	296	179	179
39	39_15	Nová ves	2009	ml.	211	225	284	300	261	261	223	244	249	251	296	296	179	179
39	39_16	Nová ves	2009	ml.	215	225	292	300	261	261	223	239	249	249	296	296	179	179
39	39_17	Nová ves	2009	ml.	211	215	292	300	250	261	223	244	249	249	296	296	175	179
39	39_18	Nová ves	2009	ml.	211	211	292	297	250	261	223	239	243	249	296	296	175	179
39	39_19	Nová ves	2009	ml.	211	215	284	297	250	261	239	244	249	251	296	296	175	179
39	39_20	Nová ves	2009	ml.	211	215	284	297	261	261	223	239	243	251	296	296	179	179

Příloha č. 9: Seznam haplotypů, které byly použity pro tvorbu haplotypové sítě

Haplotyp	Původ sekvence	Kód v Genbanku	Počet vzorků
ME	Liukkonene-Antila et al. (2006)	AF115404.1	74
MW	Liukkonene-Antila et al. (2006)	AF115405.1	137
PPL1	Liukkonene-Antila et al. (2006)	AY601123.1	2
PPL3	Liukkonene-Antila et al. (2006)	AY601125.1	1
PPL4	Liukkonene-Antila et al. (2006)	AY601126.1	24
PPL5	Liukkonene-Antila et al. (2006)	AY601127.1	1
PPL6	Liukkonene-Antila et al. (2006)	AY601128.1	1
PPL7	Liukkonene-Antila et al. (2006)	AY601129.1	14
PPL8	Liukkonene-Antila et al. (2006)	AY601130.1	11
PPL9	Liukkonene-Antila et al. (2006)	AY601131.1	11
PPL10	Liukkonene-Antila et al. (2006)	AY601132.1	1
PPL11	Liukkonene-Antila et al. (2006)	AY601133.1	7
PPL12	Liukkonene-Antila et al. (2006)	AY601134.1	2
PPL15	Liukkonene-Antila et al. (2006)	AY601137.1	1
PPL16	Liukkonene-Antila et al. (2006)	AY601138.1	1
PPL17	Liukkonene-Antila et al. (2006)	AY601139.1	1
PPLC1	Liukkonene-Antila et al. (2006)	AY601141.1	1
PPP3	Liukkonene-Antila et al. (2006)	AY601144.1	1
PPP4	Liukkonene-Antila et al. (2006)	AY601146.1	1
PPP5	Liukkonene-Antila et al. (2006)	AY601145.1	1
PPPC1	Liukkonene-Antila et al. (2006)	AY601147.1	1
PPPC2	Liukkonene-Antila et al. (2006)	AY601148.1	1
PPPC4	Liukkonene-Antila et al. (2006)	AY601150.1	1
PPPC6	Liukkonene-Antila et al. (2006)	AY601152.1	9
PPPC7	Liukkonene-Antila et al. (2006)	AY601153.1	1
E2	Liukkonen-Antila et al. (2002)		9
E3	Liukkonen-Antila et al. (2002)		22
E4	Liukkonen-Antila et al. (2002)		2
E5	Liukkonen-Antila et al. (2002)		1
E6	Liukkonen-Antila et al. (2002)		1
E7	Liukkonen-Antila et al. (2002)		1
E8	Liukkonen-Antila et al. (2002)		1
E9	Liukkonen-Antila et al. (2002)		1
E10	Liukkonen-Antila et al. (2002)		1
E11	Liukkonen-Antila et al. (2002)		1
E12	Liukkonen-Antila et al. (2002)		2
E13	Liukkonen-Antila et al. (2002)		1
E14	Liukkonen-Antila et al. (2002)		1
E15	Liukkonen-Antila et al. (2002)		1
W2	Liukkonen-Antila et al. (2002)		2
W3	Liukkonen-Antila et al. (2002)		4
W4	Liukkonen-Antila et al. (2002)		5

W5	Liukkonen-Antila et al. (2002)	1
W6	Liukkonen-Antila et al. (2002)	1
W7	Liukkonen-Antila et al. (2002)	1
W8	Liukkonen-Antila et al. (2002)	1
W9	Liukkonen-Antila et al. (2002)	7
W10	Liukkonen-Antila et al. (2002)	1
W11	Liukkonen-Antila et al. (2002)	1
W12	Liukkonen-Antila et al. (2002)	1
W13	Liukkonen-Antila et al. (2002)	1
W14	Liukkonen-Antila et al. (2002)	1
W15	Liukkonen-Antila et al. (2002)	1
W16	Liukkonen-Antila et al. (2002)	1
W17	Liukkonen-Antila et al. (2002)	6
W18	Liukkonen-Antila et al. (2002)	1
W19	Liukkonen-Antila et al. (2002)	1
W20	Liukkonen-Antila et al. (2002)	1
W21	Liukkonen-Antila et al. (2002)	1
W22	Liukkonen-Antila et al. (2002)	3
W23	Liukkonen-Antila et al. (2002)	1
W24	Liukkonen-Antila et al. (2002)	1
W25	Liukkonen-Antila et al. (2002)	1
W26	Liukkonen-Antila et al. (2002)	1
W27	Liukkonen-Antila et al. (2002)	1
W28	Liukkonen-Antila et al. (2002)	1
W29	Liukkonen-Antila et al. (2002)	2
W30	Liukkonen-Antila et al. (2002)	1
Mil	Milešín	5
Pi1	Písecko	4
Pi2	Písecko	3
St1	Stodůlky	3
St2	Stodůlky	1

Haplotypy, které nebyly zahrnuty, neboť nebyly použity pro nákres haplotypové sítě ani v jednom ze dvou zdrojových článků (Liukkonen-Antila et al. 2002, Liukkonene-Antila 2006):

Haplotypy	Původ sekvence	Kód v Genbanku
PPL2	Genbank	AY601124.1
PPL13	Genbank	AY601135.1
PPL14	Genbank	AY601136.1
PPL18	Genbank	AY601140.1
PPP1	Genbank	AY601142.1
PPP2	Genbank	AY601143.1
PPPC3	Genbank	AY601149.1
PPPC5	Genbank	AY601151.1

Příloha č. 10: Sekvence haplotypů mtDNA námi studovaných jedinců

Mi1

CCCCCCCCTTTCCCCCCCAGGGAGGGTATGCTATGTACAGCGTGCATATCT
TTGTGTTCCCCATACATTATGGTAACAGTACTATATATTATATACCGTAC
TAGGCCATTATATGTAAACGGACATTACACTATCAGCCCCATCTCTCCT
CACGTGCATATTAACCATTCTCTAAGACTATACTTGCTACCTCACCAACA
CTGCCTACAAAGCCCACAAGGCACCATAACTATTAATGGTTACAGGACAT
AATACTTAATATTCTATCACCTCCACATTTGGTTATGCTCGACGTACCAG
ATGGATTTATTGATCGGACACCTCACGAGAGATCAGCAACCCCTGCCCCGT
AATGTACTTCATGACTAGCTTCAGGCCATTCTT

Pi1

TACATAGTGTACCCCCCTTTCCCCCCCAGGGAGGGTATGCTATGTACAG
CGTGCATATCTTTGTGTTCCCCATACATTATGGTAACAGTACTATATATT
ATATACCGTACTAGGCCATTATATGTAAACGGACATTACACTATCAGCC
CCATCTCTCCTCACGTGCATATTAACCATTCTCTAAGACTATACTTGCTA
CCTCACCAACACTGCCTACAAAGCCCACAAGGCACCATAACTATTAATGG
TTACAGGACATAAATACTTAATATTCTATCACCTCCACATTTGGTTATGCT
CGACGTACCAGATGGATTTATTGATCGGACACCTCACGAGAGATCAGCAA
CCCCTGCCCCGTAATGTACTTCATGACTAGCTTCAGGCCATTCTTT

Pi2

TACATAGTGTACCCCCCTTTCCCCCCCAGGGAGGGTATGCTATGTACAG
CGTGCATATCTTTGTATTCCCCATACATTATGGTAACAGTACTATATATT
ATATACCGTACTAGGCCATTATATGTAAACGGACATTACACTATCAGCC
CCATCTCTCCTCACGTGCATATTAACCATTCTCTAAGACTATACTTGCTA
CCTCACCAACACTGCCTACAAAGCCCACAAGGCACCATAACTATTAATGG
TTACAGGACATAAATACTTAATATTCTATCACCTCCACATTTGGTTATGCT
CGACGTACCAGATGGATTTATTGATCGGACACCTCACGAGAGATCAGCAA
CCCCTGCCCCGTAATGTACTTCATGACTAGCTTCAGGCCATTCTTT

St1

TACATAGTGTACCCCCCTTTCCCCCCCAGGGAGGGTATGCTATGTACAG
CGTGCATATCTTTGTGTTCCCCATACATTATGGTAACAGTACTATATATT
ATATACCGTACTAGGCCATTATATGTAAACGGACATTACACTATCAGCC
CCATCTCTCCTCACGTGCATATTAACCATTCTCTAAGACTATACTTGCTA
CCTCACCAACACTGCCTACAAAGCCCACAAGGCACCATAACTATTAATGG
TTACAGGACATAAATACTTAATATTCTATCACCTCCACATTTGGTTATGCT
CGACGTACCAGATGGATTTATTGATCGGACACCTCACGAGAGATCAGCAA
CCCCTGCCCCGTAATGTACTTCATGACTAGCTTCAGGCCATTCTTTCCCC
CTACAC

St2

TACATAGTGTACCCCCCTTTCCCCCCCAGGGAGGGTATGCTATGTACAG
CGTGCATATCTTTGTGTTCCCCATACATTATGGTAACAGTACTATATATT
ATATACCGTACTAGGCCATTATATGTAAACGGACATTACACTATCAGCC
CCATCTCTCCTCACGTGCATATTAACCATTCTCTAAGACTATACTCGCTA
CCTCACCAACACTGCCTACAAAGCCCACAAGGCACCATAACTATTAATGG
TTACAGGACATAAATACTTAATATTCTATCACCTCCACATTTGGTTATGCT
CGACGTACCAGATGGATTTATTGATCGGACACCTCACGAGAGATCAGCAA
CCCCTGCCCCGTAATGTACTTCATGACTAGCTTCAGGCCATTCTTTCCCC
CTACAC

Příloha č. 11: Variabilní místa haplotypů control region 1 mtDNA (CR 1)

Haplotypy označené ME a MW představují dvě převažující linie, tedy východní a západní klád. Od nich jsou pak odvozeny další haplotypy značené E a W podle toho, ke které ze základních linií mají blíže. Tyto haplotypy byly získány ze studie Liukkonen-Anttila (2002) a Liukkonen (2006).

Osekvenovali jsme celkem 16 vzorků: 5 z Milešína, 7 s Písecka a 4 ze Stodůlek. U milešínských koroptví byl nalezen pouze jeden haplotyp, který odpovídá haplotypu MW, u píseckých dva odpovídající MW a W4 a u stodůleckých rovněž dva shodné s MW a W14.

ME	TAAGGTTGTA	CTTGCTTTT	CTAAATATCT	TATCTCTGT	TATCCC	-TTACATATACAGC
E2
E3
E4
E5
E6
E7
E8
E9
E10
E11
E12
E13
E14
E15
PPL1	..C.....
PPL3	..C.....
PPL4	..C.....
PPL5	..C.....
PPL6	..C.....
PPL7	..C.....
PPL8	..C.....
PPL9	..C.....
PPL10	..C.....
PPL11	..C.....
PPL12	..C.....
PPL15	..C.....
PPL16	..C.....
PPL17	..C.....
PPLC1	C.C.....
MW	-CG.....
W2	-CGC.....
W3	-CG.A.....
W4	-CG.A.....
W5	-CG.A.....
W6	-CG.A.....
W7	-CG.A.....
W8	-CG.....
W9	-CG.....
W10	-CG.....
W11	-CG.....
W12	-CG.....

W13 -CG.....G..C....AC.C..G...T.C..CT.....T.....
W14 -CG.....G..C....A....G...T.C..CT.....T.....
W15 -CG.....G..C....A....GG..T.C..CT.....T.....
W16 -CG.....G..C....A..C..G...T.C..CT.T.....T.....
W17 -CG.....G..C....A..C..G....C..CT.....T.....
W18 -CG.A....GTCC....A.-C..G...T.C..CT.....T.....
W19 -CG.....G..C....A..C..G.T.GAC.TCT.....CT..TAT....
W20 -TG.....GT.....TC..G...T.C..CT.....T.....
W21 -CG.....G.....G.-C..G...T.C..CT...TA.A.....T.....
W22 -CG.....G..C....A.-C..G...T.C..CT.....T.....
W23 -CG.....GT.C....A..C..G...T.C..CT.....T.....
W24 -CG.....GT.....A..C..G...T.C..CT.....T.....
W25 -CG.....GT...T..A..C..G...T.C..CT.T.....T.....
W26 -CG.....G..C..C.A..C..G...T.C..CT.....T.....
W27 -CG.....G..C....A..C.GG...T.C..CT.....T.....
W28 -CG.....G.....A..C..G...T.C..CT.....T.....
W29 -CG.....G..C....A..C..G...T.C..CT.....T.....
W30 -CG.....G..C....A..C..G...T.C..CT.....T.....
PPP3 -CG.....G..C....A..C..G...T.C..CT.....T..T.....
PPP4 -CG.....G..C....A..C..G...TCC..CT.....T.....
PPP5 -CG.....G..C....A..C..G...T.C..CT.....-.....-
PPPC1 -CG.....G.....A..C..G...T.C..CT.....T.....
PPPC2 -CG.....A..C.....T.C..CT.....T.....
PPPC4 -CG.....G..C....A..C.GG...T.CA.CT.....T.....
PPPC6 -CG.....G..C....A..C..G...T.C..CT.....
PPPC7 -CG.....G..C....A..C..G...T.C..CT.....-.....T.....

Tečky indikují identickou pozici nukleotidů, pomlčky delece a specifické zkratky nukleotidů (A-adenin, T-thymin, C-cytosin a G-guanin) znázorňují substituce, kterými se od sebe jednotlivé haplotypy liší. (Prvních 20 nukleotidů bylo vynecháno z důvodu nespolehlivosti dané oblasti.)