

**Univerzita Palackého v Olomouci**

**Bakalářská práce**

**Olomouc 2017**

**Monika Šuláková**

**Univerzita Palackého v Olomouci  
Přírodovědecká fakulta  
Katedra ekologie a životního prostředí**



***Cross-species* amplifikace mikrosatelitů z řádu tučňáci  
a konzervovaných ptačích mikrosatelitů u pelikána  
skvrnozobého (*Pelecanus philippensis*)**

**Monika Šuláková**

**Bakalářská práce  
předložená  
na Katedře ekologie a životního prostředí  
Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého v Olomouci**

**jako součást požadavků  
na získání titulu Bc. v oboru  
Ekologie a ochrana životního prostředí**

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

**Olomouc 2017**



Šuláková, M. (2017): *Cross-species* amplifikace mikrosatelitů z řádu tučňáci a konzervovaných ptačích mikrosatelitů u pelikána skvrnozobého (*Pelecanus philippensis*) (bakalářská práce). Olomouc: Katedra ekologie a životního prostředí PřF UP v Olomouci.

## **Abstrakt**

V této bakalářské práci jsem se zabývala hledáním polymorfních mikrosatelitů u pelikána skvrnozobého (*Pelecanus philippensis*).

V teoretické části jsem se věnovala taxonomickému zařazení pelikána skvrnozobého do systému ptáků, změnám, kterými tento systém v minulosti procházel a popsala jsem řád veslonozí (Pelecaniformes), čeleď pelikánovití (Pelecanidae), rod pelikán (*Pelecanus*) a následně biologii, ekologii a ochranu pelikána skvrnozobého. Dále jsem se zaměřila na možnosti využití molekulárních markerů v ekologii, popis repetitivní DNA s důrazem na mikrosatelity, jejich rozdělení a způsoby hledání mikrosatelitových lokusů. Poslední část rešerše jsem věnovala popisu hledání všech dosud objevených mikrosatelitů od druhů z řádu tučňáci, EST mikrosatelitů a konzervovaných ptačích mikrosatelitů.

V praktické části jsem na genomické DNA šesti nepříbuzných jedinců pelikána skvrnozobého testovala *cross-species* PCR amplifikací celkem 173 párů primerů (113 párů primerů navržených pro 9 druhů tučňáků, 36 párů primerů pro amplifikaci 35 EST mikrosatelitů a 24 párů primerů pro amplifikaci konzervovaných ptačích mikrosatelitů). Všechny páry primerů poskytly u pelikána skvrnozobého polymorfní produkt, 14 z nich bylo polymorfních a u 6 nepříbuzných jedinců jsem našla 2–5 alel.

Budoucím testováním na více jedincích bude možné zjistit populačně genetické charakteristiky těchto mikrosatelitů.

**Klíčová slova:** PCR amplifikace, *cross-species*, mikrosatelit, pelikán skvrnozobý, tučňák

Šuláková, M. (2017): Cross-species amplification of microsatellites from Sphenisciformes and conserved avian microsatellites in Spot-billed Pelican (*Pelecanus philippensis*) (bachelor thesis). Olomouc: Department of Ecology and Environmental Sciences, Faculty of Science, Palacký University Olomouc.

## **Abstract**

In this bachelor thesis I was looking for polymorphic microsatellites in Spot-billed pelican (*Pelecanus philippensis*).

In the theoretical part I dealt with taxonomic classification of Spot-billed pelican to the system of birds, changes by which it previously passed and I described order Pelecaniformes, family Pelecanidae and genus *Pelican*, followed by biology, ecology and conservation of Spot-billed pelican. I have also focused on the possibilities of using molecular markers in ecology, the description of repetitive DNA with emphasis on microsatellites, their distribution and ways of finding microsatellite loci. The last chapter of the theoretical part I described all microsatellites discovered from the penguins, EST microsatellites and CAM (Conserved Avian Microsatellites).

In the practical part I tested on the genomic DNA of six unrelated individuals of Spot-billed pelican cross-species PCR amplification of a total number of 173 primer pairs (113 primer pairs designed for 9 penguin species, 36 primer pairs for amplification of 35 EST microsatellites and 24 primer pairs for amplification conserved avian microsatellites). All of the primer pairs amplified a polymorphic product, 14 of them were polymorphic, and I found in 6 unrelated individuals 2–5 alleles.

Future tests on higher number of the individuals will determine the population genetic characteristics of these microsatellites.

Key words: PCR amplification, cross-species, microsatellite, Spot-billed pelican, penguin

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením RNDr. Petra Nádvorníka, Ph.D. s použitím citovaných literárních pramenů.

V Olomouci dne.....

.....

podpis

# Obsah

Seznam tabulek .....	viii
Seznam obrázků .....	ix
Poděkování .....	x
1 Úvod.....	1
2 Cíle práce .....	2
3 Literární přehled .....	3
3.1 Taxonomická klasifikace pelikána skvrnozobého .....	3
3.1.1 Řád veslonozí .....	3
3.1.2 Čeleď pelikánovití.....	7
3.1.3 Rod pelikán .....	8
3.2 Biologie a ekologie pelikána skvrnozobého .....	9
3.2.1 Ochrana pelikána skvrnozobého .....	11
3.3 Použití molekulárních markerů v ekologii .....	11
3.4 Repetitivní DNA.....	12
3.4.1 Rozptýlená repetitivní DNA .....	12
3.4.2 Tandemová repetitivní DNA.....	12
3.5 Mikrosatelity.....	13
3.5.1 Hledání mikrosatelitových lokusů.....	14
3.6 Mikrosatelity z řádu tučňáci .....	15
3.7 Konzervované ptačí mikrosatelity .....	19
4 Materiál a metody .....	22
4.1 Biologický materiál .....	22
4.2 PCR amplifikace mikrosatelitů.....	22
4.3 Zpracování PCR produktů pomocí elektroforetické separace.....	25
4.4 Použité chemikálie.....	28
4.5 Použité roztoky .....	29
4.6 Použité laboratorní přístroje .....	30
5 Výsledky .....	32
6 Diskuse.....	37
7 Závěr .....	43
8 Seznam použitých zkratk .....	44
9 Literatura.....	45

## Seznam tabulek

<b>Tabulka č. 1:</b> Složení PCR mixu pro 6 vzorků. ....	22
<b>Tabulka č. 2:</b> Seznam mikrosatelitů pocházejících od druhů řádu tučňáci. ....	23
<b>Tabulka č. 3:</b> Seznam EST mikrosatelitů a konzervovaných ptačích mikrosatelitů. ....	25
<b>Tabulka č. 4:</b> Charakteristika 8 polymorfních mikrosatelitů z řádu tučňáci testovaných na 6 nepříbuzných jedincích pelikána skvrnozobého.....	33
<b>Tabulka č. 5:</b> Charakteristika 6 polymorfních univerzálních ptačích mikrosatelitů testovaných na 6 nepříbuzných jedincích pelikána skvrnozobého. ....	34
<b>Tabulka č. 6:</b> Počet alel vybraných mikrosatelitových lokusů u jednotlivých testovaných druhů ptáků.....	39
<b>Tabulka č. 7:</b> Počet alel vybraných mikrosatelitových lokusů u jednotlivých testovaných druhů ptáků v rámci Laboratoře populační genetiky Katedry buněčné biologie a genetiky PřF UPOL.....	40



## Seznam obrázků

<b>Obrázek č. 1:</b> Hlavní členění třídy ptáci (Aves). .....	4
<b>Obrázek č. 2:</b> Infrařád Ciconiides. ....	4
<b>Obrázek č. 3:</b> Klad vodních ptáků. ....	5
<b>Obrázek č. 4:</b> Srovnání systémů ptáků podle Pruma <i>et al.</i> (2015) a Jarvise <i>et al.</i> (2014). .....	6
<b>Obrázek č. 5:</b> Klad Aequorlitorornithes. ....	7
<b>Obrázek č. 6:</b> Geografické rozšíření jednotlivých druhů rodu pelikán. ....	8
<b>Obrázek č. 7:</b> Pelikán skvrnozobý v letu. ....	10
<b>Obrázek č. 8:</b> Elektroforetogram produktů amplifikace mikrosatelitu CAM-11. ....	35
<b>Obrázek č. 9:</b> Elektroforetogram produktů amplifikace mikrosatelitu Em8. ....	36
<b>Obrázek č. 10:</b> Elektroforetogram produktů amplifikace mikrosatelitu Man13. ....	36

## **Poděkování**

Ráda bych poděkovala vedoucímu práce RNDr. Petru Nádvorníkovi, Ph.D. nejen za poskytnutí materiálů a vysvětlení problematiky, ale i za trpělivost, ochotu a čas, který mi věnoval během práce v laboratoři i při psaní této bakalářské práce. Také bych chtěla poděkovat kolektivu Laboratoře populační genetiky Katedry buněčné biologie a genetiky Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého v Olomouci za kolegiální a vytvoření příjemného pracovního prostředí. Za poskytnutí biologického materiálu děkuji zaměstnancům Zoologické zahrady Dvůr Králové.

# 1 Úvod

Pelikán skvrnozobý (*Pelecanus philippensis*) je asijský druh pelikána, který je podle IUCN řazen do kategorie téměř ohrožený, trend jeho současné populace je klesající a na řadě míst už je vyhynulý.

Mimo jiné vlivem lidské činnosti dochází k rušení hnízdních areálů, lovu, ztrátě mokřadů, nadměrnému rybolovu a znečišťování vodního prostředí. Na tyto disturbované lokality jsou vázány unikátní druhy vodního ptactva, které nejsou schopny se dostatečně přizpůsobit a počet jedinců v jejich populacích se tudíž snižuje. V takto oslabených populacích v rámci záchranných programů následně dochází k umělé migraci, kdy je jedna populace posílána populací jinou a může docházet k degradaci genetické informace. Zároveň hrozí v zoologických zahradách páření mezi příbuznými jedinci a následná inbrední deprese. Pro testování paternity mohou být v takovém případě použity mikrosatelitové markery.

V rámci své bakalářské práce budu hledat polymorfní mikrosatelitové lokusy u pelikána skvrnozobého, které by v budoucnosti mohly být použity k určování paternity u mláďat tohoto druhu. Analýza bude probíhat pomocí *cross-species* PCR amplifikace všech dosud známých párů primerů pro mikrosatelity z řádu tučňáci (Sphenisciformes), EST mikrosatelity a konzervované ptačí mikrosatelity u šesti nepříbuzných jedinců pelikána skvrnozobého.

## 2 Cíle práce

1. Vypracování rešerše na téma biologie, ekologie a ochrany pelikána skvrnozobého a molekulárně-ekologické využití mikrosatelitů s důrazem na mikrosatelity známé pro ptáky z řádu tučňáci a konzervované ptačí mikrosatelity.
2. Shromáždění dostupných literárních zdrojů.
3. PCR amplifikace DNA pelikána skvrnozobého s využitím *cross-species* primerů pro ptáky z řádu tučňáci a konzervovaných ptačích mikrosatelitů.

## 3 Literární přehled

### 3.1 Taxonomická klasifikace pelikána skvrnozobého

Systematické zařazení pelikána skvrnozobého je následující (del Hoyo *et al.*, 1992):

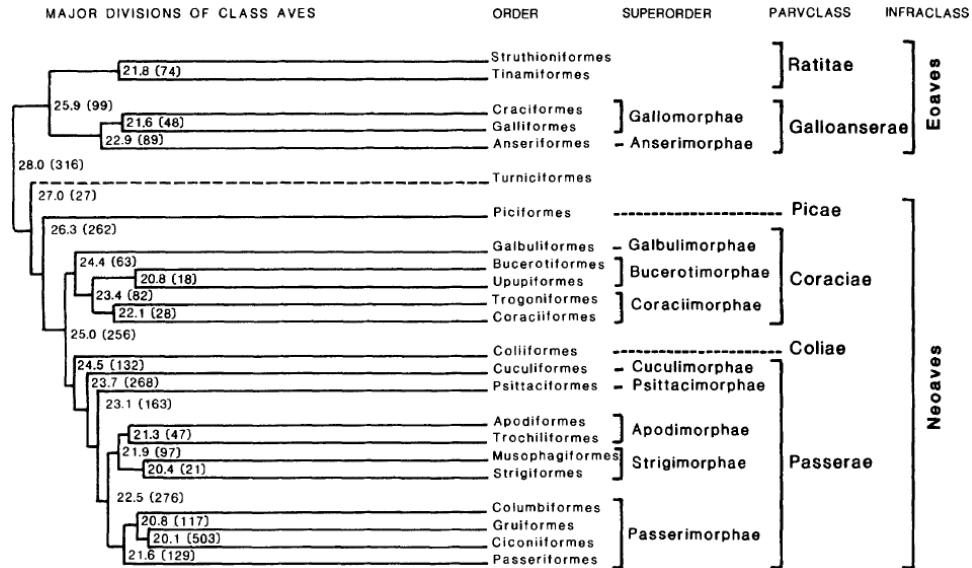
Říše:	živočichové (Animalia)
Kmen:	strunatci (Chordata)
Podkmen:	obratlovci (Vertebrata)
Třída:	ptáci (Aves)
Podtřída:	letci (Neognathae)
Řád:	veslonozí (Pelecaniformes)
Čeleď:	pelikánovití (Pelecanidae)
Rod:	pelikán ( <i>Pelecanus</i> )
Druh:	pelikán skvrnozobý ( <i>Pelecanus philippensis</i> )

#### 3.1.1 Řád veslonozí

Podle tradičního systému na základě morfologických a fyziologických znaků do řádu veslonozí patří 6 čeledí: anhingovití (Anhingidae), faetonovití (Phaethontidae), fregatkovití (Fregatidae), kormoránovití (Phalacrocoracidae), pelikánovití (Pelecanidae) a terejovití (Sulidae). Druhy tohoto řádu spojuje charakteristika, že jsou to velcí vodní ptáci s veslovacíma nohama a všechny 4 prsty mají spojené plovací blánou. Pro tuto skupinu je také charakteristický roztažitelný krční vak (Gosler, 1994). I když se toto pojetí systému zdá být molekulárními metodami více či méně změněno, stále se v mnoha publikacích objevuje.

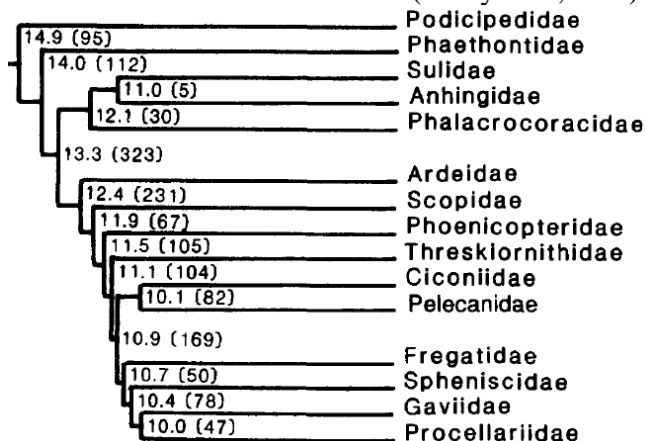
První pokusy o úpravu systému ptáků na základě molekulárních dat probíhaly už v osmdesátých letech. Výrazně změnili uspořádání dosavadního systému ptáků na základě DNA-DNA hybridizace Sibley *et al.* (1988). Podle tohoto systému je třída ptáci rozdělena na dvě infratřídy: Eoaves a Neoaves. Do Neoaves patří parvtřídy Picae, Coraciae, Coliae a Passerae. Parvtřídou Passerae Sibley *et al.* (1988) člení na nadřády Cuculimorphae, Psittacimorphae, Apodimorphae, Strigimorphae a Passerimorphae. Do nadřádu Passerimorphae patří řád měkkozobí (Columbiformes), krátkokřídlí (Gruiformes), pěvci (Passeriformes) a brodiví (Ciconiiformes). Hlavní členění třídy ptáci (Aves) je znázorněno na obrázku č. 1.

**Obrázek č. 1:** Hlavní členění třídy ptáci (*Aves*) (Sibley *et al.*, 1988).



Do řádu brodiví (*Ciconiiformes*) Sibley *et al.* (1988) řadí podřád *Charadrii* a *Ciconii*, který se skládá z infrařádu *Falconides* a *Ciconiides*. Do infrařádu *Ciconiides* jsou zařazené čeledě tradičních veslonohých a brodivých. Čeď pelikánovití (*Pelecanidae*) zahrnuje rod pelikán (*Pelecanus*) a člunozobce (*Balaeniceps rex*) a je vyhodnocena jako sesterská skupina čápovitých (*Ciconiidae*). Fregatkovití (*Fregatidae*) zde jsou sesterskou skupinou čeledí tučňákovitých (*Spheniscidae*), potáplicovitých (*Gaviidae*) a buňňákovitých (*Procellariidae*). Terejovití (*Sulidae*) a anhingovití (*Anhingidae*) tu jsou sesterskými skupinami a k nim sesterskou čeledí jsou kormoránovití (*Phalacrocoracidae*). Faetonovití (*Phaethontidae*) jsou odděleni jako samostatná skupina, jak je znázorněno na obrázku č. 2.

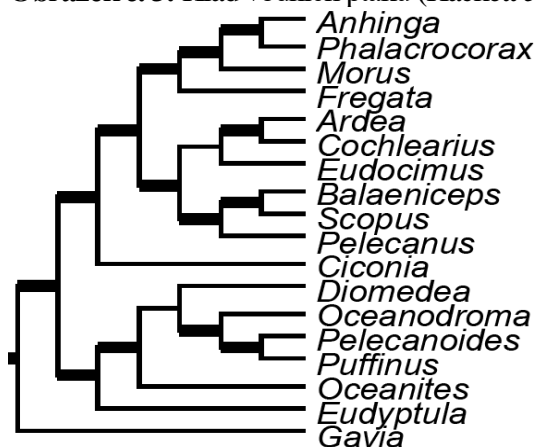
**Obrázek č. 2:** Infrařád *Ciconiides* (Sibley *et al.*, 1988).



Hackett *et al.* (2008) srovnávali velké množství sekvencí jaderné DNA 169 druhů ptáků. Zahrnuté byly všechny hlavní skupiny pěvců a většina čeledí ostatních ptáků.

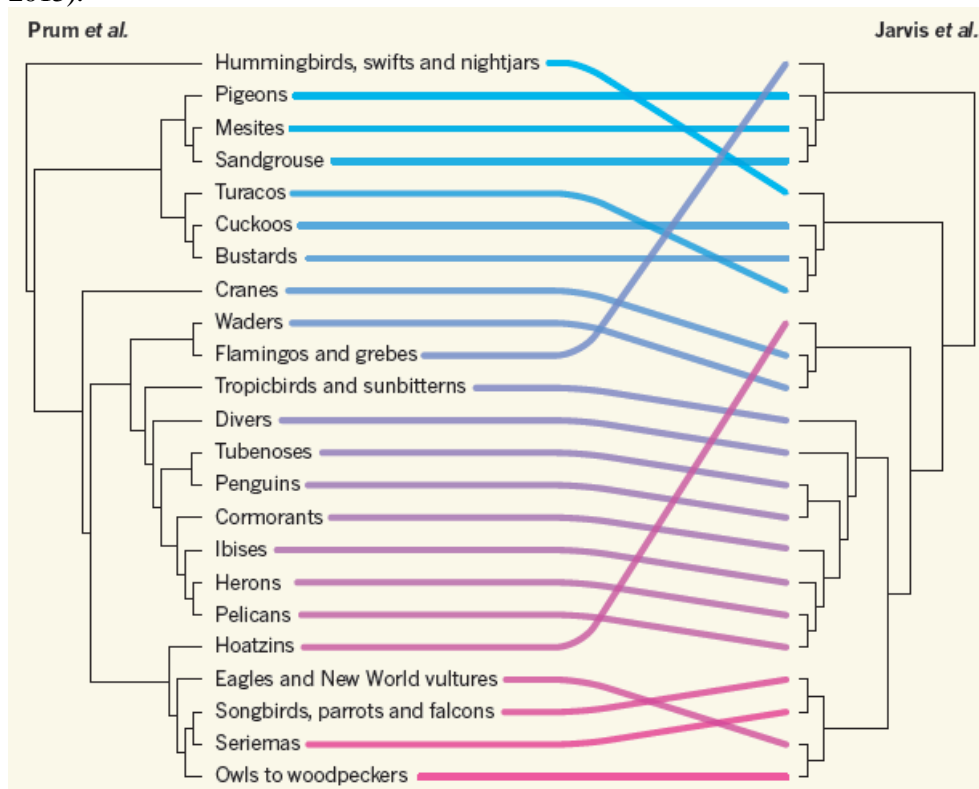
Společný klad v rámci vodních ptáků podle této studie tvoří brodiví, veslonozí, trubkonosí, tučňáci a potáplice, jak je znázorněno na obrázku č. 3. Kompaktní skupinou jsou navzájem promíchané řady brodivých a veslonožých. Výjimku tvoří faetoni, kteří jsou od ostatních veslonožých úplně odděleni. Tato promíchaná skupina se dělí na dvě části, kde v jedné části jsou čápoovití (Ciconiidae) a sesterskou skupinu k nim tvoří promíchaní ostatní brodiví a veslonozí. Tato promíchaná skupina se opět dělí na dvě části, kde v první části je většina bývalých veslonožých v tradičním pojetí, tedy anhingovití (Anhingidae) a kormoránovití (Phalacrocoracidae) jako sesterské skupiny, ke kterým jsou sesterskou skupinou terejovití (Sulidae) a ke všem těmto třem kladům jsou sesterskou skupinou fregatkovití (Fregatidae). Druhou část tvoří opět dvě skupiny, kde v první části jsou volavkovití (Ardeidae) a ibisovití (Threskiornithidae) jako sesterské skupiny a ve druhé části je kladivouš (*Scopus umbretta*) jako sesterský druh člunozobce (*Balaeniceps rex*) a tyto dva druhy jsou sesterskou skupinou pelikánů (*Pelecanus*).

**Obrázek č. 3:** Klad vodních ptáků (Hackett *et al.*, 2008).



Další studie (Jarvis *et al.*, 2014) analyzovala 48 druhů ptáků reprezentujících celý klad Neoaves. Podle této studie jsou do řádu veslonozí (Pelecaniformes) zařazeni pelikáni, volavkovití, ibisovití a kormoráni, jak je znázorněno na obrázku č. 4 vpravo. Velkým rozdílem z hlediska vodních ptáků je oproti předešlým i následným studiím zařazení plameňáků (Phoenicopteriformes) a potápek (Podicipediformes) do kladu Columbea, kam patří i měkkozobí (Columbiformes), stepokurové (Pteroclidiformes) a mesitové (Mesitornithiformes).

**Obrázek č. 4:** Srovnání systémů ptáků podle Prum *et al.* (2015) a Jarvis *et al.* (2014) (Thomas, 2015).



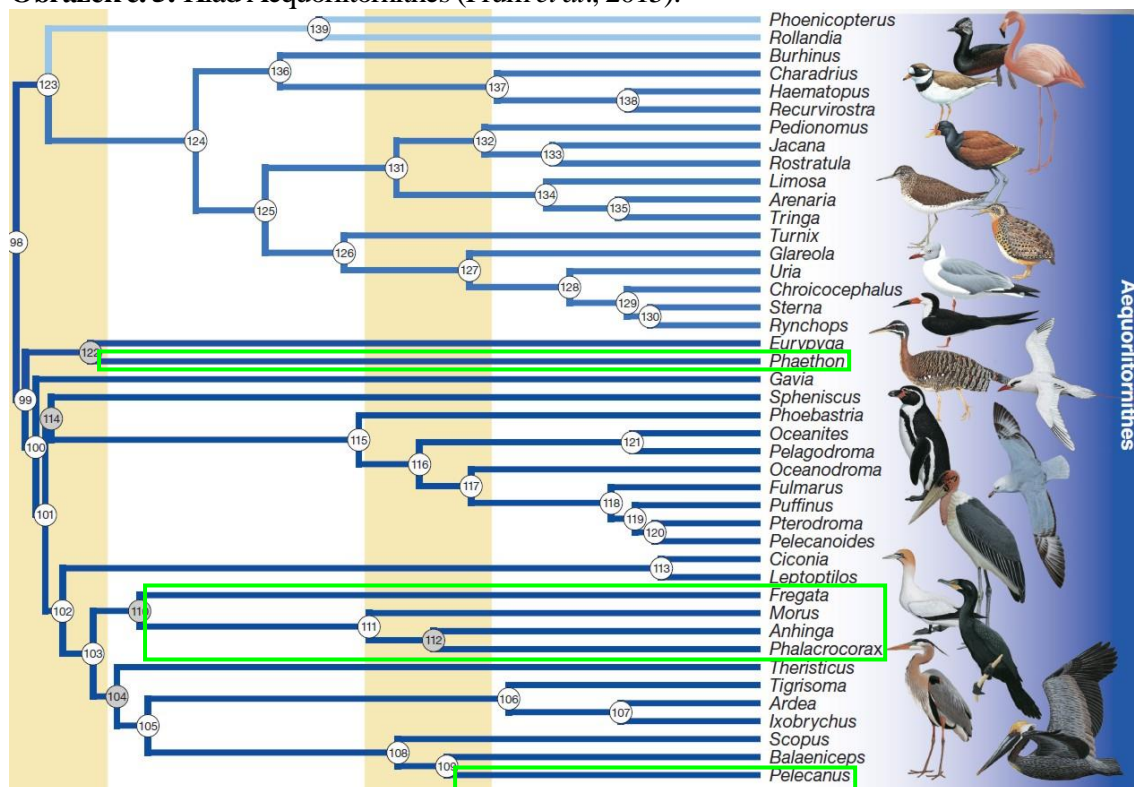
Na rozdíl od předešlé studie Prum *et al.* (2015) zkoumali sekvenční data od 198 druhů žijících ptáků ze 122 čeledí všech 40 ptačích řádů. V tomto novém pojetí systému se objevuje termín Aequorlitorornithes, což je fylogenetický klad zahrnující vodní ptáky s výjimkou vrzbozobých, který mění dosavadní chápání systému těchto ptáků v tradičním pojetí jejich řádů a nižších systematických jednotek a jejich vzájemných systematických vztahů. Viz obrázek č. 5 (a též obrázek č. 4). Aequorlitorornithes Prum *et al.* (2015) dělí na dvě sesterské skupiny. První skupina zahrnuje plameňáky (Phoenicopteriformes), potápky (Podicipediformes) a dlouhokřídlé (Charadriiformes), přičemž všechny tyto tři skupiny byly dříve řazené v systému odděleně od zbytku kladu Aequorlitorornithes. Druhá sesterská skupina zahrnuje v různém stupni příbuzenství slunatce (*Eurypyga helias*), kagu (*Rhynochetos jubatus*), potáplice (Gaviiformes), tučňáky (Sphenisciformes), trubkonosé (Procellariiformes) a všechny zástupce tradičních brodivých (Ciconiiformes) a veslonohých (Pelecaniformes).

Podle tohoto pojetí systému tvoří sesterskou skupinu člunozobec africký (*Balaeniceps rex*) společně s rodem pelikán, se kterými je sesterským druhem kladivouš africký (*Scopus umbretta*). K tomuto souboru ptáků jsou sesterskou skupinou volavkovití. A ibisovití jsou zde chápáni jako sesterský klad k seskupení výše jmenovaných ptáků.



Celý tento komplex je někdy nazýván řádem veslonozí (Pelecaniformes) (Yuri *et al.*, 2013; Winkler *et al.*, 2015), ale tento český název může být matoucí, protože pouze malá část zástupců této skuiny má veslovací nohu. Fregatky, tereje, anhingy a kormorány Prum *et al.* (2015) řadí do společného kladu, který je někdy nazýván řádem Suliformes (Yuri *et al.*, 2013; Winkler *et al.*, 2015), přestože je právě tato skupina tvořena vesměs druhy, pro které je charakteristická veslovací noha. Český název veslonozí by byl tedy logický právě pro tento klad, ale české odborné názvosloví na nový systém zatím nezareagovalo. Faetony Prum *et al.* (2015) řadí jako sesterský klad slunatce nádherného (*Eurypyga helias*) a kagu chocholatého (*Rhynochetos jubatus*). Podle tohoto systému je tradičně pojatý řád veslonozí rozdělen na 3 vzájemně oddělené skupiny (viz obrázek č. 5, zelené obdélníky) a pokud tento systém platí, je pravděpodobné, že veslovací noha se čtyřmi prsty spojenými plovací blánou vznikla v evoluci třikrát nezávisle na sobě.

**Obrázek č. 5:** Klad Aequorlitorornithes (Prum *et al.*, 2015).



Zeleně jsou zvýrazněny skupiny patřící do řádu veslonozí (Pelecaniformes) v tradičním pojetí systému.

### 3.1.2 Čeleď pelikánovití

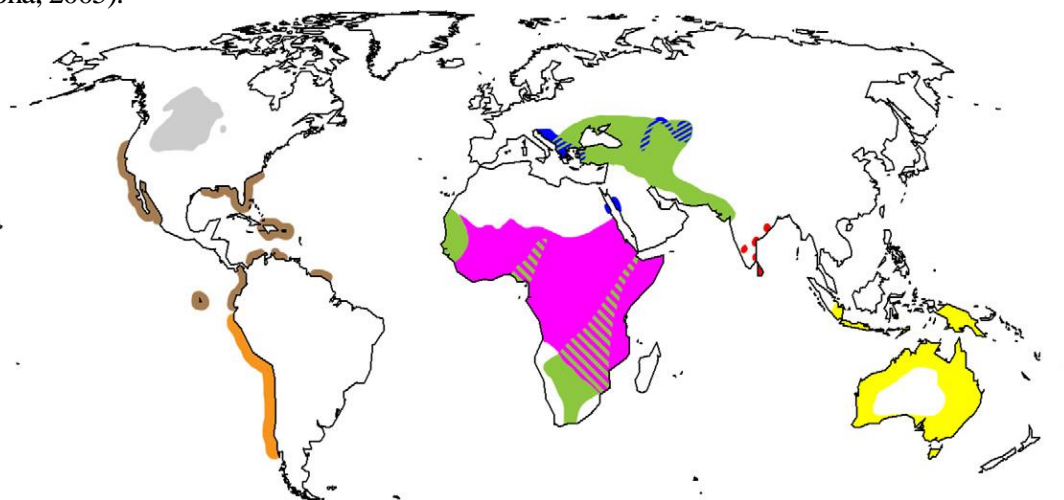
Čeleď pelikánovití (Pelecanidae) obsahující pouze jeden rod pelikán (Gosler, 1994) a zahrnuje velké vodní ptáky s dlouhým krkem a zobákem s velkým krčním vakem. Nohy mají krátké, ale s mohutnými silnými chodidly se čtyřmi prsty spojenými plovací

blánou. Dále je charakterizuje krátký ocas a většinou bílé opeření s černými konci křídel. Výjimkou je pelikán hnědý (*Pelecanus occidentalis*), který je zbarvený hnědě. Křídla jsou dlouhá a široká s rozpětím 2–2,5 m. Mimo období námluv je sexuální dimorfismus patrný zejména podle velikosti, samice jsou menší. Z pohledu hnízdní biologie jsou to koloniální ptáci, kteří si svá hnízda stavějí z větví na zemi nebo na stromech, přičemž samec sbírá stavební materiál a samice staví hnízdo. Snůška obsahuje 1–4 bílá vejce, která inkubují oba partneři po dobu 30–37 dnů a následně se starají a vychovávají nidikolní mláďata zhruba 50–70 dnů. Živí se rybami, které loví potápěním z letu (pelikán hnědý) nebo skupinovým lovem na hladině. Kořist shromažďují v roztažitelném krčním vaku.

### 3.1.3 Rod pelikán

Rod pelikán (*Pelecanus*) zahrnuje 7–8 druhů, které lze rozdělit do tří skupin. První skupinou je klad pelikánů Starého světa, kam patří pelikán kadeřavý (*P. crispus*), pelikán skvrnozobý (*P. philippensis*), pelikán africký (*P. rufescens*) a pelikán australský (*P. conspicillatus*). Druhou skupinou je monospecifický klad pelikána bílého (*P. onocrotalus*), který je sesterskou skupinu kladu pelikánů Starého světa. Třetí skupinou je klad pelikánů Nového světa zahrnující pelikána severoamerického (*P. erythrorhynchos*), pelikána hnědého (*P. occidentalis*) a pelikána chilského (*P. thagus*) (Kennedy *et al.*, 2013). Geografické rozšíření je znázorněno na obrázku č. 6.

**Obrázek č. 6:** Geografické rozšíření jednotlivých druhů rodu pelikán (Kennedy *et al.*, 2013 podle Nelsona, 2005).



Barevně jsou rozlišeny druhy: šedá - pelikán severoamerický; hnědá - p. hnědý, oranžová - p. chilský, zelená - p. bílý, růžová - p. africký, modrá - p. kadeřavý, červená - p. skvrnozobý, žlutá - p. australský. Překrývající se oblasti rozšíření jsou zobrazeny šrafovaně.

Pelikán kadeřavý (*P. crispus*) žije od jihovýchodní Evropy po Čínu, pelikán skvrnozobý (*P. philippensis*) žije v jižní Asii, pelikán africký (*P. rufescens*) žije ve střední a jižní Africe a pelikán australský (*P. conspicillatus*) obývá Austrálii (Howard *et* Moore, 1991).

Pelikán bílý (*P. onocrotalus*) se vyskytuje v jižní Evropě, v Africe a ve střední a jihovýchodní Asii (Howard *et* Moore, 1991).

Pelikán severoamerický (*P. erythrorhynchos*) se vyskytuje v Severní a Střední Americe, pelikán hnědý (*P. occidentalis*) zahrnuje 5–6 poddruhů mezi které patří pelikán kalifornský (*P. o. californicus*) na pobřeží Kalifornie a západního Mexika, pelikán východní (*P. o. carolinensis*) na pobřeží Jižní Karolíny až Venezuely, pelikán karibský (*P. o. occidentalis*) v oblasti Západní Indie, pelikán galapážský (*P. o. urinator*) na Galapágách a pelikán kolumbijský (*P. o. murphy*) na pobřeží západní Kolumbie a Ekvádoru (Howard *et* Moore, 1991). Někdy je považován za poddruh pelikána hnědého i pelikán hnědý chilský (*P. o. thagus*) vyskytující se na pobřeží Peru a Chile (Howard *et* Moore, 1991; del Hoyo *et al.*, 1992), jinde je řazen jako samostatný druh pelikán chilský (*P. thagus*) (Kennedy *et al.*, 2013; BirdLife, 2017).

Ochrana tří z osmi druhů pelikánů je jedním ze zájmů světové ochrany vodních ptáků. Za narušení kolonií jsou často zodpovědní lidé, a to buď sběrem vajec nebo usmrcením mláďat. Často jsou pelikáni pronásledováni rybáři, protože jim snižují úlovky. A například počty pelikánů hnědých v USA drasticky poklesly v důsledku používání pesticidu DDT, který způsoboval ztenčování skořápky vajec. Od té doby, co byla tato chemikálie zakázána, se do značné míry populace tohoto druhu obnovily (Winkler *et al.*, 2015). Podle IUCN (2017) je ke stupni ohrožení zranitelný (Vulnerable) řazený pelikán kadeřavý, do kategorie téměř ohrožený (Near Threatened) jsou zařazeni pelikán skvrnozobý a pelikán chilský. Ostatním druhům rodu pelikán náleží status málo dotčený (Least Concern).

### 3.2 Biologie a ekologie pelikána skvrnozobého

Pelikán skvrnozobý (*Pelecanus philippensis*) patří mezi menší zástupce čeledi pelikánovití. Délka těla se pohybuje v rozmezí 130–150 cm, hmotnost je 4–7 kg a zobák je 29–35 cm dlouhý. Zobák je pokrytý tmavými skvrnami, jak je patrné z Obrázku č. 7. Peří je barevně velmi variabilní, často šedé až hnědé a nohy jsou zbarvené většinou tmavohnědě, nehnězdící dospělí jedinci jsou špinavějšího a zašlejšího vzhledu a mláďata jsou hnědá s šedýma nohama (del Hoyo *et al.*, 1992).

**Obrázek č. 7:** Pelikán skvrnozobý v letu (foto: Jan Ševčík).



Pelikána skvrnozobého poprvé popsal Johann Friedrich Gmelin v roce 1789 na Filipínách. Rozšíření druhu bylo dříve i v oblasti jižní Indie, ale nyní je jeho areál značně redukován a tento pelikán hnízdí pouze v jihovýchodní Indii, na Srí Lance a na Sumatře (del Hoyo *et al.*, 1992). Podle aktuálnějšího zdroje (BirdLife International, 2017) se pelikán skvrnozobý vyskytuje hlavně na území Indie, Indonésie, Kambodži a na Srí Lance. Může být i na území dalších států (Jižní Korea, Laos, Malajsie, Myanmar, Nepál, Singapur, Thajsko a Vietnam). Odhadovaný rozsah výskytu je necelých 9 milionů km<sup>2</sup> na méně než 100 lokalitách.

Dříve hnízdil ve velkých koloniích v bažinách, nyní jsou takové bažiny z velké části vysušené, a proto jsou takto rozsáhlé kolonie už jen na několika místech (Gosler, 1994). Kromě bažin se vyskytuje také na březích řek a u jejich ústí, na zaplavovaných polích, vodních nádržích, velkých jezerech, brakických lagunách, zátokách a podél pobřeží. Ke hnízdění vyžaduje velké stromy, obvykle v bažinatých lesích nebo v bažinatých oblastech v savanách s preferencí neolistěných mrtvých stromů. Živí se hlavně rybami, denní spotřeba potravy se odhaduje zhruba na 1 kg. Loví obvykle samostatně, někdy ve skupinách (del Hoyo *et al.*, 1992).

Rozmnožování pelikána skvrnozobého probíhá od října do dubna, zpravidla po nástupu letního monzunu, který do oblasti přináší vydatné dešťové srážky. Námluvy

nejsou tak atraktivní a působivé jako u jiných vodních ptáků a začínají několik dní po příletu do oblasti hnízdiště (Gokula, 2011). Hnízda staví na stromech, přičemž je obvykle 3–15 hnízd na jednom stromě, často ve smíšených koloniích s čápy, volavkami nebo kormorány. Obvyklá snůška jsou 2–4 vejce, která se inkubují 30 dnů, mláďata se líhnou nahá a následně jim vyrůstá sněhobílé peří. Mláďata zůstávají v hnízdě přibližně 4 měsíce (del Hoyo *et al.*, 1992; Gokula, 2011).

### **3.2.1 Ochrana pelikána skvrnozobého**

Podle IUCN (2016) je pelikán skvrnozobý zařazen od roku 2007 do kategorie téměř ohrožený (Near Threatened), dříve, v letech 1994–2006 mu náležel status zranitelný (Vulnerable). Vyhynulý je v Bangladéši, Číně i na Filipínách, kde byl druh poprvé popsán. V současné době je dospělých jedinců přibližně 8,7–12 tisíc a jejich počet klesá (BirdLife, 2017).

V jižní Indii probíhal monitoring stavu populace pelikána skvrnozobého v letech 2000 až 2003 a v roce 2004 (Kannan *et Manakadan*, 2005). Jednalo se o oblasti Andhra Pradesh, Karnataka a Tamil Nadu. Na základě monitoringu bylo zjištěno, že se oproti dřívějším odhadům zvýšil počet hnízdících jedinců v těchto oblastech. Podle získaných dat byla velikost celkové populace jižní Indie odhadnuta na 2850–3700 jedinců. Velikost populace oblasti Andhra Pradesh byla odhadnuta na 850–1200 jedinců, v oblasti Karnataka byl odhad 350–450 jedinců a populaci oblasti Tamil Nadu tvořilo přibližně 1600–2000 jedinců.

Na Srí Lance kvůli ztrátě stanovišť, rušení hnízdních lokalit, seku mangrovů a nadměrnému rybolovu probíhal projekt pro zvýšení povědomí o klesajícím trendu populace pelikána skvrnozobého (Conservation leadership programme, 2003).

## **3.3 Použití molekulárních markerů v ekologii**

Rychlý vývoj molekulárních technik umožňuje mnohostranné využití v populační biologii. Tyto nástroje mohou být použity k určení individuálního reprodukčního úspěchu nebo k měření míry genetické divergence mezi populacemi. Volba nejvhodnější techniky závisí na rozsahu genetického polymorfismu, dostupných analytických nebo statistických přístupech a pragmatice času a nákladů (Parker *et al.*, 1998).

Často využívanými molekulárními markery pro populačně genetické, ekologické i fylogenetické studie jsou mikrosatelity (Primmer *et al.*, 2005). Pro toto využití mají mikrosatelitové markery značné výhody (Jingtao *et al.*, 2012), mezi které patří vysoká

úroveň polymorfismu, kodominance, vysoká frekvence výskytu, snadná detekce pomocí PCR a relativně nízká požadovaná kvalita DNA pro tuto detekci (Jingtao *et al.*, 2012). Tyto markery mohou být použity pro individuální identifikaci, vyloučení a potvrzení rodičovství a dalších forem příbuzenství (Parker *et al.*, 1998).

### **3.4 Repetitivní DNA**

Genomy organismů se skládají z kódující a nekódující DNA. Velká část genomu archeí a eubakterií, tedy prokaryotických organismů, obsahuje kódující DNA (Snustad *et Simmons*, 2009). Na rozdíl od prokaryot genom eukaryot z velké části tvoří DNA, která nekóduje žádné strukturní ani funkční produkty. Tato nekódující DNA je částečně tvořena introny, které se nacházejí uvnitř genů, a velkého množství repetitivní DNA, která je charakterizována opakujícími se motivy (Campbell *et Reece*, 2006). Tyto repetice mohou mít stovky až tisíce opakování (Biscotti *et al.*, 2015). Rozlišují se dva typy repetitivní DNA, rozptýlená repetitivní DNA a tandemová repetitivní DNA (Bennett, 2000).

#### **3.4.1 Rozptýlená repetitivní DNA**

Jeden úsek rozptýlené repetitivní DNA je dlouhý přibližně 100–1000 párů bází a tyto oblasti jsou rozmístěné roztroušeně v celém genomu (Campbell *et Reece*, 2006). Většinu rozptýlené repetitivní DNA tvoří transportovatelné elementy (transpozony), které se mohou přemisťovat v rámci jednoho chromozomu i z jednoho chromozomu na jiný (Snustad *et Simmons*, 2009). Rozptýlená repetitivní DNA se rozděluje na několik skupin, patří sem krátké SINEs (*Short Interspersed Nuclear Elements*) a dlouhé LINEs (*Long Interspersed Nuclear Elements*) rozptýlené jaderné elementy (Bennett, 2000).

#### **3.4.2 Tandemová repetitivní DNA**

Na rozdíl od rozptýlené repetitivní DNA mají tandemové repetice základní jednotky opakování umístěné bezprostředně za sebou (Campbell *et Reece*, 2006). Podle délky základní jednotky opakování se tandemová repetitivní DNA rozděluje na satelity, minisatelity a mikrosatelity (Bennett, 2000). Rozdělení tandemové repetitivní DNA není jednotné a u různých autorů se liší (Bennett, 2000; Tóth *et al.*, 2000; Weising *et al.*, 2005).

Tandemové repetice s nejdelší repetitivní jednotkou jsou satelity, které mají základní jednotku opakování dlouhou řádově stovky až tisíce párů bází. Obvyklá délka jednotky repetice je 100–300 bp (Weising *et al.*, 2005) a celková délka repetice je

v rozmezí od 100 kbp do několika Mbp (Bennett, 2000). Lidská satelitní DNA není transkribována a nachází se v heterochromatinu a to zejména v centromerách (Bennett, 2000).

Minisatelity mají základní jednotku opakování dlouhou řádově desítky párů bází a celková délka repetice se pohybuje v rozmezí od 100 bp do 20 kbp. Minisatelity se rozdělují na dva typy, telomerické a hypervariabilní. Telomerická DNA je dlouhá 10–15 kbp a skládá se z hexanukleotidových jednotek repetice (v lidském genomu nejčastěji TTAGGG) a tvoří telomery všech chromozomů. Mají význam při párování a orientaci chromozomů během buněčného dělení. Druhým typem je hypervariabilní minisatelitová DNA, známá také jako VNTRs (*Variable Number Tandem Repeats*) (ačkoliv podle jiného výkladu tento termín zahrnuje i satelitní a mikrosatelitové sekvence) s jednotkou repetice dlouhou 6–50 bp. Celkový počet opakování se obvykle mezi jednotlivci velmi liší. Z důvodu vysokého polymorfismu jsou tyto markery používány pro DNA profilování, fingerprinting (Bennett, 2000) a určování paternity (Weising *et al.*, 2005).

### 3.5 Mikrosatelity

Mikrosatelity, nazývané také jako STRs (*Short Tandem Repeats*) nebo SSRs (*Simple Sequence Repeats*) jsou jednoduché tandemové repetice DNA, které se vyskytují u prokaryotických i eukaryotických organismů (Zane *et al.*, 2002, Oliveira *et al.*, 2006) a nacházejí se v kódujících i nekódujících oblastech DNA (Zane *et al.*, 2002). Základní jednotka repetice je dlouhá řádově jednotky párů bází, většinou 1–6 bp (Zane *et al.*, 2002, Oliveira *et al.*, 2006, Snustad *et Simmons*, 2009) o celkové délce repetice 10–100 bp (Bennett, 2000). Mikrosatelity jsou často používány jako molekulární markery, které jsou charakterizovány tím, že podléhají mutacím více než zbytek genomu (Oliveira *et al.*, 2006).

Mikrosatelity se rozdělují podle délky jednotky repetice na mono-, di-, tri-, tetra-, penta- a hexanukleotidové. Obecně se nejčastěji v genomech různých organismů nacházejí mononukleotidové a dinukleotidové repetice. Mononukleotidové poly(A)/poly(T) repetice jsou u všech organismů mnohem frekventovanější než poly(C)/poly(G) repetice. Nejčastějším motivem dinukleotidových repetic u živočichů je AC/TG, zatímco u rostlin a hub je to AT/TA. V exonech jsou nejčastější trinukleotidové repetice a jejich nejběžnějším motivem je AAT/TTA. Nejčastějšími tetranukleotidovými motivy repetic jsou AAAT/TTTA, případně AAAC/TTTG, nebo AAAG/TTTC

a i pentanukleotidové repeticity často obsahují čtveřici AAAA/TTTT, ke které je přidána jiná báze. Hexanukleotidové motivy repeticity jsou variabilnější a jsou zde oproti kratším motivům častější báze C a G. Nejvariabilnější motivy repeticity mají členovci (Tóth *et al.*, 2000).

Mikrosatelity lze dělit podle typu opakované sekvence na dokonalé, nedokonalé, přerušené a složené. Dokonalé jsou takové mikrosatelity, které nejsou přerušeny jinou sekvencí (např. ATATATATATATAT). Nedokonalé mikrosatelity jsou přerušeny jednou bází (např. ATATATCATATAT). Přerušené mikrosatelity jsou podobným typem jako nedokonalé, ale přerušeni zde není jednou bází, ale dvěma a více bázemi (např. ATATATCGCTATATAT). A posledním typem jsou složené mikrosatelity, které se skládají ze dvou sousedících motivů (např. ATATATATCACACACA) (Oliveira *et al.*, 2006).

### 3.5.1 Hledání mikrosatelitových lokusů

Mikrosatelitové lokusy jsou relativně oblíbené molekulární markery (Primmer *et al.*, 2005). Jejich rozvoj nastal po rozšíření sekvenačních technik a techniky PCR. Tyto markery je možné hledat třemi způsoby: *de novo*, *in silico* a *cross-species* PCR amplifikací.

Při hledání mikrosatelitů *de novo* jsou lokusy izolovány z genomové knihovny. Genomická DNA je fragmentována pomocí restrikčních enzymů, separována pomocí elektroforézy a poté jsou vybrány malé fragmenty (300–700 bp). Následně jsou tyto fragmenty DNA ligovány do plazmidu. Transformace bakteriálních buněk s ligačním produktem obecně poskytuje tisíce rekombinantních klonů, které mohou být následně testovány na přítomnost mikrosatelitových sekvencí. Tyto klony jsou přeneseny na nylonovou membránu, hybridizovány pomocí sond a následně jsou pro klony, které obsahují repetitivní sekvence, pomocí softwaru, například Primer3 (Rozen *et Skaletsky*, 2000), navrženy primery. Poté se provede PCR amplifikace pro zjištění, zda vykazují izolované mikrosatelity polymorfismus. Pokud jsou tyto lokusy polymorfní, je provedena PCR amplifikace na větším množství nepříbuzných jedinců, aby byly zjištěny populačně genetické charakteristiky a v případě více markerů, jestli je mezi těmito markery genetická vazba nebo jestli jsou vázány na pohlaví (Zane *et al.*, 2002).

Hledání *in silico* probíhá pomocí počítače z cDNA knihovny. Vyhledávání probíhá pomocí nástroje BLAST a je možné přímo nastavit parametry, které má hledaná



sekvence splňovat. Následně jsou pro vyhledané sekvence pomocí softwaru navrženy páry primerů (Dawson *et al.*, 2010; Hoffman *et al.*, 2011). Po navržení primerů a ověření polymorfismu následuje opět testování u většího množství nepříbuzných jedinců, jak je popsáno u metody *de novo*.

Při metodě *cross-species* PCR amplifikace jsou u zkoumaného druhu hledány polymorfni mikrosatelity nalezené u fylogeneticky příbuzného druhu. Pomocí *cross-species* PCR amplifikace jsou testovány páry primerů navržené pro zdrojový druh. Po ověření polymorfismu opět následuje výše popsaný postup. Úspěšnost této metody koreluje s evoluční příbuzností zkoumaného a zdrojového druhu (Primmer *et al.*, 2005).

### 3.6 Mikrosatelity z řádu tučňáci

Řád tučňáci (Sphenisciformes) patří do kladu Aequorlitorornithes (viz obrázek č. 5) a zahrnuje 18 druhů v šesti rodech jedné čeledi tučňákovitých (Spheniscidae) (BirdLife International, 2017). Jsou to nelétaví ptáci zavalitého vzhledu, kteří jsou přizpůsobeni lovu ve vodě. Po pevnině chodí vzpřímeně šoupavým pohybem a ve vodě jim nohy společně s ocasem slouží jako kormidlo. Přední končetiny jsou vyvinuty do tvaru ploutví a nemohou je složit. Na rozdíl od většiny ptáků tučňáci nemají pneumatizované kosti a na povrchu těla mají husté peří (Brooke *et al.*, 1991). Všichni tučňáci žijí na jižní polokouli a s výjimkou tučňáka žlutookého (*Megadyptes antipodes*) a tučňáka novozélandského (*Eudyptes pachyrhynchus*) jsou koloniální (Williams, 1995).

Mikrosatelity z řádu tučňáci (Sphenisciformes) byly popsány v 10 pracích pro 9 druhů a celkem je pro tučňáky nalezeno 113 mikrosatelitů. Kompletní přehled všech těchto lokusů je v kapitole Materiál a metody v tabulce č. 2.

#### Tučňák žlutorohý

Ahmed *et al.* (2009) popsali 25 polymorfních mikrosatelitů pro tučňáka žlutorohého (*Eudyptes chrysolophus*). Vzorky krve byly odebrány od dospělých tučňáků žlutorohých v období hnízdění na lokalitě zvané Macaroni Cwm na Ptačím ostrově v souostroví Jižní Georgie. Genomická DNA byla extrahována pomocí extrakčního roztoku octanu amonného (Nicholls *et al.*, 2000). 288 bakteriálních transformačních kolonií nebylo testováno na přítomnost repetice, ale byly přímo sekvenovány. Celkem 132 jedinečných sekvencí obsahovalo mikrosatelitové motivy. Čtyřicet sekvencí obsahovalo minimálně osm jednotek repetice. Páry primerů byly navrženy pro 32 z těchto sekvencí pomocí softwaru Primer3 (Rozen *et al.*, 2000). Jednotlivé mikrosatelity byly

genotypovány u 7–28 jedinců a bylo u nich nalezeno 4 (Ech003, Ech008, Ech060) až 33 (Ech005) alel.

Všech 25 lokusů bylo testováno pomocí *cross-species* PCR amplifikace i pro další čtyři druhy tučňáků: pro tučňáka kroužkového (*Pygoscelis adeliae*), tučňáka uzdičkového (*Pygoscelis antarctica*), tučňáka oslího (*Pygoscelis papua*) a tučňáka patagonského (*Aptenodytes patagonicus*). Z testovaných 25 mikrosatelitů bylo 8–12 polymorfních v závislosti na druhu. U mikrosatelitů byla kontrolována vazba na pohlaví založená na genotypování jedinců u nichž je známé pohlaví. Jeden lokus (Ech020) vykazoval 9 různých alel, ale byl homozygotní u všech 20 jedinců (13 samic, 4 samci, u 3 jedinců nebylo známé pohlaví), což naznačuje, že je tento lokus vázaný na chromozom Z.

### **Tučňák nejmenší**

Billing *et al.* (2007) charakterizovali u tučňáka nejmenšího (*Eudyptula minor*) osm polymorfních mikrosatelitů. DNA byla izolována z krevních vzorků jedinců z Filipova ostrova a Troubridgeova ostrova u Austrálie. Fragменты genomické DNA byly rozděleny pomocí elektroforézy na agarózovém gelu. Následně byly tyto fragmenty klonovány ve vektoru pGEM (Promega). Po transformaci byly klony testovány PCR s použitím primerů specifických pro pGEM a hybridizovány se sondami (TTTC)<sub>7</sub> nebo G (AG)<sub>13</sub> za účelem detekce mikrosatelitů. Polymorfismus byl posuzován u 21–51 jedinců populace z Filipova ostrova a u 5–15 jedinců z Troubridgeova ostrova. Všechny z osmi mikrosatelitů byly polymorfní minimálně u jedné populace. Počet alel se pohyboval v rozmezí od tří (Emm 4, Emm 6 a Emm 8) do čtrnácti (Emm 2). Lokus Emm 4 byl monomorfní v populaci Filipova ostrova a Emm 8 byl naopak monomorfní v populaci na Troubridgeově ostrově. Do studie byl zahrnut i lokus B3-2 od tučňáka brýlového (Akst *et al.*, 2002), který byl testovaný *cross-species* PCR amplifikací. Lokus B3-2 byl testován pouze u populace Filipova ostrova a u 47 jedinců bylo nalezeno 8 alel.

Další studie zabývající se mikrosatelity u tučňáka nejmenšího probíhala na jedincích z Nového Zélandu, Chathamských ostrovů a Austrálie. Grosser *et Waters*, (2015) našli 20 nových polymorfních mikrosatelitů. Genomická DNA byla extrahována fenol-chloroformovou metodou. Byly hledány mikrosatelitové sekvence s di-, tri- a tetranukleotidem obsahující nejméně 5 opakujících se jednotek. Byly navrženy primery pro 346 sekvencí, ze kterých bylo vybráno 30 lokusů pro PCR amplifikaci. 20 mikrosatelitových markerů poskytlo polymorfní produkt. Počet alel byl v rozmezí od 2 (Em21) do 26 (Em13).

### **Tučňák žlutooký**

Boessenkool *et al.* (2008) izolovali a charakterizovali dvanáct mikrosatelitových lokusů u tučňáka žlutookého (*Megadyptes antipodes*). Genomická DNA byla extrahována, ligována do plazmidů a hybridizována. Fragmenty obsahující mikrosatelity byly izolovány za použití magnetických částic (Roche Applied Science), následně ligovány do plazmidů a transformovány. Jednotlivé klony byly přeneseny na nylonové membrány a následně amplifikovány a sekvenovány. Byly vytvořeny tři genomové knihovny a z nich bylo navrženo 58 párů primerů. Polymorfních lokusů bylo celkem 12 a byly následně genotypovány u 43 jedinců z Campbellova ostrova. Počet alel se pohyboval v rozmezí 2–8 alel na lokus.

### **Tučňák kroužkový**

Roeder *et al.* (2001) našli šest mikrosatelitových lokusů u tučňáka kroužkového (*Pygoscelis adeliae*). Odběr 442 vzorků krve byl proveden od jedinců ze 13 hnízdicích lokalit kolem Antarktidy během australského léta v období 1986–2000. Přibližně 300  $\mu$ l krve bylo odebráno dospělým jedincům z intertarsální nebo jugulární žíly a poté umístěno do heparinu a uchováno v tekutém dusíku. Fragmenty DNA izolované fenol-chloroformovou metodou nebo pomocí kitu Progenome II (Progen Industries) byly ligovány do plazmidu pUC18 a následně transformovány do kompetentních buněk a pěstovány na Luria-Bertani agaru obsahujícím ampilicín. Sekvence obklopující mikrosatelity byly použity pro návrh párů primerů. Celkem bylo izolováno šest polymorfních mikrosatelitů. Počet alel na lokus se pohyboval v rozmezí od čtyř (AM3) do dvaceti (AM13). Celkově bylo identifikováno 69 alel. Jednalo se o vůbec první nalezené mikrosatelity pro zástupce z řádu tučňáci.

### **Tučňák uzdičkový**

Kang *et al.* (2015) izolovali a charakterizovali šestnáct polymorfních mikrosatelitových lokusů pro tučňáka uzdičkového (*Pygoscelis antarctica*). Vzorky krve byly odebrány z křídla od sedmi jedinců z oblasti Narębski Point na Bartonově poloostrově, který se nachází na ostrově krále Jiřího během léta 2009/2010. Z krve byla extrahována genomická DNA. Bylo vybráno 30 mikrosatelitů, jejich variabilita byla testována genotypizací 23 jedinců. Ze 30 navržených párů primerů bylo amplifikováno 29 mikrosatelitových lokusů a z těch bylo 16 mikrosatelitů polymorfních se dvěma až devíti alelami. Tyto mikrosatelity byly testovány u dalších tří druhů tučňáků: u tučňáka kroužkového, u tučňáka oslího a u tučňáka žlutorohého. *Cross-species* PCR amplifikace

byla provedena pro dva jedince každého ze tří druhů. Autoři uvádějí, že PCR amplifikací vznikl produkt, neuvádějí informaci o tom, zda byl polymorfní.

### **Tučňák brýlový**

Labuschagne *et al.* (2013) vyvinuli osm mikrosatelitových markerů pro tučňáka brýlového (*Spheniscus demersus*). Vzorky krve byly odebrány od 25 dospělých jedinců v kolonii nacházející se v provincii KwaZulu-Natal v Jihoafrické republice. Od každého jedince bylo na filtrační papír odebráno 30  $\mu$ l krve. DNA extrakce byla provedena za použití Qiagen DNeasy<sup>®</sup> Blood and Tissue Kit (QIAGEN Inc.). Primery byly navrženy pro 12 lokusů a počet alel na lokus kolísal od dvou (PNN05 a PNN07) do šesti (PNN09 a PNN12).

### **Tučňák Humboldtův**

Pro tučňáka Humboldtova (*Spheniscus humboldti*) bylo celkem popsáno 12 polymorfních mikrosatelitů ve dvou studiích. V první studii Schlosser *et al.* (2003) popsali sedm lokusů a ve druhé studii Schlosser *et al.* (2009) našli pět nových mikrosatelitů.

Schlosser *et al.* (2003) popsali sedm polymorfních mikrosatelitů analyzováním 24 vzorků ze tří chilských a jedné peruánské hnízdní kolonie tučňáka Humboldtova. Z krve byla extrahována DNA a z ní byly dále izolovány fragmenty dlouhé 500–1000 bp, které byly ligovány do plazmidů a pěstovány na agarovém médiu. Plazmidy izolované z pozitivních klonů byly sekvenovány. Pro návrh primerů byl použit software Primer3 (Rozen *et Skaletsky*, 2000). Počet alel byl v rozmezí od pěti (Sh1Ca9) do jedenácti (Sh1Ca12). *Cross-species* PCR amplifikací bylo testováno i osm dalších druhů tučňáků. U 20 jedinců tučňáka magellanského, 20 jedinců t. brýlového, 5 jedinců t. oslího, 5 jedinců t. skalního a 5 jedinců t. nejmenšího vykazovalo polymorfismus všech sedm lokusů. Pět polymorfních lokusů bylo zaznamenáno u 5 jedinců tučňáka žlutorohého a 5 jedinců t. patagonského. A pouze jeden polymorfní mikrosatelit byl u 2 jedinců tučňáka uzdičkového. O počtu alel se však autoři nezmiňují.

V další studii Schlosser *et al.* (2009) našli pro tučňáka Humboldtova pět nových polymorfních mikrosatelitů. Vzorky krve (5 ml) byly odebrány 336 jedincům v období hnízdění v letech 1992–1997 na čtyřech různých lokalitách (Punta San Juan, Cachagua, Algarrobo a Puñihuil). Vzorky byly uchovány v pufru (100  $\mu$ mol/l Trizma, 100 mmol/l EDTA, 2% SDS, pH 8,0). Genomická DNA byla extrahována podle protokolu Sambrook

*et al.* (1989) a následně byly vzorky vyčištěny a vysráženy pomocí octanu sodného (3 mol/l) a 100% ethanolu. U pěti nalezených polymorfních mikrosatelitů byl počet alel na lokus v rozmezí od čtyř (Sh2Ca58) do šestnácti (Sh2Ca40).

### **Tučňák galapážský a tučňák magellanský**

Akst *et al.* (2002) popsali 6 mikrosatelitových lokusů u čtyř druhů tučňáků rodu *Spheniscus*: tučňáka brýlového (*Spheniscus demersus*), t. galapážského (*S. mendiculus*), t. Humboldtova (*S. humboldti*) a t. magellanského (*S. magellanicus*).

Krev byla odebrána 46 jedincům z brachiální žíly nebo žíly na noze a následně uložena v lyžačním pufru. Vzorky byly odebrány na ostrovech Isabela a Fernandina v květnu 1998 a 1999 od tučňáka galapážského a v oblasti Punta Tombo v Argentině v listopadu 1998 od tučňáka magellanského. Vzorky krve dalších dvou druhů tučňáků, které byly použity pro vývoj mikrosatelitů, poskytla Zoologická zahrada Baltimore od tučňáka brýlového a M. Schwartz od tučňáka Humboldtova. DNA byla izolována pomocí soupravy Qiagen DNeasy<sup>®</sup> Blood and Tissue Kit (QIAGEN Inc.) a uchovávána při -20 °C. Jeden z dvojice primerů byl fluorescenčně značen a produkty PCR amplifikace byly sekvenovány na automatizovaném DNA sekvenátoru ABI 377 s interním standardem ROX (Applied Biosystems Inc).

Ze šesti optimalizovaných dinukleotidových mikrosatelitů bylo pět polymorfních minimálně u jednoho ze dvou analyzovaných druhů. Těchto pět lokusů bylo hodnoceno u 46 dospělých jedinců tučňáka galapážského a t. magellanského.

U tučňáka galapážského (*Spheniscus mendiculus*) Akst *et al.* (2002) optimalizovali tři dinukleotidové mikrosatelity. Dva lokusy byly pro tento druh monomorfní a ze tří polymorfních mikrosatelitů jeden vykazoval dvě alely (G3-11) a další dva po třech alelách (G3-6 a H2-6).

Pro tučňáka magellanského (*Spheniscus magellanicus*) Akst *et al.* (2002) našli čtyři polymorfní dinukleotidové mikrosatelity. Počet alel se pohyboval od šesti (H2-6) do devatenácti (G3-6).

### **3.7 Konzervované ptačí mikrosatelity**

Obecně u mikrosatelitů je problém najít univerzální primery, které by fungovaly u většího spektra druhů (Primmer *et al.*, 2005). Specifickou cestou jejich hledání se vydala dr. Deborah Dawson z Sheffieldské univerzity, která se svým týmem publikovala 2 práce. V obou případech vyšla z homologních sekvencí zebřičky pestré (*Taeniopygia*

*guttata*) a kura bankivského (*Gallus gallus*). V první práci popsala mikrosatelity vyskytující se v transkribovaných oblastech genomu, ale protože tyto mikrosatelity nedosahovaly takové variability, použila ve druhé práci celogenomová data.

### **EST mikrosatelity**

Dawson *et al.* (2010) vyvinuli nový přístup k vytváření párů mikrosatelitových primerů, které mohou být využity napříč různými druhy. Tento způsob byl testován u ptáků. Pro identifikaci vysoce konzervativovaných mikrosatelitových lokusů v genomu ptáků, byly srovnány homologní sekvence u dvou geneticky velmi vzdálených druhů: zebřičky pestré (*Taeniopygia guttata*) z řádu pěvců (Passeriformes) a kura bankivského (*Gallus gallus*) z řádu hrabaví (Galliformes).

Pomocí nástrojů NCBI BLAST a WU-BLAST byly porovnány a vyhledány navzájem homologní EST mikrosatelitové sekvence zebřičky pestré a kura bankivského a pro tyto sekvence byly navrženy páry primerů. Většina párů primerů byla 100% identická pro oba druhy. Aby byla možná účinná multiplexní PCR amplifikace, byly sekvence primerů navrženy tak, aby teplota *annealingu* byla co nejbližší 58 °C (54–61 °C) a aby teploty *annealingu* obou primerů každého páru byly ve vzájemném rozmezí 0,5 °C. Jeden z dvojice primerů byl značen fluorescenčním barvivem.

Pojmenování lokusů odkazuje na jejich zdrojové druhy a polohu v genomu. Kód "TG" odpovídá prvním iniciálám latinských názvů *Taeniopygia guttata* a *Gallus gallus*. První dvě číslice v kódu odkazují na chromozom zebřičky pestré, na kterém se lokus nachází a poslední tři číslice se vztahují k pozici na chromozomu (v Mbp).

Bylo vybráno 36 párů primerů pro amplifikaci 35 EST mikrosatelitových lokusů, které vykazovaly vysoký stupeň sekvenční homologie mezi oběma druhy. Počet alel u zebřičky pestré byl v rozmezí 2–6 alel na lokus a u kura bankivského 2–5 alel na lokus.

Navržené páry primerů byly použity ke genotypizaci jedinců 52 druhů ptáků z 15 různých řádů. Mezi testovanými druhy bylo 22 druhů pěvců a 30 druhů z ostatních skupin ptáků. U 33 párů primerů bylo amplifikováno v průměru 100 % lokusů u 17 druhů pěvců a 99 % lokusů u pěti ostatních druhů ptáků. Polymorfních lokusů bylo u pěvců průměrně 48 % (24–76 %) a u ostatních druhů ptáků byl průměr 21 % (18–26 %) (Dawson *et al.*, 2010).

### **Konzervované ptačí mikrosatelity**

Dawson *et al.* (2013) navázali na předešlou práci a našli vysoce konzervované sekvence s vysokým počtem repetit u zebřičky pestré (*Taeniopygia guttata*) a kura

bankivského (*Gallus gallus*), dvou geneticky vzdálených druhů. Pro identifikaci mikrosatelitních sekvencí byl prohledán genom zebřičky a kura. Identifikovány byly sekvence obsahující jakékoliv dinukleotidové repetice, které měly více než deset opakování. Extrahované sekvence zebřičky použité pro hledání pomocí nástroje BLAST byly dlouhé 421–487 bp. Páry primerů byly navrženy pomocí softwaru Primer3 (Rozen *et* Skaletsky, 2000) tak, aby byla teplota *annealingu* v rozmezí 57–63 °C a maximální rozdíl v teplotě *annealingu* obou primerů každého páru byl 1 °C. F primer každého páru primerů byl značen fluorescenčním barvivem. Lokusy byly pojmenovány zkratkou CAM (*Conserved Avian Microsatellite*).

Z homologních sekvencí s alespoň osmi opakujícími se jednotkami u zebřičky pestré i kura bankivského bylo navrženo 24 párů primerů. U 7–12 jedinců zebřičky bylo nalezeno 2–11 alel na lokus a u 2–4 jedinců kura byly nalezeny 2 alely na lokus.

*Cross-species* PCR amplifikací bylo posuzováno všech 24 párů primerů u čtyř jedinců každého z osmi druhů pěvců a čtyř druhů ostatních ptáků. Většina lokusů byla amplifikována u všech 12 zkoumaných druhů (v průměru 94 % u pěvců a 95 % u ostatních druhů). Polymorfismus vykazovalo průměrně 68 % lokusů u testovaných druhů pěvců a 42 % polymorfních mikrosatelitů bylo u ostatních druhů ptáků.

## 4 Materiál a metody

### 4.1 Biologický materiál

Biologický materiál použitý pro praktickou část bakalářské práce pocházel ze Zoologické zahrady Dvůr Králové. Vzorky krve byly odebrány šesti nepříbuzným jedincům pelikána skvrnozobého (*Pelecanus philippensis*) z tarsální žíly pracovníky ZOO. Genomická DNA byla z krve izolována fenol-chloroformovou metodou vedoucím práce. Výsledná koncentrace genomické DNA byla v rozmezí 40,6–132,3 µg/ml. Pro PCR amplifikaci byly vzorky naředěny TE pufrem, aby jejich koncentrace byla mezi 10–50 µg/ml.

### 4.2 PCR amplifikace mikrosatelitů

Genomická DNA šesti nepříbuzných jedinců pelikána skvrnozobého byla amplifikována celkem 173 páry primerů. V každé reakci se nacházel vždy pouze jeden pár primerů, který byl součástí reakčního PCR mixu, jehož složení je uvedeno v tabulce č. 1. Směs byla připravována pro 6 vzorků.

**Tabulka č. 1:** Složení PCR mixu pro 6 vzorků.

Složky PCR mixu	Objem [µl]
Deionizovaná voda	44,4; 45,7*
Reaction Buffer 10x	6,7
Roztok MgCl <sub>2</sub> (25 mmol/l)	4,0; 2,7*
Roztok dNTPs (20 mmol/l)	0,7
Primer F (10 µmol/l)	3,3
Primer R (10 µmol/l)	3,3
<i>aTaq</i> DNA polymeráza (5 U/µl)	1,0

\*Pro lokus CAM05 byla koncentrace roztoku MgCl<sub>2</sub> snížena o 1/3 tak, že byl objem roztoku MgCl<sub>2</sub> snížen o 1/3 a o stejný objem byl zvýšen objem deionizované vody, aby se celkový objem PCR roztoku nezměnil. Koncentrace roztoku MgCl<sub>2</sub> ve finálním PCR mixu potom nebyla 1,8 mmol/l, ale 1,2 mmol/l.

Všechny složky PCR mixu byly uloženy v mrazáku při -20 °C, po rozmrazení byly zvortexovány a zcentrifugovány a pipetovány do 1,5ml mikroskopické pipetky podle tabulky č. 1. Celkový PCR mix byl opět zvortexován a zcentrifugován.



Genomická DNA šesti nepříbuzných jedinců byla napipetována od každého do jedné z šesti 0,2ml PCR mikrozkušavek v objemu 1  $\mu$ l a k ní bylo přidáno po 9  $\mu$ l PCR mixu.

Mikrozkušavky s reakční směsí byly vloženy do termocykleru. Amplifikace probíhala podle následujícího teplotního a časového nastavení:

1. 94 °C .....5 min
  2. 94 °C .....30 s
  - x<sup>Δ</sup> °C .....30 s
  - 72 °C .....30 s
  3. 72 °C .....7 min
- } 35x

x<sup>Δ</sup> Teplota *annealingu* pro jednotlivé PCR reakce byla v rozmezí 44–70 °C.

Podrobně viz kapitola Výsledky.

*Cross-species* PCR amplifikace s DNA šesti nepříbuzných jedinců pelikána skvrnozobého byla postupně provedena celkem se 173 páry primerů, které pocházely od zástupců řádu tučňáci a dále s univerzálními ptačími mikrosatelity. Celkem od 9 druhů tučňáků bylo testováno 113 primerů, jejich podrobný seznam uvádí tabulka č. 2.

**Tabulka č. 2:** Seznam mikrosatelitů pocházejících od druhů řádu tučňáci.

Zdrojový druh	Název lokusu	Literární zdroj
tučňák žlutorohý ( <i>Eudyptes chrysolophus</i> )	Ech003, Ech005, Ech007, Ech008, Ech009, Ech010, Ech011, Ech012, Ech014, Ech020, Ech024, Ech029, Ech030, Ech036, Ech039, Ech050, Ech051, Ech060, Ech063, Ech065, Ech071, Ech081, Ech091, Ech113, Ech130	Ahmed <i>et al.</i> , 2009
tučňák nejmenší ( <i>Eudyptula minor</i> )	Emm 1, Emm 2, Emm 3, Emm 4, Emm 5, Emm 6, Emm 7, Emm 8 Em1, Em2, Em4, Em5, Em6.2, Em8, Em9, Em12.2, Em13, Em14, Em15, Em21, Em22, Em23, Em24, Em26, Em27, Em28, Em29.2, Em30	Billing <i>et al.</i> , 2007 Grosser <i>et Waters</i> , 2015

Zdrojový druh	Název lokusu	Literární zdroj
tučňák žlutooký ( <i>Megadyptes antipodes</i> )	Man03, Man08, Man13, Man21, Man22, Man27, Man39, Man47, Man50, Man51, Man54, Man55	Boessenkool <i>et al.</i> , 2008
tučňák kroužkový ( <i>Pygoscelis adeliae</i> )	AM3, AM12, AM13, TP500, RM3, RM6	Roeder <i>et al.</i> , 2001
tučňák uzdičkový ( <i>Pygoscelis antarctica</i> )	Pygantarc02, Pygantarc03, Pygantarc06, Pygantarc07, Pygantarc11, Pygantarc15, Pygantarc16, Pygantarc18, Pygantarc19, Pygantarc22, Pygantarc24, Pygantarc25, Pygantarc26, Pygantarc27, Pygantarc28, Pygantarc29	Kang <i>et al.</i> , 2015
tučňák brýlový ( <i>Spheniscus demersus</i> )	PNN01, PNN03, PNN05, PNN06, PNN07, PNN08, PNN09, PNN12 B3-2	Labuschagne <i>et al.</i> , 2013 Akst <i>et al.</i> , 2002
tučňák Humboldtův ( <i>Spheniscus humboldti</i> )	Sh1Ca9, Sh1Ca12, Sh1Ca16, Sh1Ca17, Sh2Ca12, Sh2Ca21, Sh2Ca22 Sh2Ca31, Sh2Ca40, Sh2Ca49, Sh2Ca55, Sh2Ca58 H2-6	Schlosser <i>et al.</i> , 2003 Schlosser <i>et al.</i> , 2009 Akst <i>et al.</i> , 2002
tučňák galapážský ( <i>Spheniscus mendiculus</i> )	G2-2, G3-6, G3-11	Akst <i>et al.</i> , 2002
tučňák magellanský ( <i>Spheniscus magellanicus</i> )	M1-11	

Dále bylo použito celkem 60 univerzálních ptačích mikrosatelitů, kde se jedná o 36 párů primerů pro amplifikaci 35 EST mikrosatelitů a 24 párů primerů pro amplifikaci konzervovaných ptačích mikrosatelitů, viz tabulka č. 3.

**Tabulka č. 3:** Seznam EST mikrosatelitů a konzervovaných ptačích mikrosatelitů.

Zdroj	Název lokusu	Literární zdroj
EST mikrosatelity	TG01-000, TG01-040, TG01-077, TG01-086, TG01-092, TG01-114, TG01-124, TG01-147, TG01-148, TG02-078, TG02-088, TG02-120, TG03-002, TG03-031, TG03-034, TG03-035, TG03-098, TG04-004, TG04-012, TG04-012A, TG04-041, TG04-061, TG05-030, TG05-046, TG05-053, TG06-009, TG07-022, TG08-024 (set 1), TG08-024 (set 2), TG09-014, TG11-011, TG12-015, TG13-009, TG13-016, TG13-017, TG22-001	Dawson <i>et al.</i> , 2010
Konzervované ptačí mikrosatelity	CAM-01, CAM-02, CAM-03, CAM-04, CAM-05, CAM-06, CAM-07, CAM-08, CAM-09, CAM-10, CAM-11, CAM-12, CAM-13, CAM-14, CAM-15, CAM-16, CAM-17, CAM-18, CAM-19, CAM-20, CAM-21, CAM-22, CAM-23, CAM-24	Dawson <i>et al.</i> , 2013

### 4.3 Zpracování PCR produktů pomocí elektroforetické separace

Následující postup je optimalizován pro použití vyhřívané sekvenační elektroforetické komůrky S2 Whatman Biometra s rozměry skel 33 x 39 cm a 33 x 42 cm a tloušťkou gelu 0,4 mm. K elektroforetické separaci dochází za denaturujících podmínek.

#### Příprava polyakrylamidového gelu

1. Velké sklo bylo důkladně omyto vodou se saponátem za použití kartáče. Následně bylo opláchnuto deionizovanou vodou, osušeno a dvakrát omyto 96% ethanolem a opět osušeno papírovými utěrkami. Poté byla plocha, která přijde do kontaktu s gelem, ošetřena přípravkem odpuzujícím vodu používaným na skla automobilů (Rain-off – tekuté stěrače). Po zaschnutí přípravku (po 5 minutách) bylo sklo dvakrát omyto deionizovanou vodou a osušeno papírovými utěrkami.

2. Malé sklo bylo také důkladně omyto vodou se saponátem, opláchnuto deionizovanou vodou a 96% ethanolem. Následně byla plocha malého skla, která přijde do kontaktu s gelem, ošetřena 1 ml molekulárního lepidla, které bylo důkladně rozetřeno. Ošetřená plocha se nechala asi 5 minut zaschnout a následně byla čtyřikrát ošetřena 96% ethanolem a osušena papírovými utěrkami.
3. Velké sklo bylo vodorovně položeno na polystyrenovou podložku v digestoři tak, že ošetřená plocha skla směřovala nahoru. Podél delších stran byly na sklo položeny 0,4 mm silné spacers, na které bylo umístěno malé sklo ošetřenou plochou dolů. Umístění spacerů bylo upraveno tak, aby byly těsně podél delších stran skel a jejich gumové části těsně přiléhaly ke kratší straně malého skla. Takto byla skla zpevněna pomocí 4 klips.
4. V kádince byl připraven 6% polyakrylamidový gel, který byl následně pomalu naléván mezi obě skla tak, aby nedošlo ke vzniku bublin v gelu.
5. Po vyplnění prostoru mezi skly gelem, byl v místě nalévání do gelu rovnou stranou vsunut hřebínek asi 5 mm hluboko. Skla byla v místě hřebínku sepnuta čtyřmi klipsami. Polymerizace gelu trvala přibližně 1 hodinu.

#### **Elektroforetická separace, příprava a nanášení vzorků**

1. Po zpolymerizování gelu byly odstraněny všechny klipsy a skla byla důkladně omyta od zbytků polyakrylamidu a osušena papírovou utěrkou. Osušená skla byla vložena do elektroforetické komůrky hřebínkem nahoru a malým sklem směrem dovnitř k hliníkové desce. Skla bylo nutné v elektroforetické komůrce důkladně upevnit pomocí šroubů.
2. Anodový i katodový prostor byl zalit 0,5x TBE pufrem, z prostoru mezi skly byl opatrně vyjmut hřebínek a ze vzniklého prostoru mezi skly byly odstraněny zbytky polyakrylamidu proudem pufru z injekční stříkačky. Po uzavření anodového i katodového prostoru byla elektroforetická komůrka zapojena do zdroje stejnosměrného elektrického proudu. Na něm byla nastavena hodnota výkonu 90 W. Hodnoty napětí a proudu byly ponechány na maximum (3000 V a 150 mA). Za těchto podmínek byl gel nahříván půl hodiny.
3. V průběhu nahřívání gelu byly připraveny vzorky. Do mikrozkušavek s PCR produkty bylo napipetováno po 5  $\mu$ l nanášecího pufru. Několik minut před ukončením nahřívání gelu byly připravené vzorky vloženy do termocyklu, který byl nastaven na 95 °C, 30 s; 55 °C, 30 s; 72 °C, 1 min; 72 °C, 10 min; 4 °C, 1 min.

- po dobu 3 minut byly denaturovány při 94 °C a následně byly ihned vloženy do ledové tříště, aby nedošlo k renaturaci denaturovaných vláken PCR produktů.
4. Během denaturace připravených vzorků bylo ukončeno nahřívání gelu vypnutím zdroje stejnosměrného proudu. Poté byla odpojena katoda a otevřen katodový prostor. Opět byl důkladně vyčištěn prostor mezi skly vzniklý odstraněním hřebínku před nahříváním proudem 0,5x TBE pufru z injekční stříkačky od zbytků polyakrylamidu a rozpuštěné močoviny. Do vyčištěného prostoru byl vsunut hřebínek zoubky do gelu asi 1 mm hluboko.
  5. Pomocí osmikanálové pipety byly 2  $\mu$ l denaturovaných vzorků nanесeny mezi skla do mezer mezi zoubky hřebínku. Katodový prostor byl opět uzavřen a po připojení katody byl zapnut zdroj stejnosměrného elektrického proudu s nastavením hodnoty výkonu 70 W. Hodnoty napětí a proudu byly ponechány na maximum (3000 V a 150 mA). S tímto nastavením probíhala 80–120 minut elektroforetická separace.
  6. V průběhu separace byl přichystán roztok fix/stop, roztok 1% kyseliny dusičné a vývojka, která byla uložena do chladničky.
  7. Po uplynutí doby elektroforetické separace byl zdroj stejnosměrného elektrického proudu vypnut, elektrody byly odpojeny a z katodového prostoru byl vypuštěn pufr povolením šroubu na pravé straně elektroforetické komůrky. Následně byla skla vyjmuta a vodorovně položena na podložku tak, aby malé sklo bylo nahoře. Opatrně byly vytáhnutы spacery a pomocí čepele nože bylo vrchní malé sklo s přilepeným gelem odlepeno od velkého skla a vloženo do fotomisky gelem vzhůru.
  8. Velké sklo, spacery i hřebínek byly důkladně umyty vodou se saponátem a opláchnuty deionizovanou vodou. Takto byly připraveny pro další použití.

### **Vizualizace elektroforetogramu**

1. Malé sklo s přilepeným gelem ve fotomisce bylo položeno na třepačku v digestoři a zalito fix/stop roztokem, který působil 20 minut. Po uplynutí doby působení byl fix/stop roztok slit zpět do baňky a uchován pro pozdější použití. Sklo s gelem ve fotomisce bylo třikrát propláchnuto v deionizované vodě.
2. Fotomiska se sklem byla opět umístěna na třepačku a následovalo promytí v roztoku 1% kyseliny dusičné po dobu 4 minut. Následně byl roztok 1%  $\text{HNO}_3$  vylit a sklo s gelem čtyřikrát propláchnuto v deionizované vodě.

3. Sklo s gelem bylo umístěno na třepačku do jiné fotomisky a zalito 800 ml 0,1% roztoku  $\text{AgNO}_3$ , do kterého bylo před použitím přidáno 1,2 ml formaldehydu. Sklo s gelem bylo v roztoku dusičnanu stříbrného půl hodiny a v jeho průběhu byla do jiné fotomisky připravena deionizovaná voda.
4. Po uplynutí 30 minut byl roztok  $\text{AgNO}_3$  slit zpět do lahve a uložen do lednice pro další použití. Sklo s gelem bylo na několik vteřin ponořeno do připravené deionizované vody. Následně bylo přeneseno na třepačku do příslušné fotomisky a zalito vývojkou. Postupně docházelo k vyvíjení stříbrem obarvených hnědošedých proužků PCR produktů a jakmile byly tyto proužky dostatečně zřetelné, bylo vyvíjení zastaveno nalitím uchovaného fix/stop roztoku.
5. Po 2 minutách působení byla vývojka s fix/stop roztokem vylita. Sklo s gelem bylo na 1 minutu ponořeno do deionizované vody a následně uloženo na 30 minut do sušárny, kde se sušilo při 90 °C.
6. Usušený gel byl přenesen na negatoskop, kde byl vyhodnocen výsledek PCR amplifikace. Poté bylo sklo s gelem naskenováno.
7. Sklo s nepotřebným gelem bylo na několik hodin ponořeno do roztoku hydroxidu sodného o koncentraci 1 mol/l. Působením NaOH se gel odlepil od skla, které bylo následně důkladně umyto vodou se saponátem a opláchnuto deionizovanou vodou. Poté bylo sklo připraveno k dalšímu použití.

#### 4.4 Použité chemikálie

Akrylamid (Sigma)

*aTaq* DNA polymeráza (5 U/ $\mu\text{l}$ ), M1241 (Promega)

Bromfenolová modř (Serva)

dNTPs (100 mmol/l, 400  $\mu\text{l}$  každého), U1240 (Promega)

Deionizovaná voda

Dusičnan stříbrný (Sigma)

Ethanol 96% roztok (Lihovar Vrbátky)

Ethylendiaminotetraoctan sodný –  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  (Lachner)

Formaldehyd (Lachema)

Formamid (Lachema)

Hydroxid sodný (Lachner)

Chlorid sodný (Lachema)

Kyselina boritá (Lachner)

Kyselina dusičná 65% roztok (Lachner)  
Kyselina octová (Lachner)  
3-methakryloxypropyltrimethoxysilan (Serva)  
Močovina (Lachner)  
N, N'-methylenbisakrylamid (Serva)  
N, N, N', N'-tetramethylethyldiamin – TEMED (Serva)  
Peroxodisíran amonný (Serva)  
Rain-off – tekuté stěrače (Sheran)  
Thiosíran sodný (Lachema)  
Trishydroxymethylaminomethan – Tris (AppliChem)  
Uhličitan sodný (Lachner)  
Xylenová modř – Xylencyanol FF (AppliChem)

#### **4.5 Použité roztoky**

Akrylamid, 6% zásobní roztok:

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

Dusičnan stříbrný, 0,1% roztok:

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

Fix/stop roztok:

800 ml deionizované vody  
88 ml ledové kyseliny octové

Hydroxid sodný, 1 mol/l roztok:

40 g hydroxidu sodného  
doplnit deionizovanou vodou na 1 l

Kyselina dusičná, 1% roztok:

12 ml 65% kyseliny dusičné  
800 ml deionizované vody

Molekulární lepidlo:

- 1 ml 0,5% kyseliny octové v 96% ethanolu
- 3  $\mu$ l 3-methakryloxypropyltrimethoxysilanu

Nanášecí pufr:

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

Peroxodisíran amonný, 10% roztok:

- 1 g peroxodisíranu amonného
- rozpustit v 10 ml deionizované vody
- připravený roztok uchovávat v chladničce

Polyakrylamidový gel, 6% roztok:

- 60 ml 6% zásobního roztoku akrylamidu
- 400  $\mu$ l 10% roztoku peroxodisíranu amonného
- 40  $\mu$ l N, N, N', N' - tetramethylethyldiaminu

TBE pufr, 10x zásobní roztok:

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

Vývojka:

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

#### **4.6 Použité laboratorní přístroje**

- Elektroforetický zdroj EV232 (Consort)
- Hybridizační pec HB-2D (Techne)
- Chladnička kombinovaná (Whirlpool)
- Laboratorní váhy Mark S622 (BEL Engineering)
- Magnetická míchačka MR Hei-Combi (Heidolph)



Mikropipety Finnpiquette 0,5–10  $\mu$ l (osmikanálová) a 0,3  $\mu$ l–1 ml (Thermo Labsystems)

Mikropipety Nichipet EX 0,5  $\mu$ l–1 ml (Nichiryo)

Minicentrifuga CLE CSQSP (Clever Scientific)

Minicentrifuga Prism mini (Labnet International)

NanoDrop ND-1000 (Thermo Scientific)

Negatoskop NEGA1 (Maneko)

Sekvenační elektroforetická komůrka S2 (Whatman Biometra)

Sušárna CAT 8050 (Contherm)

Termocykler GenePro (BIOER Technology)

Termocykler XP cyclor (BIOER Technology)

Termocykler PTC 100-96 VHB (MJ Research)

Třepačka Orbit 1 900 (Labnet International)

Vortex mixer (Labnet International)

Vortex MS2 (Ika)

Výrobník deionizované a ultračisté vody typ 02 (AquaOsmotic)

Výrobník ledu Icematic F100 Compact (Castel Mac)

## 5 Výsledky

V rámci své bakalářské práce jsem na šesti nepříbuzných jedincích pelikána skvrnozobého (*Pelecanus philippensis*) pomocí *cross-species* PCR amplifikace testovala 173 mikrosatelitů. První skupina mikrosatelitů byla polymorfní u zástupců řádu tučňáci (Sphenisciformes). Jednalo se o všechny existující mikrosatelitové lokusy (113) od druhů tohoto řádu. Ve druhé části se jednalo o univerzální ptačí mikrosatelity, konkrétně o mikrosatelity, které byly nalezeny ve dvou na sebe navazujících pracích, vycházejících z porovnání genomu zebřičky pestré (*Taeniopygia guttata*) a kura bankivského (*Gallus gallus*) a těch bylo 60.

Se všemi mikrosatelity jsem provedla PCR amplifikaci, která probíhala při 50 °C a produkty byly separovány v polyakrylamidovém gelu 90 minut. Některé mikrosatelity za těchto podmínek produkt neposkytovaly, v tom případě jsem snižovala teplotu *annealingu*, kterou jsem ve dvou případech snížila až na 44 °C. V případě, že mikrosatelit na 50 °C poskytl produkt, většinou byl tento produkt velmi intenzivní a bylo potřeba naopak teplotu zvyšovat, aby bylo možné vyhodnotit charakteristiky mikrosatelitu. Ve dvou případech jsem použila dokonce teplotu 70 °C. Z hlediska vzájemné pozice alel a jejich rozlišitelnosti bylo potřeba též v některých případech upravovat dobu elektroforetické separace, která byla u několika mikrosatelitů protažena až na 120 minut. Výjimečně i při vysoké teplotě nebyl produkt hodnotitelný a bylo potřeba snížit koncentraci hořčičkových iontů o 1/3. Bylo to provedeno tak, že namísto objemu roztoku MgCl<sub>2</sub> 4 μl bylo pipetováno pouze 2,7 μl a o stejný objem byl zvýšen objem deionizované vody tak, aby výsledná koncentrace roztoku MgCl<sub>2</sub> byla 1,2 mmol/l oproti původní koncentraci 1,8 mmol/l.

PCR amplifikace s každým párem primerů poskytla produkt. Zjistila jsem, že ze 173 mikrosatelitů je 159 monomorfních, s těmi jsem už dál nepracovala a 14 lokusů bylo polymorfních. Z vyhodnocených polymorfních mikrosatelitů bylo 8 lokusů navržených pro řád tučňáci a 6 univerzálních ptačích mikrosatelitů. V rámci univerzálních byl pouze jeden z EST mikrosatelitů (TG) a 5 z konzervovaných ptačích mikrosatelitů (CAM). U 6 nepříbuzných jedinců pelikána skvrnozobého jsem zjistila od 2 do 5 alel. Charakteristiky jednotlivých mikrosatelitů s uvedením teploty *annealingu*, doby separace a genotypu 6 nepříbuzných jedinců jsou uvedeny v tabulce č. 4 (mikrosatelity z řádu tučňáci) a v tabulce č. 5 (univerzální ptačí mikrosatelity).

**Tabulka č. 4:** Charakteristika 8 polymorfních mikrosatelitů z řádu tučňáci testovaných na 6 nepříbuzných jedincích pelikána skvrnozobého.

Název lokusu (GenBank Acc. no.)	Sekvence primerů (5' → 3')	Jednotka repetice	Zdrojový druh	T <sub>a</sub> [°C]	t <sub>s</sub> [min]	Počet alel	Genotypy
Ech008 FM878339	F: TGGGAAAGCGTAACGGCCTAA R: TCAGTCACTCTCCCATTTGTAGGG	CA	tučňák žlutorohý ( <i>Eudyptes chrysolophus</i> )	56	150	3	$2/3$ $2/3$ $2/3$ $2/2$ $2/2$ $1/2$
Emm 5 DQ83772933	F: ATTAACTTGGCCCTTGGGTTTC R: TTTATGCTCCCTCATTTCCAC	CTTT		50	90	2	$2/2$ $2/2$ $2/2$ $2/2$ $1/2$ $2/2$
Emm 6 DQ83772934	F: TTGTTGGTCTGTATCACAAAGG R: CAGGGAACGTGTCAGTAAATGG	CT	tučňák nejmenší ( <i>Eudyptula minor</i> )	65	120	2	$1/2$ $1/1$ $1/2$ $1/2$ $1/2$ $1/2$
Emm 8 DQ852599	F: TGCACACTAGCAGATACGG R: GACAAAATTGTGCTTGTCCAGC	CA/CT		65	120	2	$1/1$ $1/1$ $1/1$ $1/1$ $1/2$ $1/2$
Em 8 KM272226	F: GGTGCTGGGAGATGGCTTC R: ACGAAAATGGTTTGGCTGGTG	AGAT		68	120	3	$2/2$ $2/2$ $1/2$ $2/2$ $1/1$ $2/3$
Man13 EU267111	F: AACACATTTGACAGCCTG R: GTTATTCCAACACCAAGC	GT	tučňák žlutooký	62	120	4	$1/2$ $1/2$ $3/4$ $2/4$ $1/1$ $1/3$
Man21 EU267112	F: TACTGGTAGCATGGGGTG R: CACTGAAAGATGACAAACGG	G/GT	( <i>Megadyptes antiipodes</i> )	52	90	2	$2/2$ $2/2$ $1/2$ $2/2$ $1/1$ $2/2$
AM13 AF131243	F: TTTTCCCATCTCTCCTG R: CAGTTTTCAACAATCCTTCC	A/GT/GC	tučňák kroužkový ( <i>Pygoscelis adeliae</i> )	61	120	2	$2/2$ $2/2$ $2/2$ $2/2$ $1/2$ $2/2$

Ve sloupcích tabulky je uveden název lokusu včetně kódu v databázi GenBank (*Accession number* - Acc. no.), sekvence primerů, jednotka repetice, zdrojový druh, optimální teplota *annealingu* (T<sub>a</sub>), doba elektroforetické separace (t<sub>s</sub>), počet alel a genotypy 6 nepříbuzných jedinců pelikána skvrnozobého.

**Tabulka č. 5:** Charakteristika 6 polymorfních univerzálních ptačích mikrosatelitů testovaných na 6 nepříbuzných jedincích pelikána skvrnozobého.

Název lokusu (GenBank Acc. no.)	Sekvence primerů (5' → 3')	Jednotka repetice	Zdroj	T <sub>a</sub> [°C]	t <sub>s</sub> [min]	Počet alel	Genotypy
TG11-011 CK308096	F: ACAAACTAAGTACATCTATATCTGAAG R: TAAATACAGGCAACATTGG	AT	EST mikrosatelity	61	120	3	1 <sup>1</sup> / <sub>1</sub> 1 <sup>1</sup> / <sub>2</sub> 2 <sup>1</sup> / <sub>2</sub> 1 <sup>1</sup> / <sub>3</sub> 1 <sup>1</sup> / <sub>2</sub>
CAM-05* neuvedeno	F: TTACACAGACTGCAAAACCCG R: CTGTTKCTCTAGTAATGAGATCCTG	CA		52	150	5	2 <sup>2</sup> / <sub>5</sub> 2 <sup>2</sup> / <sub>5</sub> 2 <sup>2</sup> / <sub>4</sub> 3 <sup>1</sup> / <sub>3</sub> 1 <sup>1</sup> / <sub>5</sub> 2 <sup>1</sup> / <sub>4</sub>
CAM-11 neuvedeno	F: TGGTACAGGGACAGCAAACC R: AGATGCTGRGAGCGGATG	GT		64	120	2	2 <sup>2</sup> / <sub>2</sub> 2 <sup>1</sup> / <sub>2</sub> 1 <sup>1</sup> / <sub>2</sub> 1 <sup>1</sup> / <sub>1</sub> 1 <sup>1</sup> / <sub>2</sub> 1 <sup>1</sup> / <sub>1</sub>
CAM-17 neuvedeno	F: CGGGTTGTAATCAAGAAGATGC R: CTGCCGAGCAATTAACGC	TG	Konzervované ptačí mikrosatelity	66	150	3	2 <sup>2</sup> / <sub>2</sub> 1 <sup>1</sup> / <sub>2</sub> 2 <sup>2</sup> / <sub>2</sub> 2 <sup>2</sup> / <sub>2</sub> 2 <sup>1</sup> / <sub>3</sub> 1 <sup>1</sup> / <sub>2</sub>
CAM-23 neuvedeno	F: CTCCACTTAGCTTGTAATGCAC R: CCAAGRAGTCCCCTAGATGTC	TG		66	120	2	1 <sup>1</sup> / <sub>2</sub> 1 <sup>1</sup> / <sub>2</sub> 2 <sup>1</sup> / <sub>2</sub> 2 <sup>2</sup> / <sub>2</sub> 1 <sup>1</sup> / <sub>2</sub>
CAM-24 neuvedeno	F: CCCACTTCAGTCTTCAGAGC R: TGGAGTATTTGGGATTGGAG	CA		62	90	2	2 <sup>2</sup> / <sub>2</sub> 1 <sup>1</sup> / <sub>2</sub> 2 <sup>1</sup> / <sub>2</sub> 1 <sup>1</sup> / <sub>2</sub> 1 <sup>1</sup> / <sub>1</sub> 2 <sup>1</sup> / <sub>2</sub>

Ve sloupcích tabulky je uveden název lokusu včetně kódu v databázi GenBank (*Accession number* - Acc. no.), sekvence primerů, jednotka repetice, zdroj, optimální teplota *annealingu* (T<sub>a</sub>), doba elektroforetické separace (t<sub>s</sub>), počet alel a genotypy 6 nepříbuzných jedinců pelikána skvrnozobého.

\*snížená koncentrace MgCl<sub>2</sub> v PCR mixu o 1/3, tedy 1,2 mmol/l (oproti standardním 1,8 mmol/l)

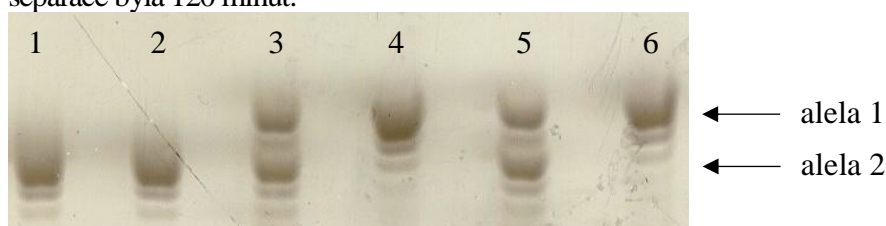
Celkem jsem pomocí *cross-species* PCR amplifikace na šesti nepříbuzných jedincích pelikána skvrnozobého testovala 173 párů primerů pro amplifikaci mikrosatelitů a 14 z nich amplifikovalo polymorfni produkt. Úspěšnost získání polymorfni mikrosatelitů je tedy 8,09 %. Tyto mikrosatelity je možné rozdělit na základě jejich původu

Mikrosatelitů z řádu tučňáci jsem testovala celkem 113 a polymorfni bylo 8 lokusů, což znamená, že zde byla úspěšnost amplifikace polymorfniho produktu 7,08 %. Ze 60 testovaných univerzálních ptačích mikrosatelitů bylo polymorfni 6 lokusů, úspěšnost amplifikace polymorfniho produktu tedy byla 10 %. Od 9 druhů tučňáků pocházely mikrosatelity, ale polymorfni lokusy jsem získala jen od 4 druhů s tím, že od tučňáka žlutorohého a tučňáka kroužkového to bylo po jednom mikrosatelitu, od tučňáka žlutookého jsem získala dva polymorfni mikrosatelity a největší úspěšnost jsem zaznamenala u lokusů nalezených u tučňáka nejmenšího, kde byly celkem 4 mikrosatelity polymorfni.

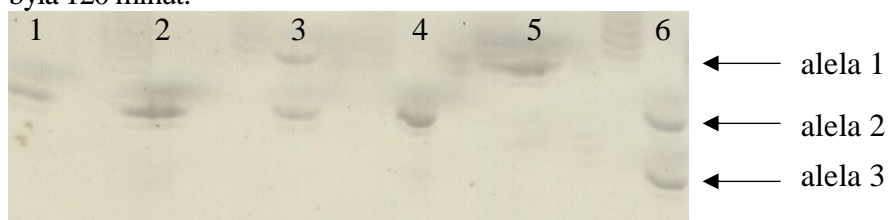
Ze 36 testovaných párů primerů pro amplifikaci 35 EST mikrosatelitů byl pouze 1 polymorfni, úspěšnost získání polymorfniho produktu je tedy 2,78 %. Konzervovaných ptačích mikrosatelitů jsem analyzovala celkem 24 a 5 z nich bylo polymorfni, takže zde byla 20,83% úspěšnost amplifikace.

Dalším kritériem, podle kterého je možno tyto mikrosatelity rozdělit je hledisko počtu alel, které byly získány amplifikací u šesti nepříbuzných jedinců pelikána skvrnozobého. Nejvíce mikrosatelitů je dvoualelových (viz obrázek č. 8), celkem 8, méně je tříalelových (obrázek č. 9), ty jsou 4 a čtyřalelový (obrázek č. 10) a pětialelový mikrosatelit je pouze jeden.

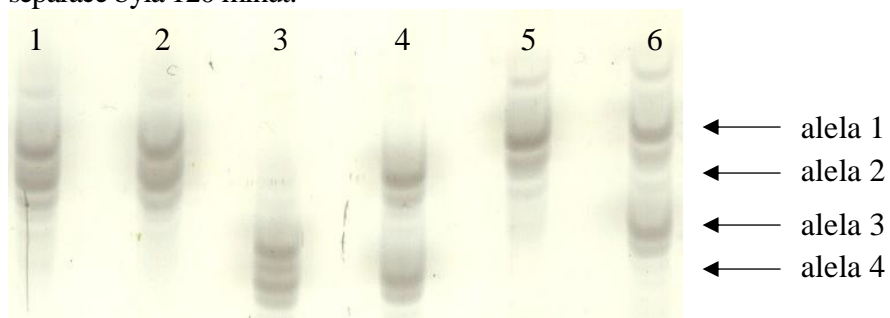
**Obrázek č. 8:** Elektroforetogram produktů amplifikace mikrosatelitu CAM-11. U šesti jedinců pelikána skvrnozobého byly při teplotě *annealingu* 64 °C nalezeny 2 alely, doba elektroforetické separace byla 120 minut.



**Obrázek č. 9:** Elektroforetogram produktů amplifikace mikrosatelitu Em8. U šesti jedinců pelikána skvmozobého byly při teplotě *annealingu* 68 °C nalezeny 3 alely, doba elektroforetické separace byla 120 minut.



**Obrázek č. 10:** Elektroforetogram produktů amplifikace mikrosatelitu Man13. U šesti jedinců pelikána skvmozobého byly při teplotě *annealingu* 62 °C nalezeny 4 alely, doba elektroforetické separace byla 120 minut.



## 6 Diskuse

V rámci praktické části mé bakalářské práce jsem se zabývala hledáním polymorfních mikrosatelitů u pelikána skvrnozobého (*Pelecanus philippensis*). Z krve 6 nepříbuzných jedinců tohoto druhu byla izolována genomická DNA, na níž jsem pomocí *cross-species* PCR amplifikace testovala celkem 173 mikrosatelitových lokusů. Celkem vykazovalo polymorfismus 14 mikrosatelitů, z nichž 8 pocházelo z řádu tučňáci, jeden z EST mikrosatelitů a 5 z konzervovaných ptačích mikrosatelitů.

113 párů primerů bylo navržených pro řád tučňáci (jedná se o dosud všechny nalezené mikrosatelity z tohoto řádu), konkrétně pro tučňáka žlutorohého (*Eudyptes chrysolophus*), tučňáka nejmenšího (*Eudyptula minor*), tučňáka žlutookého (*Megadyptes antipodes*), tučňáka kroužkového (*Pygocelis adeliae*), tučňáka uzdičkového (*Pygocelis antarctica*), tučňáka brýlového (*Spheniscus demersus*), tučňáka Humboldtova (*S. humboldti*), tučňáka galapážského (*S. mendiculus*) a tučňáka magellanského (*S. magellanicus*).

Testováním 25 mikrosatelitů od **tučňáka žlutorohého** jsem jako polymorfni určila Ech008. Ahmed *et al.* (2009) otestováním 28 jedinců při teplotě *annealingu* 60 °C našli 4 alely. Já jsem otestováním šesti nepříbuzných jedinců pelikána skvrnozobého při 56 °C našla 3 alely.

Od **tučňáka nejmenšího** jsem testovala celkem 28 mikrosatelitů, z nichž byly polymorfni Emm 5, Emm 6, Emm 8 a Em8.

Billing *et al.* (2007) testovali při teplotě *annealingu* 58 °C pro lokus Emm 5 14 jedinců tučňáka nejmenšího z populace na Troubridgeově ostrově a našli 3 alely a 28 jedinců z populace na Filipově ostrově a našli 11 alel. Já jsem testovala 6 pelikánů při 50 °C a našla jsem 2 alely. Pro lokus Emm 6 Billing *et al.* (2007) testovali při 56 °C 15 jedinců z populace na Troubridgeově ostrově a našli 8 alel a 21 jedinců z populace na Filipově ostrově a našli 3 alely. Já jsem testováním 6 pelikánů při 65 °C a našla 2 alely. Pro lokus Emm 8 Billing *et al.* (2007) testovali při 56 °C 5 jedinců z populace na Troubridgeově ostrově a našli 4 alely a 26 jedinců z populace na Filipově ostrově a našli 3 alely. Já jsem testovala 6 pelikánů při 65 °C a našla jsem 2 alely.

Grosser *et Waters* (2015) testovali lokus Em8 při teplotě *annealingu* 60 °C a našli 10 alel. Já jsem testovala 6 pelikánů při 68 °C a našla jsem 3 alely.

Ze 12 mikrosatelitových lokusů, které jsem testovala od **tučňáka žlutookého**, vykazovaly polymorfismus lokusy Man13 a Man21. Bossenkool *et al.* (2008) testovali

pro lokus Man13 43 jedinců při teplotě *annealingu* 48 °C a našli 3 alely. Já jsem testovala 6 pelikánů při 62 °C a našla jsem 4 alely. Pro lokus Man21 Bossenkool *et al.* (2008) testovali 43 jedinců při teplotě *annealingu* 50 °C a našli 3 alely. Já jsem testovala 6 pelikánů při 52 °C a našla jsem 2 alely.

Testováním 6 mikrosatelitů od **tučňáka kroužkového** jsem jako polymorfni určila lokus AM13. Roeder *et al.* (2001) testovali 417 jedinců při teplotě *annealingu* 50 °C a našli 20 alel. Já jsem testovala 6 pelikánů při 61 °C a našla jsem 2 alely.

Žádný polymorfni produkt jsem nenašla testováním 16 mikrosatelitů od tučňáka uzdičkového, 9 mikrosatelitů od tučňáka brýlového, 13 lokusů od tučňáka Humboldtova, 3 lokusů od tučňáka galapážského a 1 mikrosatelitu od tučňáka magellanského.

Testovala jsem celkem 60 párů primerů pro amplifikaci univerzálních ptačích mikrosatelitů, z nichž bylo 36 párů primerů pro EST mikrosatelity a 24 párů primerů pro konzervované ptačí mikrosatelity.

Při testování 36 párů primerů pro amplifikaci **EST mikrosatelitů** jsem našla pro pelikána jeden polymorfni lokus, TG11-011. Dawson *et al.* (2010) testovali 4 jedince zebřičky pestré při teplotě *annealingu* 52 °C a našli 2 alely. Tento mikrosatelit testovali pomocí *cross-species* PCR amplifikace u dalších druhů ptáků, jak je znázorněno v tabulce č. 6. Já jsem testovala 6 pelikánů při 61 °C a našla jsem 3 alely.

**Konzervovaných ptačích mikrosatelitů** jsem testovala celkem 24 a z tohoto počtu jsem jako polymorfni vyhodnotila 5 lokusů: CAM-05, CAM-11, CAM-17, CAM-23 a CAM-24. Dawson *et al.* (2013) testovali při teplotě *annealingu* 56 °C pro lokus CAM-05 7 jedinců zebřičky pestré a našli 6 alel a 4 jedince kura bankivského a našli 2 alely. Já jsem testovala 6 pelikánů za snížené koncentrace MgCl<sub>2</sub> (1,2 mmol/l) při 52 °C a našla jsem 5 alel. Pro lokus CAM-11 autoři testovali při teplotě *annealingu* 56 °C 12 jedinců zebřičky pestré a našli 6 alel a 4 jedince kura bankivského, kde byl lokus monomorfni. Já jsem testovala 6 pelikánů při 64 °C a našla jsem 2 alely. Pro lokus CAM-17 Dawson *et al.* (2013) testovali při teplotě *annealingu* 56 °C 12 jedinců zebřičky pestré a našli 6 alel a 3 jedince kura bankivského a našli 2 alely. Já jsem testovala 6 pelikánů při 66 °C a našla jsem 3 alely. Pro lokus CAM-23 autoři testovali při teplotě *annealingu* 56 °C 12 jedinců zebřičky pestré a našli 5 alel a 4 jedince kura bankivského, kde byl lokus monomorfni. Já jsem testovala 6 pelikánů při 66 °C a našla jsem 2 alely. Pro lokus CAM-24 Dawson *et al.* (2013) testovali při teplotě *annealingu* 56 °C 12 jedinců zebřičky pestré



a našli 6 alel a 4 jedince kura bankivského, kde byl lokus monomorfní. Já jsem testovala 6 pelikánů při 62 °C a našla jsem 2 alely.

**Tabulka č. 6:** Počet alel vybraných mikrosatelitových lokusů u jednotlivých testovaných druhů ptáků.

<b>Druhy</b>	<b>TG11-011</b>	<b>CAM-05</b>	<b>CAM-11</b>	<b>CAM-17</b>	<b>CAM-23</b>	<b>CAM-24</b>
pelikán skvrnozobý	3 (6)	5 (6)	2 (6)	3 (6)	2 (6)	2 (6)
zebrička pestrá	2 (4)	6 (7)	6 (12)	6 (12)	5 (12)	6 (12)
kur bankivský	M (4)	2 (4)	M (4)	2 (3)	M (4)	M (4)
amada Gouldové	2 (4)	NT	NT	NT	NT	NT
linduška kanárská	M (4)	3 (4)	3 (4)	2 (4)	4 (4)	M (4)
vrabec domácí	2 (4)	7 (10)	4 (11)	3 (12)	4 (12)	M (12)
zvonek zelený	17 (15)	NT	NT	NT	NT	NT
křivka obecná	16 (15)	NT	NT	NT	NT	NT
pěnkava obecná	7 (20)	3 (4)	2 (3)	3 (3)	3 (3)	M (4)
hýl obecný	7 (17)	3 (4)	3 (4)	M (3)	M (4)	M (4)
vlaštovka australská	3 (4)	NT	NT	NT	NT	NT
sýkora modřinka	2 (4)	NT	NT	NT	NT	NT
sýkora koňadra	M (4)	4 (4)	M (4)	2 (4)	3 (4)	M (4)
rákosník velký	2 (4)	NT	NT	NT	NT	NT
sýkořice vínopsá	3 (4)	NT	NT	NT	NT	NT
kos černý	4 (4)	4 (4)	M (4)	2 (2)	M (4)	M (4)
timálievec pruhokřídlý	2 (4)	NT	NT	NT	NT	NT
straka americká	M (4)	NT	NT	NT	NT	NT
popeláč šedý	2 (4)	NT	NT	NT	NT	NT
kulík mořský	M (4)	NT	NT	NT	NT	NT
kolibřík rezavolesklý	M (4)	NT	NT	NT	NT	NT
sova pálená	M (4)	4 (4)	2 (3)	M (2)	M (3)	M (4)
agapornis různohnědý	2 (4)	NT	NT	NT	NT	NT
pokřovník zelený	NT	NA	3 (4)	2 (4)	2 (4)	2 (4)
buřňáček dlouhokřídlý	NT	2 (6)	3 (6)	4 (6)	M (6)	6 (6)
mandelík hajní	NT	M (4)	2 (4)	2 (4)	M (4)	4 (4)

Ve sloupcích tabulky je uveden testovaný druh a názvy jednotlivých mikrosatelitových lokusů, počet testovaných jedinců je uveden v závorce, M – monomorfní lokus, P – polymorfní lokus, NT – netestováno, NA – neamplifikovalo se, pelikán skvrnozobý (tato práce), ostatní druhy pro TG11-011 (Dawson *et al.*, 2010) a pro CAM mikrosatelity (Dawson *et al.*, 2013)

Tyto mikrosatelitové lokusy (od tučňáků a univerzální ptačí mikrosatelity) už byly testovány v rámci Laboratoře populační genetiky Katedry buněčné biologie a genetiky

PřF UPOL. U pelikána skvrnozobého jsem testováním 113 párů prumerů navržených pro druhu z řádu tučňáci vyhodnotila 8 polymorfních mikrosatelitů.

U potápky roháče získala Filipová (2016) testováním 113 párů prumerů od tučňáků 6 polymorfních mikrosatelitových lokusů, z nichž jeden jsem také označila u pelikána skvrnozobého jako polymorfní (Tabulka č. 7).

Pechová (2014) testovala pouze 77 párů prumerů (netestovala lokusy Em od tučňáka nejmenšího a Pygantarc od tučňáka uzdičkového) u nesyta indomalajského 10 polymorfních mikrosatelitů. Jeden z nich jsem u pelikána skvrnozobého vyhodnotila také jako polymorfní. Polymorfní mikrosatelity získané u pelikána skvrnozobého, potápky roháče a nesyta indomalajského včetně počtu alel jsou uvedeny v tabulce č. 7.

**Tabulka č. 7:** Počet alel vybraných mikrosatelitových lokusů u jednotlivých testovaných druhů ptáků v rámci Laboratoře populační genetiky Katedry buněčné biologie a genetiky PřF UPOL.

Název lokusu	Zdroj	Počet alel u pelikána skvrnozobého (6 jedinců)	Počet alel u potápky roháče (6 jedinců)	Počet alel u nesyta indomalajského (6 jedinců)
Ech008	tučňák žlutorohý	3	M	M
Emm 5		2	2	M
Emm 6	tučňák nejmenší	2	M	M
Emm 8		2	M	M
Em8		3	M	NT
Man13	tučňák žlutooký	4	M	2
Man21		2	M	M
AM13	tučňák kroužkový	2	M	M
TG11-011	EST mikrosatelity	3	2	M
CAM-05		5	M	M
CAM-11	Konzervované ptačí mikrosatelity	2	5	5
CAM-17		3	2	M
CAM-23		2	6	M
CAM-24		2	4	M

Ve sloupcích tabulky je uveden název lokusu, zdroj a počet alel u jednotlivých testovaných druhů ptáků: pelikána skvrnozobého (tato práce), potápky roháče (Filipová, 2016) a nesyta indomalajského (Pechová, 2014), M – monomorfní lokus, NT – netestováno

Testováním 36 párů primerů EST mikrosatelitů a 24 párů primerů konzervovaných ptačích mikrosatelitů u pelikána skvrnozobého jsem získala 6 polymorfních mikrosatelitových lokusů.

Filipová (2016) získala u potápky roháče 13 polymorfních lokusů, z nichž 5 bylo polymorfních i u pelikána skvrnozobého.

U nesyta indomalajského vyhodnotila Pechová (2014) 4 mikrosatelitové lokusy jako polymorfní, z nichž jeden mikrosatelit (CAM-11) vykazoval polymorfismus u pelikána skvrnozobého i u potápky roháče. Viz tabulka č. 7.

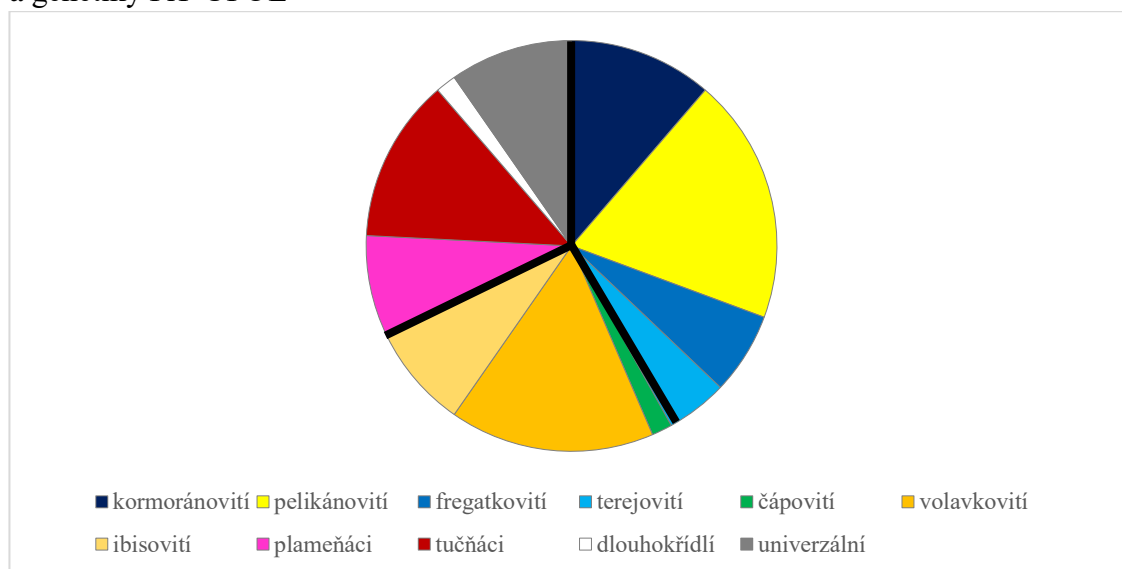
Pro pelikána skvrnozobého bylo v rámci Laboratoře populační genetiky Katedry buněčné biologie a genetiky PřF UPOL celkem již testováno 569 párů primerů pro *cross-species* PCR amplifikaci mikrosatelitových lokusů. 397 párů primerů testovaly ve svých diplomové práci Mikulová (2010) a Bartoňková (2013). Tyto páry primerů byly navrženy pro zástupce čeledi veslonozí (153 lokusů), brodiví (169 lokusů), plameňáci (47 lokusů), dlouhokřídli (2 lokusy), tučňáci (1 lokus), vrubozobí (13 lokusů), potáplice (7 lokusů), potápky (7 lokusů) a sudokopytníci (1 lokus).

Já jsem v rámci své bakalářské práce testovala celkem 173 párů primerů navržených pro zástupce řádu tučňáci (113 lokusů) a univerzálních ptačích mikrosatelitů (60 párů primerů pro amplifikaci 59 lokusů). Ze zmíněných 113 mikrosatelitů od tučňáků byl jeden (AM13) už dříve testován a poskytl polymorfní produkt (Mikulová, 2010; Bartoňková, 2013). Já jsem tento lokus také znovu testovala a ověřila jeho polymorfismus.

Zmíněných 397 párů primerů amplifikovalo u pelikána skvrnozobého celkem 49 polymorfních mikrosatelitů (Mikulová, 2010; Bartoňková, 2013). Z čeledi kormoránovití pochází 7 polymorfních mikrosatelitů, od zástupců čeledi pelikánovití je 12 polymorfních lokusů, od fregatkovitých jsou 4 polymorfní mikrosatelity, 3 polymorfní lokusy jsou z čeledi terejovití, jeden mikrosatelit je od čápovitých, z čeledi volavkovití je 10 polymorfních mikrosatelitů, od ibisovitých je 5 lokusů, 5 mikrosatelitů je od plameňáků, jeden od dlouhokřídlych a jeden od tučňáků.

Já jsem našla u pelikána skvrnozobého celkem 8 polymorfních mikrosatelitů z řádu tučňáci (z nichž jeden – AM13 – byl už dříve testován, jak je zmíněno výše) a 6 polymorfních univerzálních ptačích mikrosatelitů. Celkem tedy bylo nalezeno pro pelikána skvrnozobého 62 polymorfních mikrosatelitů (Graf č. 1).

**Graf č. 1:** Polymorfní mikrosatelitové lokusy u pelikána skvrnozobého získané *cross-species* PCR amplifikací v Laboratoři populační genetiky Katedry buněčné biologie a genetiky PřF UPOL



Graf znázorňuje počty polymorfních mikrosatelitů vztažené k čeledím (skupinám), od kterých pocházejí. Ve směru hodinových ručiček (od nejvyššího bodu grafu) jsou silnými čarami oddělení veslonozí v tradičním pojetí a brodiví v tradičním pojetí. Z hlediska nového systému v molekulárním pojetí jsou čeledi řádu Pelecaniformes vyvedeny v odstínech žluté, čeledi řádu Suliformes jsou vyvedeny v odstínech modré a Ciconiiformes v dnešním pojetí jsou znázorněni zeleně.

Tato práce poskytla informace o tom, které mikrosatelity pocházející od tučňáků a které univerzální ptačí mikrosatelity jsou polymorfní u pelikána skvrnozobého. Bylo by ale třeba provést genotypizaci těchto mikrosatelitů na větším počtu jedinců pelikána skvrnozobého, aby mohly být zjištěny populačně genetické charakteristiky těchto lokusů (heterozygotnost, vypovídací hodnota, frekvence nulových alel) a případná vazba mezi těmito lokusy, aby následně mohly být případně využity pro populační studie.

V rámci celkového testování 569 u pelikána skvrnozobého bylo nalezeno 62 polymorfních mikrosatelitů, což odpovídá úspěšnosti 10,9 %. Vzhledem k tomu, že až na univerzální ptačí mikrosatelity se vesměs jedná o mikrosatelity pocházející od zástupců kladu Aequirornithes, navrhuji dále otestovat existující mikrosatelity od zástupců řádu trubkonosí (Procellariiformes) a dále od zástupců řádu dlouhokřídli (Charadriiformes), slunatce nádherného (*Eurypyga helias*) a kagu chocholátého (*Rhynchetos jubatus*), kteří byli podle nejnovějšího systému také zařazeni do kladu Aequirornithes (Prum *et al.*, 2015).

## 7 Závěr

V této bakalářské práci jsem se věnovala hledání polymorfních mikrosatelitových lokusů u pelikána skvrnozobého (*Pelecanus philippensis*). Testování probíhalo pomocí *cross-species* PCR amplifikace všech dosud známých mikrosatelitových lokusů z řádu tučňáci (Sphenisciformes), EST mikrosatelitů a konzervovaných ptačích mikrosatelitů u šesti nepříbuzných jedinců pelikána skvrnozobého.

Celkem jsem testovala 173 lokusů, 113 z nich pocházelo od osmi druhů řádu tučňáci (tučňáka žltorohého, *Eudyptes chrysolophus*; t. nejmenšího, *Eudyptula minor*; t. žlutookého, *Megadyptes antipodes*; t. kroužkového, *Pygocelis adeliae*; t. uzdičkového, *Pygocelis antarctica*; t. brýlového, *Spheniscus demersus*; t. Humboldtova, *S. humboldti*; t. galapážského, *S. mendiculus* a t. magellanského, *S. magellanicus*), 36 párů primerů bylo navržených pro amplifikaci 35 EST mikrosatelitů a 24 bylo konzervovaných ptačích mikrosatelitů.

*Cross-species* PCR amplifikace poskytla hodnotitelný produkt u všech mikrosatelitů, Monomorfních bylo 159 lokusů a 14 párů primerů (8,1 %) poskytlo polymorfní produkt. Z řádu tučňáci bylo polymorfních lokusů 8 ze 113 (7,1 %). Ze 36 párů primerů pro EST mikrosatelity amplifikoval polymorfní produkt pouze jeden a ze 24 konzervovaných ptačích mikrosatelitů vykazovalo polymorfismus 5 lokusů (20,8 %). U polymorfních mikrosatelitových lokusů jsem určila počet alel (2–5) a optimalizovala podmínky PCR amplifikace (teplotu *annealingu*  $T_a$  50–68 °C) a dobu elektroforetické separace (90–150 minut).

## 8 Seznam použitých zkratek

A	adenin
C	cytozin
DNA	deoxyribonukleová kyselina
dNTPs	deoxyribonukleosid trifosfáty
EST	<i>Expressed Sequence Tag</i>
G	guanin
IUCN	Mezinárodní svaz ochrany přírody
LINEs	dlouhé rozptýlené jaderné repetice
mRNA	mediátorová ribonukleová kyselina
PCR	polymerázová řetězová reakce
SINEs	krátké rozptýlené jaderné repetice
SSRs	opakování jednoduchých sekvencí
T	thymin
T <sub>a</sub>	teplota <i>annealingu</i>
t <sub>s</sub>	doba elektroforetické separace produktů PCR amplifikace v 6% polyakrylamidovém gelu
VNTRs	variabilní počet tandemových repetit

## 9 Literatura

- Ahmed, S., Hart, T., Dawson, D.A., Horsburgh, G.J., Trathan, P.N. *et* Rogers, A.D. (2009): Isolation and characterization of macaroni penguin (*Eudyptes chrysolophus*) microsatellite loci and their utility in other penguin species (Spheniscidae, AVES). *Molecular Ecology Resources*, 9, 1530–1535.
- Akst, E., Boersma, P. *et* Fleischer, R. (2002): A comparison of genetic diversity between the Galápagos Penguin and the Magellanic Penguin. *Conservation Genetics*, 3, 375–383.
- Bartoňková, I. (2013): Analýza a charakteristika polymorfních *cross-species* mikrosatelitů u pelikána bílého (*Pelecanus onocrotalus*) a pelikána skvrnozobého (*Pelecanus philippensis*). Diplomová práce. Depon in: Knihovna biologických oborů PřF UPOL Olomouc.
- Bennett, P. (2000): Demystified ...: Microsatellites. *Molecular Pathology*, 53, 177–183.
- Billing, T.M., Guay, P.J., Peucker, A.J. *et* Mulder, R.A. (2007): Isolation and characterization of polymorphic microsatellite loci for the study of paternity and population structure in the little penguin *Eudyptula minor*. *Molecular Ecology Notes*, 7, 425–427.
- BirdLife International (2016): *Pelecanus philippensis*. The IUCN Red List of Threatened Species 2016. Navštíveno na: <http://www.iucnredlist.org>, 27. 6. 2017.
- BirdLife International (2017): Species factsheet: *Pelecanus philippensis*. Navštíveno na <http://www.birdlife.org>, 27. 6. 2017.
- Biscotti, M.A., Olmo, E. *et* Heslop-Harrison, J.S. (2015): Repetitive DNA in eukaryotic genomes. *Chromosome Research*, 23, 415–420.
- Boessenkool, S., King, T.M., Seddon, P.J. *et* Waters, J.M. (2008): Isolation and characterization of microsatellite loci from the yellow-eyed penguin (*Megadyptes antipodes*). *Molecular Ecology Resources*, 8, 1043–1045.
- Brooke, M., *et* Birkhead, T.R. (1991). Cambridge encyclopedia of ornithology. Cambridge University Press.

- Campbell, N.A. *et* Reece, J.B. (2006): Biologie. Computer Press, Brno.
- Conservation leadership programme (2003): Conservation of spot billed pelican (*Pelecanus philipensis*) in north central and central provinces of Sri Lanka. Navštíveno na <http://www.conservationleadershipprogramme.org>, 27. 7. 2017.
- Dawson, D.A., Ball, A.D., Spurgin, L.G., Martín-Gálvez, D., Stewart, I.R., Horsburgh, G.J., Potter, J., Molina-Morales, M., Bicknell, A.W.J., Preston, S.A.J., Ekblom, R., Slate, J. *et* Burke, T. (2013): High-utility conserved avian microsatellite markers enable parentage and population studies across a wide range of species. *BMC Genomics*, 14, 176.
- Dawson, D.A., Horsburgh, G.J., Küpper, C., Stewart, I.R.K., Ball, A.D., Durrant, K.L., Hansson, B., Bacon, I., Bird, S., Klein, Á., Krupa, A.P., Lee, J.W., Martín-Gálvez, D., Simeoni, M., Smith, G., Spurgin, L.G. *et* Burke, T. (2010): New methods to identify conserved microsatellite loci and develop primer sets of high cross-species utility - as demonstrated for birds. *Molecular Ecology Resources*, 10, 475–494.
- del Hoyo, J., Elliott, A. *et* Sargatal, J. (Eds.) (1992): Handbook of the birds of the world. Vol. 1, Ostrich tu ducks. Lynx Edicions, Barcelona.
- Filipová, K. (2016): *Cross-species* amplifikace mikrosatelitů z řádu tučňáci a konzervovaných ptačích mikrosatelitů u potápky roháče (*Podiceps cristatus*). Bakalářská práce. Depon in: Knihovna biologických oborů PřF UPOL Olomouc.
- Gokula, V. (2011): Breeding biology of the Spot-billed Pelican (*Pelecanus philippensis*) in Karaivetti Bird Sanctuary, Tamil Nadu, India. *Chinese Birds*, 2, 101–108.
- Gosler, A. (1994): Atlas ptáků světa, České vydání 1. Příroda, Bratislava
- Grosser, S. *et* Waters, J.M. (2015): Development and characterisation of 20 novel microsatellite markers for the little blue penguin (*Eudyptula minor*) using next-generation sequencing. *Conservation Genetics Resources*, 7, 143–145.
- Hackett, S.J., Kimball, R.T., Reddy, S., Bowie, R.C., Braun, E.L., Braun, M.J., Chojnowski, J.L., Cox, W.A., Han, K.L., Harshman, J., Huddleston, C.J., Marks, B.D., Miglia, K.J., Moore, W.S., Sheldon, F.H., Steadman, D.W., Witt, C.C.



- et* Yuri, T. (2008): A phylogenomic study of birds reveals their evolutionary history. *Science*, 320, 1763-1767.
- Howard, R. *et* Moore, A. (1991): A complete checklist of the birds of the world. No. Ed. 2. Academic Press Ltd., London
- Jarvis, E.D., Mirarab, S., Aberer, A.J., Li, B., Houde, P., Li, C., Ho, S.Y.W., Faircloth, B.C., Nabholz, B., Howard, J.T., Suh, A., Weber, C.C., da Fonseca, R.R., Li, J., Zhang, F., Li, H., Zhou, L., Narula, N., Liu, L., Ganapathy, G., Boussau, B., Bayzid, S., Zavidovych, V., Subramanian, S., Gabaldón, T., Capella-Gutiérrez, S., Huerta-Cepas, J., Rekepalli, B., Munch, K., Schierup, M., Lindow, B., Warren, W.C., Ray, D., Green, R.E., Bruford, M.W., Zhan, X., Dixon, A., Li, S., Li, N., Huang, Y., Derryberry, E.P., Bertelsen, M.F., Sheldon, F.H., Brumfield, R.T., Mello, C.V., Lovell, P.V., Wirthlin, M., Schneider, M.P.C., Prosdocimi, F., Samaniego, J.A., Velazquez, A.M.V., Alfaro-Núñez, A., Campos, P.F., Petersen, B., Sicheritz-Ponten, T., Pas, A., Bailey, T., Scofield, P., Bunce, M., Lambert, D.M., Zhou, Q., Perelman, P., Driskell, A.C., Shapiro, B., Xiong, Z., Zeng, Y., Liu, S., Li, Z., Liu, B., Wu, K., Xiao, J., Yinqi, X., Zheng, Q., Zhang, Y., Yang, H., Wang, J., Smeds, L., Rheindt, F.E., Braun, M., Fjeldsa, J., Orlando, L., Barker, F.K., Jønsson, K.A., Johnson, W., Koepfli, K.P., O'Brien, S., Haussler, D., Ryder, O.A., Rahbek, C., Willerslev, E., Graves, G.R., Glenn, T.C., McCormack, J., Burt, D., Ellegren, H., Alström, P., Edwards, S.V., Stamatakis, A., Mindell, D.P., Cracraft, J., Braun, E.L., Warnow, T., Jun, W., Gilbert, M.T.P. *et* Zhang, G. (2014): Whole-genome analyses resolve early branches in the tree of life of modern birds. *Science*, 346, 1320–1331.
- Jingtao, S., Xianming, Y. *et* Cheng, G. (2012): The application of microsatellite markers in insect molecular ecology. *Journal of Nanjing Agricultural University*, 35, 103–112.
- Kang, S., Jung, J.W., Ahn, D.H., Lee, J.E., Kim, J.H. *et* Park, H. (2015): Isolation and characterization of polymorphic microsatellite loci from the chinstrap penguin, *Pygoscelis antarctica*. *Conservation Genetics Resources*, 7, 561–563.
- Kannan, V. *et* Manakadan, R. (2005): The status and distribution of Spot-billed Pelican *Pelecanus philippensis* in southern India. *Forktail*, 21, 9–14.

- Kennedy, M., Taylor, S.A., Nádvorník, P. *et* Spencer, H.G. (2013): The phylogenetic relationships of the extant pelicans inferred from DNA sequence data. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 66, 215–222.
- Labuschagne, C., Kotzé, A., Grobler, P., Dalton, D.L. *et* van Wyk, A.M. (2013): Isolation and characterization of species-specific microsatellite loci in African penguin (*Spheniscus demersus*). *Conservation Genetics Resources*, 5, 169–171.
- Mikulová, V. (2010): Mikrosatelitové lokusy pro determinaci paternity u vybraných druhů pelikánů (*Pelecanus* spp.). Diplomová práce. Depon in: Knihovna biologických oborů PřF UPOL Olomouc.
- Nicholls, J.A., Double, M.C., Rowell, D.M. *et* Magrath, R.D. (2000): The evolution of cooperative and pair breeding in thornbills *Acanthiza* (Pardalotidae). *Journal of Avian Biology*, 31, 165–176.
- Oliveira, E., Pádua, J.G., Zucchi, M.I., Vencovsky, R. *et* Vieira, M.L.C. (2006): Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. *Genetics and Molecular Biology*, 29, 294–307.
- Parker, P.G., Snow, A.A., Schug, M.D., Booton, G.C. *et* Fuerst, P.A. (1998): What Molecules Can Tell Us about Populations: Choosing and Using a Molecular Marker. *Ecology*, 79, 361–382.
- Pechová, A. (2014): *Cross-species* amplifikace mikrosatelitů z řádu tučňáci a konzervovaných ptačích mikrosatelitů u nesyta indomalajského (*Mycteria leucocephala*). Bakalářská práce. Depon in: Knihovna biologických oborů PřF UPOL Olomouc.
- Primmer, C.R., Painter, J.N., Koskinen, M.T., Palo, J.U. *et* Merilä, J. (2005): Factors affecting avian cross-species microsatellite amplification. *Journal of Avian Biology*, 36, 348–360.
- Prum, R.O., Berv, J.S., Dornburg, A., Field, D.J., Townsend, J.P., Lemmon, E.M. *et* Lemmon, A.R. (2015): A comprehensive phylogeny of birds (Aves) using targeted nextgeneration DNA sequencing. *Nature*, 526, 569–573.
- Roeder, A.D., Marshall, R.K., Mitchelson, A.J., Visagathilagar, T., Ritchie, P.A., Love, D.R., Pakai, T.J., McPartlan, H.C., Murray, N.D., Robinson, N.A., Kerry,

- K.R. *et* Lambert, D.M. (2001): Gene flow on the ice: genetic differentiation among Adélie penguin colonies around Antarctica. *Molecular Ecology*, 10, 1645–1656.
- Rozen, S. *et* Skaletsky, H. (1999): Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: Misener S., Krawetz S.A. (Eds.) *Bioinformatics Methods and Protocols. Methods in Molecular Biology*, Humana Press, Totowa, NJ, 132, 365-386.
- Sibley, C.G., Ahlquist, J.E. *et* Monroe, B.L. (1988): A Classification of the Living Birds of the World Based on DNA-DNA Hybridization Studies. *The Auk*, 105, 409–423.
- Schlosser, J.A., Dubach, J.M., Garner, T.W.J., Araya, B., Bernal, M., Simeone, A., Smith, K.A. *et* Wallace, R.S. (2009): Evidence for gene flow differs from observed dispersal patterns in the Humboldt penguin, *Spheniscus humboldti*. *Conservation Genetics*, 10, 839–849.
- Schlosser, J.A., Dubach, J.M., Garner, T.W.J. *et* McElligott, A.G. (2003): Characterization of microsatellite loci in Humboldt penguin (*Spheniscus humboldti*) and cross-amplification in other penguin species. *Molecular Ecology Notes*, 3, 62–64.
- Snustad, D.P., Simmons, M.J. (2009): *Genetika*. Vydavatelství MU, Brno.
- The IUCN Red List of Threatened Species (2017): Navštíveno na [www.iucnredlist.org](http://www.iucnredlist.org), 13. 7. 2017.
- Thomas, G.H. (2015): An avian explosion. *Nature*, 526, 516–517.
- Tóth, G., Gáspári, Z. *et* Jurka, J. (2000): Microsatellites in Different Eukaryotic Genomes: Survey and Analysis. *Genome Research*, 10, 967–981.
- Weising, K., Nybom, H., Wolff, K.K. *et* Kahl, G. (2005): *DNA Fingerprinting in Plants: Principles, Methods, and Applications*, Second Edition. CRC Press, Boca Raton.
- Williams, T.D. (1995): *The penguins: Spheniscidae (Vol. 2)*. Oxford University Press, USA.

- Winkler, D.W., Billerman, S.M. *et* Lovette, I.J. (2015): Bird families of the world. Lynx Edicions, Barcelona.
- Yuri, T., Kimball, R.T., Harshman, J., Bowie, R.C.K., Braun, M.J., Chojnowski, J.L., Han, K.-L., Hackett, S.J., Huddleston, C.J., Moore, W.S., Reddy, S., Sheldon, F.H., Steadman, D.W., Witt, C.C. *et* Braun, E.L. 2013: Parsimony and Model-Based Analyses of Indels in Avian Nuclear Genes Reveal Congruent and Incongruent Phylogenetic Signals. *Biology*, 2, 419–444.
- Zane, L., Bargelloni, L. *et* Patarnello, T. (2002): Strategies for microsatellite isolation. *Molecular Ecology*, 11, 1–16.