

Univerzita Palackého v Olomouci

Bakalářská práce

Olomouc 2019

Hana Kremlová

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



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

Hana Kremlová

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2019

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

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

V Olomouci dne

Souhrn

V této bakalářské práci jsem pomocí metody *cross-species* PCR amplifikace hledala polymorfni mikrosatelitní lokusy vyskytující se u pelikána bílého (*Pelecanus onocrotalus*). Amplifikované mikrosatelitní lokusy pocházely od ptáků z řádu tučňáci a univerzálních ptačích mikrosatelitů (EST ptačích mikrosatelitů a konzervovaných ptačích mikrosatelitů).

V teoretické části jsem se zabývala taxonomickým zařazením pelikána bílého a jeho charakteristikou. Popsala jsem řád pelikáni, čeleď pelikánovití a také biologii pelikána bílého. Dále jsem se zabývala obecnou charakteristikou mikrosatelitů a popsala jsem mikrosatelity z řádu tučňáci a univerzální ptačí mikrosatelity.

V praktické části jsem provedla *cross-species* PCR amplifikaci celkem se 173 páry primerů na genomické DNA šesti nepříbuzných jedinců pelikána bílého. Z nich bylo 113 párů primerů navržených pro amplifikaci mikrosatelitů 9 druhů tučňáků, 36 párů primerů pro amplifikaci EST ptačích mikrosatelitů a 24 párů primerů pro amplifikaci konzervovaných ptačích mikrosatelitů. Prostřednictvím 34 párů primerů jsem u 6 nepříbuzných jedinců pelikána bílého našla celkem 35 polymorfni mikrosatelitních lokusů, protože jeden pár primerů (TG13-016) poskytl dva polymorfni produkty. 18 párů primerů poskytujících polymorfni produkt bylo navrženo pro mikrosatelity 7 druhů tučňáků, 9 párů primerů poskytujících 10 polymorfni produktů bylo navrženo pro EST ptačí mikrosatelity a 7 párů primerů poskytujících polymorfni produkt bylo navrženo pro konzervované ptačí mikrosatelity.

Summary

In this bachelor thesis I used the method of cross-species PCR amplification to search for polymorphic microsatellite loci occurring in Great White Pelican (*Pelecanus onocrotalus*). Amplified microsatellite loci came from Sphenisciformes and universal avian microsatellites (EST avian microsatellites and conserved avian microsatellites).

The theoretical part looked into taxonomic classification of Great White Pelican and its characteristic. I described the order of the pelicans, the family of the pelican and the biology of the Great White Pelican. Then I looked into general characteristics of microsatellites and I described microsatellites of the Sphenisciformes and universal avian microsatellites.

In the experimental part I did cross-species PCR amplification of a total of 173 pairs of primers on genomic DNA of six unrelated individuals of Great White Pelican. Of these, 113 pairs of primers were designed to amplify microsatellites in 9 species of penguins, 36 pairs of primers were designed to amplify EST avian microsatellites and 24 pairs of primers were designed to amplify conserved avian microsatellites. I found 34 pairs of primers that amplify 35 polymorphic microsatellite loci in Great White Pelican because one pair of primer (TG13-016) provided two polymorphic products. 18 pairs of primers providing a polymorphic product were designed for the microsatellites of 7 species of penguins, 9 pairs of primers providing 10 polymorphic products were designed for EST avian microsatellites and 7 pairs of primers providing 7 polymorphic products were designed for conserved avian microsatellites.

Ráda bych poděkovala RNDr. Petru Nádvorníkovi, Ph.D. nejen za jeho ochotu a odborný dohled, ale také za poskytnutí užitečných rad a materiálů, které jsem použila při zpracování teoretické i praktické části mé bakalářské práce.

Obsah

1	Úvod.....	1
2	Cíle práce	2
3	Literární přehled.....	3
3.1	Taxonomické zařazení pelikána bílého do systému ptáků	3
3.2	Řád pelikáni	6
3.2.1	Čeleď pelikánovití.....	7
3.2.2	Pelikán bílý	8
3.3	Mikrosatelity	9
3.3.1	Mikrosatelity u ptáků z řádu tučňáci	10
3.3.1.1	Rod <i>Eudytes</i>	11
3.3.1.2	Rod <i>Eudiptula</i>	12
3.3.1.3	Rod <i>Megadyptes</i>	13
3.3.1.4	Rod <i>Pygoscelis</i>	13
3.3.1.5	Rod <i>Spheniscus</i>	16
3.3.2	Univerzální ptačí mikrosatelity	18
3.3.2.1	EST ptačí mikrosatelity.....	18
3.3.2.2	Konzervované ptačí mikrosatelity.....	19
4	Materiály a metody	20
4.1	Biologický materiál.....	20
4.2	Chemikálie	20
4.3	Roztoky	21
4.4	Laboratorní přístroje.....	22
4.5	PCR amplifikace mikrosatelitů	23
4.6	Elektroforetická separace	26
5	Výsledky.....	29
6	Diskuse	38
7	Závěr	45
8	Použitá literatura	46

Seznam symbolů a zkratek

A	adenin
bp	pár bází
C	cytozin
CAM	konzervovaný ptačí mikrosatelit (Conserved Avian Microsatellite)
cDNA	komplementární deoxyribonukleová kyselina
DNA	deoxyribonukleová kyselina
EST	exprimované sekvenční úseky (Expressed Sequence Tag)
G	guanin
N	počet alel
dNTPs	deoxyribonukleosidtrifosfáty
PCR	polymerázová řetězová reakce (Polymerase Chain Reaction)
mRNA	mediátorová ribonukleová kyselina
SSRs	jednoduché opakující se sekvence (Simple Sequence Repeats)
STRs	krátké opakující se repetice (Short Tandem Repeats)
T	tymin
T _a	teplota <i>annealingu</i>
t _s	délka elektroforetické separace

Seznam obrázků

Obrázek č. 1: Zařazení řádu Pelecaniformes do skupiny vodních ptáků (<i>Aequornithes</i>) (Gaisler <i>et Zima</i> , 20018, podle Hackett <i>et al.</i> , 2008).....	3
Obrázek č. 2: Zařazení rodu <i>Pelecanus</i> do kladu <i>Aequorlitorornithes</i> (Prum <i>et al.</i> , 2015).....	4
Obrázek č. 3: Fylogenetické vztahy pěti čeledí řádu Pelecaniformes (Gaisler <i>et Zima</i> , 2018, podle Hackett <i>et al.</i> , 2008).....	5
Obrázek č. 4: Zařazení pelikána hnědého (<i>Pelecanus occidentalis</i>) do systému ptáků (Huang <i>et al.</i> , 2018).	6
Obrázek č. 5: Elektroforetogram polymorfního mikrosatelitního lokusu Ech039..	36
Obrázek č. 6: Elektroforetogram polymorfního mikrosatelitního lokusu Sh2Ca49..	36
Obrázek č. 7: Elektroforetogram polymorfního mikrosatelitního lokusu TG01-148.	37
Obrázek č. 8: Elektroforetogram polymorfního mikrosatelitního lokusu TG03-098..	37

Seznam tabulek

Tabulka č. 1: Rozdělení řádu tučňáci do jednotlivých rodů a druhů (Bradford, 2014) s počtem popsanych mikrosatelitů a literárním zdrojem.	10
Tabulka č. 2: Seznam testovaných mikrosatelitních lokusů pocházejících z řádu tučňáci.	23
Tabulka č. 3: Seznam testovaných EST ptačích mikrosatelitů a konzervovaných ptačích mikrosatelitů.....	24
Tabulka č. 4: Složení PCR mixu pro 6 vzorků.	25
Tabulka č. 5: Základní teplotní a časový rozpis PCR reakce.	25
Tabulka č. 6: Charakteristika 34 párů primerů a jimi amplifikovaných 35 polymorfních mikrosatelitních lokusů na 6 nepříbuzných jedincích pelikána bílého.....	30
Tabulka č. 7: Genotypy 35 polymorfních mikrosatelitů amplifikovaných 34 páry primerů u 6 nepříbuzných jedinců pelikána bílého.....	35
Tabulka č. 8: Srovnání polymorfních mikrosatelitních lokusů pocházejících z řádu tučňáků a univerzálních ptačích mikrosatelitů, které byly testovány pomocí <i>cross-species</i> PCR amplifikace u pelikána bílého, s výsledky z 6 prací zabývajících se taktéž hledáním polymorfních lokusů pomocí výše zmíněných mikrosatelitů..	43

1 Úvod

Mikrosatelity neboli krátké tandemové repetice, jsou 1–6 párů bazí dlouhé úseky DNA, které se mnohokrát opakují bezprostředně za sebou. Některé z nich jsou polymorfní, a to znamená, že na jednom lokusu se v rámci populace vyskytují varianty, které mají různý počet jednotek opakování (resp. různou délku) a tyto varianty se nazývají alely. Na autozomech (somatických chromozomech) každého jedince se nacházejí 2 kopie mikrosatelitu, jedna je zděděná po otci, druhá po matce.

Mikrosatelity se vyskytují v celém genomu, a to v jeho kódujících i nekódujících oblastech, jsou vysoce variabilní a mohou sloužit jako genetické markery. Toho je využíváno při identifikaci příbuzných jedinců, při sledování populačních vztahů nebo v taxonomii.

V rámci své bakalářské práce se budu věnovat testování mikrosatelitů u šesti nepříbuzných jedinců pelikána bílého (*Pelecanus onocrotalus*). Pomocí metody *cross-species* PCR amplifikace otestuji 113 párů primerů navržených pro amplifikace mikrosatelitů z řádu tučňáci (Sphenisciformes), 36 párů primerů navržených pro amplifikaci EST ptačích mikrosatelitů a 24 párů primerů navržených pro amplifikaci konzervovaných ptačích mikrosatelitů.

2 Cíle práce

1. Vypracování rešerše na téma bakalářské práce.
2. Shromáždění dostupných literárních zdrojů.
3. PCR amplifikace DNA pelikána bílého s využitím *cross-species* primerů pro ptáky z řádu tučňáci a konzervované ptačí mikrosatelity.

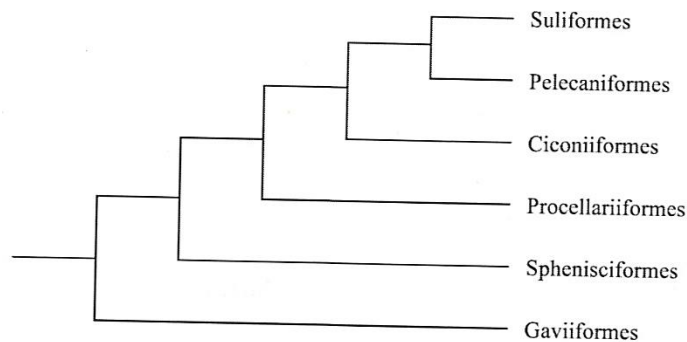
3 Literární přehled

3.1 Taxonomické zařazení pelikána bílého do systému ptáků

Dle Sibley *et al.* (1988) je čeleď pelikánovití (Pelecanidae) řazena do nadčeledi Pelecanoidea a společně s čeleděmi volavkovití (Ardeidae), kladivoušoví (Scopidae), plameňákovití (Phoenicopteridae), ibisovití (Threskiornithidae) a čápoovití (Ciconiidae) spadají do řádu Ciconiiformes (brodiví). Čeleď pelikánovití zahrnuje podčeledi Balaenicipitinae a Pelecaninae.

Gosler (1994) do řádu Pelecaniformes (dříve veslonozí, nyní pelikáni) zařadil čeleď pelikánovití (Pelecanidae) a připojil k ní dalších 5 čeledí: faetonovití (Phaethontidae), terejovití (Sulidae), kormoránovití (Phalacrocoracidae), anhingovití (Anhingidae) a fregatkovití (Fregatidae).

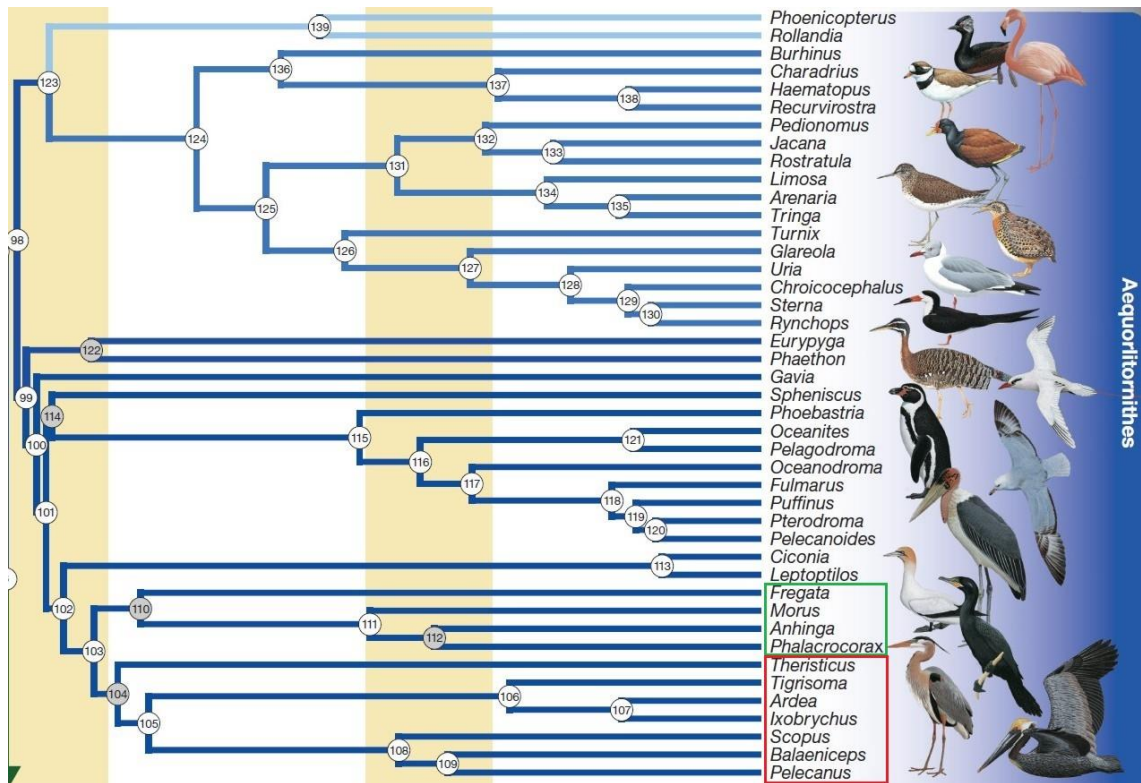
Následně došlo k vyčlenění čeledi faetonovití (Phaethontidae), jelikož je jejich fylogenetická pozice velmi vzdálená a podobnost s ostatními čeleděmi je pouze morfologická. Řády Pelecaniformes a Ciconiiformes byly seskupeny a následně přerozděleny. Řád Pelecaniformes zahrnoval anhingy, kormorány, tereje, fregatky a pelikány. Do řádu Ciconiiformes (brodiví) se pak řadili volavky, volavčík, ibisi, člunozobec (*Balaeniceps*), kladivouš (*Scopus*) a čápi (Hackett *et al.*, 2008) (obrázek č. 1).



Obrázek č. 1: Zařazení řádu Pelecaniformes do skupiny vodních ptáků (Aequornithes) (Gaisler *et Zima*, 2018, podle Hackett *et al.*, 2008).

Na základě molekulárních dat (Jarvis *et al.*, 2014) došlo v rámci kladu Aequornithes, k dalšímu přeřazení mezi třemi nadřády (Pelecanimorphae, Procellariimorphae a Gaviimorphae). Do prvního nadřádu Pelecanimorphae spadá řád Pelecaniformes (dříve veslonozí, nyní pelikáni) zahrnující čtyři rody: pelikán, volavka, ibis a kormorán. Do druhého nadřádu Procellariimorphae spadá řád trubkonosí (Procellariiformes) zahrnující buňáky a řád tučňáci (Sphenisciformes). Třetí nadřád Gaviimorphae zahrnuje jediný řád potáplice (Gaviiformes) (Jarvis *et al.*, 2014).

Prum *et al.* (2015) provedli fylogenetickou analýzu více než 390 000 bazí sekvenačních dat, která byla získána ze 198 druhů ptáků. Zjistili, že rod pelikán (*Pelecanus*) je nejpodobnější s rodem člunozobec (*Balaeniceps*) a rodem kladivouš (*Scopus*) (Prum *et al.*, 2015) (obrázek č. 2).

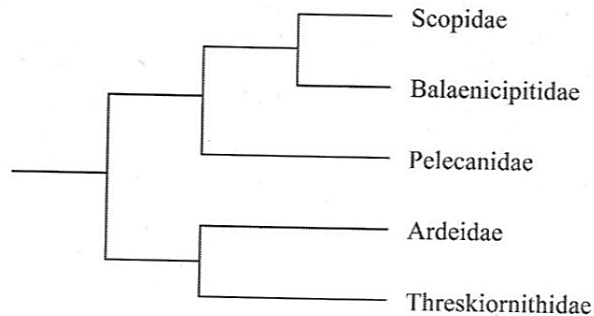


Obrázek č. 2: Zařazení rodu *Pelecanus* do kladu Aequorlornithes (Prum *et al.*, 2015), zelený obdélník označuje dřívější zástupce řádu Pelecaniformes, dnes tvoří řád Suliformes, červený obdélník označuje rody spadající do současného řádu pelikáni (Pelecaniformes) (podle Gaisler *et Zima*, 2018).

K čeledi pelikánovití (Pelecanidae) se fylogeneticky velmi blíží také čeledi volavkovití (Ardeidae) a ibisovití (Threskiornithidae), které se dříve řadily do řádu brodiví. V tradičním řádu Pelecaniformes zůstala z původních skupin pouze čeleď pelikánovití, a proto se tento řád dnes místo veslonoží nazývá pelikáni. Zbylé čeledi původního řádu Pelecaniformes jsou dnes označovány jako Suliformes (Gaisler *et Zima*, 2018).

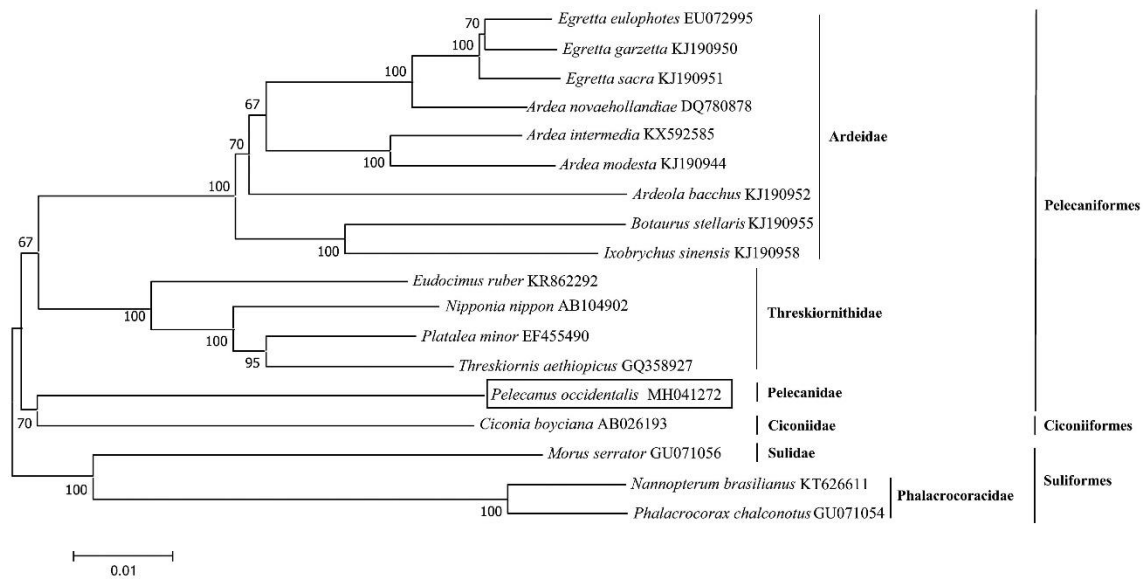
Podle Gaisler *et Zima* (2018) se po mnoha systematických úpravách do řádu pelikáni (Pelecaniformes) řadí čeledi Pelecanidae (pelikánovití), Scopidae (kladivoušovití), Balaenicipitidae (člunozobcovití), Ardeidae (volavkovití) a Threskiornithidae (ibisovití) (obrázek č. 3). Kdežto řád veslonoží (Suliformes) zahrnuje čeledi Fregatidae (fregatkovití), Sulidae (terejovití), Phalacrocoracidae (kormoránovití),

Anhingidae (anhingovití) a je označen za samostatnou monofyletickou skupinu (Gaisler *et Zima*, 2018). Do řádu brodiví (Ciconiiformes) spadá pouze jedna čeleď - čápovití (Ciconiidae) (Huang *et al.*, 2018).



Obrázek č. 3: Fylogenetické vztahy pěti čeledí řádu Pelecaniformes (Gaisler *et Zima*, 2018, podle Hackett *et al.*, 2008).

Fylogenetické vztahy mezi řády Pelecaniformes, Suliformes a Ciconiiformes však nejsou zdaleka vyřešeny, a proto se Huang *et al.* (2018) snažili najít příbuznost mezi čeleděmi Pelecanidae (pelikánovití) a Ciconiidae (čápovití). Nejdříve osekvenovali a popsali mitochondriální genom pelikána hnědého (*Pelecanus occidentalis*), který porovnali se sekvencemi jiných obratlovců. Po sestrojení fylogenetického stromu zjistili, že *Pelecanus occidentalis* je ve společném kladu s *Ciconia boyciana* a ti jsou sesterskou skupinou kladu, který se rozděluje na čeleď Ardeidae (volavkovití) a čeleď Threskiornithidae (ibisovití) (Huang *et al.*, 2018) (obrázek č. 4).



Obrázek č. 4: Zařazení pelikána hnědého (*Pelecanus occidentalis*) do systému ptáků (Huang *et al.*, 2018). Svislicemi jsou označeny příslušné čeledi a řády.

Podle Gaisler *et Zima* (2018) je pelikán bílý (*Pelecanus onocrotalus*) řazen do systému následovně:

- Říše: živočichové (Animalia)
- Kmen: strunatci (Chordata)
- Podkmen: obratlovci (Vertebrata)
- Třída: ptáci (Aves)
- Podtřída: letci (Neognathae)
- Řád: pelikáni (Pelecaniformes)
- Čeleď: pelikánovití (Pelecanidae)
- Rod: pelikán (*Pelecanus*)
- Druh: pelikán bílý (*Pelecanus onocrotalus*)

3.2 Řád pelikáni

Pelikáni (Pelecaniformes) jsou skupinou větších ptáků s rozmanitým vnějším vzhledem (volavka, ibis, pelikán, člunozobec, kladivouš). Mají silný jazyk, kostrční žlázu a vnější nozdry, které jsou redukovány. Jícen je roztažitelný a žaludek je složen ze tří dílů. Hnízdo si stavějí buď na zemi nebo na stromech. Žijí v koloniích, a to v tropech, subtropích nebo v mírném pásu, nejčastěji v okolí sladkých vod. Živí se převážně rybami. Jejich mláďata jsou nidikolní (Gaisler *et Zima*, 2018).

3.2.1 Čeleď pelikánovití

Čeleď pelikánovití (Pelecanidae) zahrnuje 1 rod se sedmi až osmi druhy. Kennedy *et al.* (2013) popisuje 8 samostatných druhů, kam spadá pelikán bílý (*Pelecanus onocrotalus*), africký (*P. rufescens*), australský (*P. conspicillatus*), hnědý (*P. occidentalis*), kadeřavý (*P. crispus*), severoamerický (*P. erythrorhynchos*), skvrnozobý (*P. philippensis*) a chilský (*P. thagus*). Del Hoyo *et al.* (1992) uvádí, že pelikán chilský je pouze poddruhem pelikána hnědého a nazývá se pelikán hnědý chilský (*P. occidentalis thagus*).

Hudec *et* Hanzák (1974) označují všechny druhy rodu pelikán jako mohutné a velmi těžké ptáky. Délka jejich těla je 140–180 cm, tělesná hmotnost je 5,4–15 kg (Šťastný *et al.*, 1998). Mají dlouhý, zploštělý a na konci hákovitý zobák uzpůsobený lovu ryb (Gosler, 1994). Na spodní čelisti se nachází široký a roztažitelný hrdelní vak (Hudec *et* Hanzák, 1974, Gaisler *et* Zima, 2018). Nohy mají poměrně krátké se čtyřmi prsty spojenými plovací blánou (Hudec *et* Hanzák, 1974). Ocas je krátký (Gosler, 1994). Samec i samice jsou stejně zbarveni, avšak samec je větší (Gosler, 1994).

Vyskytují se nejčastěji v okolí vnitrozemských jezer, u ústí řek a na mořském pobřeží (Hudec *et* Hanzák, 1974). Mořské druhy pelikánů jsou zbarveny hnědě, ty sladkovodní jsou však šedavé nebo bílé barvy s černými špičkami křídel (Hudec *et* Hanzák, 1974; Gosler, 1994). Žijí v tropickém a mírném pásu obou polokoulí, ale na Novém Zélandu, v Oceánii a na východě Jižní Ameriky se nevyskytují (Hudec *et* Hanzák, 1974).

Jsou vytrvalými letci s rozpětím křídel v rozmezí 2,3–3,6 m (Gosler, 1994, Šťastný *et al.*, 1998). Při letu nebo plavání na vodě je jejich zobák přiložen na krku (Hudec *et* Hanzák, 1974).

Pelikánovití hnízdí v koloniích, a to v křovinách, rákosinách nebo na volném prostranství (Hudec *et* Hanzák, 1974). Hnízda si stavějí z větví, kdy materiál sbírá samec a samice staví (Gosler, 1994). Hnízdí jednou ročně (Gosler, 1994). Při letu se shlukují ve větších hejnech (Hudec *et* Hanzák, 1974). Kladou 2–4 vejce modrobílé barvy (Hudec *et* Hanzák, 1974). Na vejcích sedí oba partneři, a to 30–37 dní (Gosler, 1994). Mláďata se líhnou téměř holá s krátkým a slabým zobákem (Hudec *et* Hanzák, 1974). Ten však začne zesilovat hned po tom, co jim začne růst prachové peří (Hudec *et* Hanzák, 1974). Mláďata jsou krmena polostrávenými rybami z hrdelních vaků jejich rodičů, po 50–70 dnech hnízdo opouštějí, dospívají až po několika letech (Hudec *et* Hanzák, 1974, Gosler, 1994).

Ryby loví skupinově, a to tak, že několik metrů od břehu vytvoří řadu, která se přibližuje břehu. Někteří ptáci bijí křídly do vody a nahánějí tak ryby k mělčině, kde si je potom chytanou do zobáku (Hudec *et* Hanzák, 1974). Jediný pelikán hnědý loví ryby výhradně střemhlavým pádem do vody (Šťastný *et al.*, 1998).

3.2.2 Pelikán bílý

Pelikán bílý (*Pelecanus onocrotalus*) je velký vodní pták s délkou těla 140–180 cm (Gosler, 1994). Dospělí jedinci pelikána bílého jsou skoro vždy zbarveni do bíla s odstíny růžové na křídlech. Někteří jedinci mají na hrudi žlutou náprsenku velikosti dlaně (Nelson, 2005). Konce letek jsou zbarveny černě až hnědě (Hudec *et* Hanzák, 1974). Ocas je zbarven do bíla. Na hlavě mají chocholku dlouhou 10–14 cm (Nelson, 2005). Ta se v období námluv vyskytuje u samce i samice (Hudec *et* Hanzák, 1974). Jejich dlouhý zobák měří 43–45 cm, je žluté barvy, olemován modře a zakončen červeným drápkem (Hudec *et* Hanzák, 2005, Nelson, 2005). Na horní části zobáku, asi 7 cm od kořene, se samcům v období námluv vytváří výrůstek. Obličejová část je u samců žlutá, u samic oranžová (Nelson, 2005). Nohy jsou červené barvy (Hudec *et* Hanzák, 1974). Z hnízd se často ozývá drsným chrochtavým a bzučivým hlasem (Gosler, 1994).

V Evropě hnízdí pelikán bílý pouze ojediněle, a to v Rumunsku, Bulharsku a v okolí Azovského moře (Hudec *et* Hanzák, 1974). Nejblíže od nás v deltě Dunaje (Gaisler *et* Zima, 2018). Mimo Evropu hnízdí dále na ostrovech Perského zálivu, v oblastech západní Asie a v tropické Africe (Hudec *et* Hanzák, 1974). V období od července do října dochází k vyhníždění a následné migraci pelikánů bílých do Afriky (Šťastný *et* Hudec, 2016). Každým rokem odlétá 70 000–80 000 jedinců (Nelson, 2005). Hejno zaujímá při přesunu formaci písmene „V“ nebo letí v liniích (Gosler, 1994). Při letu střídá plachtění s pomalými údery křídel, hlava je přitom v úrovni hřbetu (Gosler, 1994). Může letět rychlostí okolo 60–70 km/h (Nelson, 2005). Návrat do hnízdiště probíhá od června do srpna (Šťastný *et* Hudec, 2016). Hnízdí jak v malých, tak i ve větších koloniích, které jsou vždy odděleny od kolonií ostatních vodních ptáků (Hudec *et* Hanzák, 1974).

Hnízdo si pelikán bílý staví z rákosu ve výšce asi 1–1,5 metru nad hladinou vody. V průměru má hnízdo asi 1,5 metru (Hudec *et* Hanzák, 1974). Samice klade celkem 1–3 vejce, a to až ve dvoudenních intervalech (Nelson, 2005). Zahřívání je začíná již po snesení prvního vejce (Šťastný *et al.*, 1998). Na vejcích sedí převážně samice, pouze ráno a večer ji vystřídá samec, aby se mohla nasytit. Po 33 dnech inkubace, kdy hnízdo svou hmotností

klesne na vodní hladinu, dochází k postupnému líhnutí mlád'at. Ta jsou velikostně rozdílná. Mlád'ata jsou krmivá a po dvou a půl měsících jsou schopna letu. Koncem srpna si zvykají již na samostatný život (Hudec *et* Hanzák, 1974). Po odchovu mlád'at dochází u dospělců k přepeření. Mlád'ata jsou na hlavě a krku zbarvena do hněda, ale ocasní pera jsou bílá. Zobák je šedý a postupně se mění ve žlutý, oči jsou hnědé a nohy růžové. Jejich peří se postupně mění v šedé a následně během třetího a čtvrtého roku, kdy pohlavně dospívají, dochází k přepeření (Nelson, 2005).

3.3 Mikrosatelity

Mikrosatelity jsou sekvence nukleotidů dlouhé desítky až stovky párů bazí, které jsou složeny z repetitivních jednotek dlouhých 1–6 bp opakujících se tandemově za sebou. Vyskytují se v celém genomu (kódujících i nekódujících oblastech) prokaryot i eukaryot a vykazují vysokou úroveň polymorfismu (Schlötterer *et* Tautz, 1992, Chistiakov *et al.*, 2006). Protože jsou mikrosatelity vysoce informativní, kodominantní, multialelické, přenositelné mezi příbuznými druhy a snadno experimentálně reprodukovatelné, patří mezi nejrozšířenější genetické markery (Mason, 2015). Uplatňují se při genetickém mapování nebo analýze vztahů mezi druhovými a populačními studii (Chistiakov *et al.*, 2006, Shamjana *et al.*, 2015).

SSRs (Simple Sequence Repeats) nebo STRs (Short Tandem Repeats), jak jsou mikrosatelity nazývány (Pérez-Jiménez *et al.*, 2013, Phumichai *et al.*, 2015), se podílejí na struktuře DNA, organizaci chromatinu, translaci, transkripci, genové expresi a dynamice buněčného cyklu (Chistiakov *et al.*, 2006, Shamjana *et al.*, 2015).

Nejčastější repetitivní jednotkou je dinukleotid (AC)_n a (AT)_n, dále se vyskytují také mono-, tri-, tetra-, penta- a hexanukleotidové repeticce (Tóth *et al.*, 2000).

Mikrosatelity vznikají obvykle inzercí nebo delecí celých opakovaných motivů z důvodu sklouznutí DNA polymerázy nebo delecí celých opakujících se motivů při rekombinaci. Čím delší je sekvence celého mikrosatelitu a čím kratší je repetitivní motiv, tím větší je pravděpodobnost, že dojde k mutaci (Vieira *et al.*, 2016). Dle motivu se mikrosatelity rozdělují na mikrosatelity dokonalé, které jsou složeny z jednoho typu repetitivního motivu (CACACACACA), mikrosatelity nedokonalé, u kterých se mezi repetitivními motivy vyskytne pár bazí, který k motivu nepatří (CACACATCACA), mikrosatelity přerušené, u kterých je do repetitivního motivu vložena odlišná sekvence několika párů bazí (CACACATGTTCA) a mikrosatelity složené, které jsou tvořeny alespoň dvěma repetitivními motivy za sebou (CACATGTGTG) (Oliveira *et al.*, 2006).

3.3.1 Mikrosatelity u ptáků z řádu tučňáci

Podle Prum *et al.* (2015) jsou tučňáci (Sphenisciformes) řazeni, stejně jako pelikáni, do kladu Aequorlornithes. Martínez *et Bonan* (2018) popisují tučňáky jako středně velké, nelétavé mořské ptáky, kteří mají zavalité tělo s krátkýma, ale robustníma nohama. Žijí v Antarktidě, v Australoasii, výjimečně v Afrotropické a Neotropické oblasti. Řád tučňáci zahrnuje pouze jednu čeleď tučňákovití, která se dále dělí do 6 rodů zahrnujících 18 druhů (Martínez *et Bonan*, 2018). Rozdělení jednotlivých rodů a druhů se nachází v tabulce č. 1.

V 11 pracích bylo u 10 druhů tučňáků (tabulka č. 1) popsáno 147 polymorfních mikrosatelitních lokusů. Mikrosatelity pro vybrané druhy tučňáků budou popsány v následujících kapitolách.

Tabulka č. 1: Rozdělení řádu tučňáci do jednotlivých rodů a druhů (Bradford, 2014) s počtem popsaných mikrosatelitů a literárním zdrojem.

Rod	Druh	Počet mikrosatelitů	Literární zdroj
<i>Aptenodytes</i>	Tučňák císařský (<i>A. forsteri</i>)	-	-
	Tučňák patagonský (<i>A. patagonicus</i>)	-	-
<i>Eudyptes</i>	Tučňák jižní skalní (<i>E. chrysocome</i>)	-	-
	Tučňák žltorohý (<i>E. chrysolophus</i>)	25	Ahmed <i>et al.</i> , 2009
	Tučňák severní skalní (<i>E. moseleyi</i>)	-	-
	Tučňák novozélandský (<i>E. pachyrhynchus</i>)	-	-
	Tučňák snárský (<i>E. robustus</i>)	-	-
<i>Eudyptula</i>	Tučňák chocholatý (<i>E. sclateri</i>)	-	-
	Tučňák královský (<i>E. schlegeli</i>)	-	-
	Tučňák nejmenší (<i>E. minor</i>)	8 20	Billing <i>et al.</i> , 2007 Grosser <i>et Waters</i> , 2015
<i>Megadyptes</i>	Tučňák žlutooký (<i>M. antipodes</i>)	12	Boessenkool <i>et al.</i> , 2008

Tabulka č. 1: Pokračování.

Rod	Druh	Počet mikrosatelitů	Literární zdroj
<i>Pygoscelis</i>	Tučňák kroužkový (<i>P. adeliae</i>)	6 14	Roeder <i>et al.</i> , 2001
	Tučňák oslí (<i>P. papua</i>)	11	Vianna <i>et al.</i> , 2017
	Tučňák uzdičkový (<i>P. antarctica</i>)	9 16	Kang <i>et al.</i> , 2015
	Tučňák Humboldtův (<i>S. humboldti</i>)	7 a 5 1	Schlosser <i>et al.</i> , 2003 a 2009
<i>Spheniscus</i>	Tučňák magellanský (<i>S. magellanicus</i>)	1	Akst <i>et al.</i> , 2002
	Tučňák galapážský (<i>S. mendiculus</i>)	3	
	Tučňák brýlový (<i>S. demersus</i>)	1 8	Labuschagne <i>et al.</i> , 2013

3.3.1.1 Rod *Eudyptes*

Rod *Eudyptes* zahrnuje 7 druhů, pro jeden z nich byly v jedné práci popsány polymorfní mikrosatelitní lokusy (Ahmed *et al.*, 2009).

Tučňák žltorohý

Ahmed *et al.* (2009) popsali izolaci 25 mikrosatelitních lokusů u tučňáka žltorohého (*Eudyptes chrysolophus*).

Dospělým jedincům tučňáka žltorohého, kteří pobývali v koloniích v místě zvaném Macaroni Cwm, na Ptačím ostrově v Jižní Georgii, byla odebrána krev. Z ní byla extrakcí za použití octanu amonného získána genomická DNA (Nicholls *et al.*, 2000). Autoři následně za pomoci metody Armour *et al.* (1994) sestavili DNA knihovnu, kterou rozšířili o di- a tetranukleotidové mikrosatelitní motivy (Glenn *et Schable*, 2005). Osekvenovali 288 bakteriálních kolonií, ze kterých vybrali 132 sekvencí obsahujících mikrosatelitní motiv (Ahmed *et al.*, 2009). Pro 32 z nich navrhli pomocí programu Primer 3.0 (Rozen *et Skaletsky*, 2000) dvojice primerů, kterou poté testovali na DNA 28 jedinců tučňáka žltorohého. Provedli tedy PCR amplifikace za použití 32 párů primerů, 7 z nich produkt vůbec neamplifikovalo, zbylých 25 párů primerů polymorfní produkt poskytlo. Na jednotlivých lokusech našli 4–33 alel (Ahmed *et al.*, 2009).

Všech 25 polymorfních mikrosatelitních lokusů následně testovali pomocí *cross-species* PCR na čtyřech druzích tučňáků: t. patagonském (*Aptenodytes*

patagonicus), t. kroužkovém (*Pygoscelis adeliae*), t. oslím (*P. papua*) a t. uzdičkovém (*P. antarctica*). PCR provedli na DNA tří nepříbuzných jedinců od každého druhu. 17 lokusů bylo polymorfních alespoň u 1 ze 4 druhů tučňáků. 8 lokusů bylo polymorfních u 3 ze 4 druhů tučňáků. I přesto, že testování proběhlo pouze na 3 nepříbuzných jedincích stejného druhu, byly mikrosatelitní lokusy tučňáka žltorohého označeny za vhodné pro další genetické studie populací (Ahmed *et al.*, 2009).

3.3.1.2 Rod *Eudyptula*

Rod *Eudyptula* zahrnuje jeden druh, u kterého bylo, ve dvou pracích (Billing *et al.*, 2007, Grosser *et Waters*, 2015), nalezeno a popsáno 28 polymorfních mikrosatelitních lokusů.

Tučňák nejmenší

Isolaci prvních 8 mikrosatelitních lokusů u tučňáka nejmenšího (*Eudyptula minor*) popsali Billing *et al.* (2007), dalších 20 mikrosatelitů popsali Grosser *et Waters* (2015).

Billing *et al.* (2007) odebrali krev nepříbuzným jedincům tučňáka nejmenšího žijícím v kolonii Summerland na Filipově ostrově. Následným vysolováním získali DNA, kterou, pomocí enzymu *Sau3A*, rozštípali na jednotlivé fragmenty, ty zdenaturovali a připojili k jednořetězcovým oligonukleotidům. Vzniklé fragmenty poté rozseparovali elektroforeticky v agarózovém gelu. Fragmenty o velikosti 400–900 bp následně z gelu purifikovali a hybridizovali je na (GA)_n a (GAAA)_n oligonukleotidy značené biotinem. Fragmenty promyli, amplifikovali a klonovali do pGEM vektoru. Jednotlivé klony byly protříděny pomocí kolonové PCR za přítomnosti pGEM primerů detekujících mikrosatelity. Klony obsahující mikrosatelit dále amplifikovali, výsledné produkty přečistili přes QIAquick PCR purifikační kit (Qiagen) a osekvenovali (Billing *et al.*, 2007).

18 klonů obohacených o (GA)_n a 10 klonů obohacených o (GAAA)_n repetic osekvenovali. Pro 10 klonů navrhli páry primerů, jelikož obsahovaly 7 a více (GA)_n repetic a 15 a více (GAAA)_n repetic. Získané páry primerů následně testovali pomocí PCR na DNA nejméně 35 jedinců dvou různých populací tučňáka nejmenšího (pocházejících z Filipova a Troubridgeova ostrova). U tučňáků nejmenších z Filipova ostrova bylo polymorfních 7 lokusů (Emm1, Emm2, Emm3, Emm5, Emm6, Emm7 a Emm8). Lokus Emm4 byl monomorfní. U tučňáků nejmenších z Troubridgeova ostrova

bylo také 7 lokusů polymorfních, s výjimkou Emm8, který byl monomorfní (Billing *et al.*, 2007).

U tučňáka nejmenšího také provedli *cross-species* PCR amplifikaci mikrosatelitního lokusu B3-2 odvozeného od tučňáka brýlového (*Spheniscus demersus*). PCR produkt měl 8 alel (Billing *et al.*, 2007).

Grosser *et Waters* (2015) získali DNA z krve tučňáků žijících na Jižním ostrově Nového Zélandu, a to fenol-chloroformovou extrakcí. Po následné sekvenaci DNA vybrali ty sekvence, které obsahovaly alespoň 5 opakujících se jednotek s di-, tri-, a tetranukleotidovými motivy. Pro 346 sekvencí navrhli páry primerů a 30 z nich otestovali. Produkt 10 mikrosatelitních lokusů byl monomorfní nebo se jej nepodařilo naamplifikovat. Amplifikace zbylých 20 lokusů poskytla polymorfní produkty s 2–26 alelami (Grosser *et Waters*, 2015).

3.3.1.3 Rod *Megadyptes*

Rod *Megadyptes* zahrnuje pouze jeden druh, pro kterého byly v jedné práci popsány polymorfní mikrosatelitní lokusy (Boessenkool *et al.*, 2008).

Tučňák žlutooký

Boessenkool *et al.* (2008) popsali 12 mikrosatelitních lokusů u tučňáka žlutookého (*Megadyptes antipodes*).

Autoři sestavili 3 genomické knihovny, první dvě dle protokolu Perrin *et Roy* (2000) a třetí podle protokolu Glenn *et Schable* (2005). Genomickou DNA získali izolací pomocí DNeasy Kitu (Qiagen) a následně ji rozštěpali dvěma restrikčními endonukleázami *MboI/RsaI* (Promega). Takto zpracovanou DNA ligovali do klonovacího vektoru a produkty obsahující repetitivní sekvence zachytili pomocí magnetických částic značených streptavidinem (Roche Applied Science). Fragментy, které obsahovaly repetitivní sekvence autoři opět rozštěpali, ligovali do klonovacího vektoru a přenesli na nylonovou membránu. Klony, které obsahovaly více než 8 repetitivních jednotek následně naamplifikovali a osekvenovali. Pro 50 z nich byly navrženy páry primerů, které testovali na DNA 12 jedinců tučňáka žlutookého. 12 lokusů bylo polymorfních. Rozmezí počtu alel se pohybovalo od 2 do 8 (Boessenkool *et al.*, 2008).

3.3.1.4 Rod *Pygoscelis*

Rod *Pygoscelis* zahrnuje 3 druhy. Ve 3 pracích bylo popsáno celkem 56 polymorfních mikrosatelitů (Roeder *et al.*, 2001, Kang *et al.*, 2015, Vianna *et al.*, 2017).

Tučňák kroužkový

U tučňáka kroužkového bylo ve dvou pracích popsáno 20 mikrosatelitních lokusů. Roeder *et al.* (2001) popsali, ve své studii, která se zabývala genetickými rozdílnostmi 13 hnízdnicích lokalit tučňáků kroužkových (*Pygoscelis adeliae*) žijících na pobřeží Antarktidy, 6 mikrosatelitních lokusů. Izolaci dalších jedenácti mikrosatelitů popsali Vianna *et al.* (2017).

Roeder *et al.* (2001) odebrali krev 442 jedincům tučňáka kroužkového a následnou fenol-chloroformovou extrakcí (Sambrook *et al.*, 1989) nebo pomocí Progenome II kitu (Progenome Industries) získali genomickou DNA. Ta byla štěpena restriční endonukleázou *Sau3A* na různě dlouhé fragmenty, ze kterých po roztřídění vytvořili dvě genomické knihovny.

První genomická knihovna obsahovala fragmenty dlouhé 250–900 bp. Ty byly ligovány do pUC18 plazmidu a následně transformovány do kompetentních buněk DH5 α . Buňky nechali růst na agarovém médiu, plazmidy poté přečistili, DNA inzerty osekvenovali a následně elektroforeticky rozdělili v polyakrylamidovém gelu. Pomocí softwaru Primer 3.0 (Rozen *et Skaletsky*, 1998) navrhli k jednotlivým sekvencím páry primerů (Roeder *et al.*, 2001).

Druhá genomická knihovna zahrnovala fragmenty dlouhé 300–600 bp, ty byly amplifikovány a následně denaturovány. Jednotlivé fragmenty DNA se ligovaly do pUC18 plazmidu a následnou inkubací přes noc na agarózovém médiu se plazmidy transformovaly do MAX Efficiency buněk (GIBCO BRL). Vzniklé kolonie purifikovali a DNA inzerty osekvenovali (Sambrook *et al.*, 1989). Celkově izolovali 6 mikrosatelitních lokusů vykazujících polymorfismus (Roeder *et al.*, 2001).

Pro genotypování 442 jedinců použili celkem 7 mikrosatelitů. Šest izolovaných mikrosatelitních lokusů (RM3, RM6, AM13, AM12, AM13 a TP500) pocházelo od tučňáka kroužkového (*Pygoscelis adeliae*) a jeden (HrU2) pocházel od vlaštovky obecné (*Hirundo rustica*) (Ellegren, 1992; Primmer *et al.*, 1996). Počet alel na lokus byl od 4 do 20 (Roeder *et al.*, 2001).

Vianna *et al.* (2017) testovali 14 mikrosatelitních lokusů pocházejících od tučňáka kroužkového na celkem 26 jedincích tří druhů tučňáků – 9 jedincích tučňáka oslího, 9 jedincích t. uzdičkového a 8 jedincích t. kroužkového. 5 lokusů bylo polymorfních u všech tří druhů tučňáků, 7 bylo polymorfních u dvou druhů tučňáků a zbylé dva byly

polymorfní pouze u jednoho druhu tučňáka. Počet alel na lokus se pohyboval v rozmezí od 2 do 9 (Vianna *et al.*, 2017).

Tučňák uzdičkový

Pro tučňáka uzdičkového (*Pygoscelis antarctica*) bylo ve dvou pracích popsáno celkem 25 mikrosatelitních lokusů. Kang *et al.* (2015) popsali izolaci 16 mikrosatelitních lokusů u tučňáka uzdičkového a Vianna *et al.* (2017) popsali izolaci dalších 9 mikrosatelitních lokusů.

Kang *et al.* (2015) odebrali vzorky krve sedmi jedincům tučňáka uzdičkového, pocházejícím z oblasti Antarktidy. Genomickou DNA vyizolovali za použití DNeasy Blood and Tissue Kitu (Qiagen). Pro 30 mikrosatelitních oblastí byly pomocí softwaru Primer 3.0 (Rozen *et Skaletsky*, 2000) navrženy páry primerů. 29 lokusů se podařilo amplifikovat a u 16 mikrosatelitů byly identifikovány alely v počtu 2–9. Tyto mikrosatelitní markery testovali pomocí *cross-species* PCR amplifikace u dalších tří druhů tučňáků (tučňáka kroužkového, t. oslího a t. žlutorohého), kdy od každého druhu testovali dva jedince.

Vianna *et al.* (2017) testovali, pomocí *cross-species* PCR amplifikace, 9 mikrosatelitních lokusů pro tučňáka uzdičkového na DNA 26 jedinců pocházejících od 3 druhů tučňáků (9 jedinců tučňáka oslího, 9 jedinců t. uzdičkového a 8 jedinců t. kroužkového). Pouze 3 mikrosatelity byly polymorfní u všech tří druhů tučňáků. Čtyři mikrosatelity byly polymorfní u dvou druhů tučňáků a 2 byly polymorfní u jednoho druhu tučňáka. Na jednom lokusu se vyskytovalo 2–7 alel (Vianna *et al.*, 2017).

Tučňák oslí

Vianna *et al.* (2017) popsali izolaci 11 mikrosatelitních lokusů pro tučňáka oslího. Genomickou DNA izolovali prostřednictvím vysolovací metody (Aljanabi *et Martinez*, 1997) ze vzorků krve 6 jedinců tohoto druhu. DNA následně zakoncentrovali, promyli ethanolom a rozštěpili na fragmenty velikosti okolo 160 bp. Takto připravenou DNA purifikovali pomocí SOLiD Library Column Purification Kitu (Thermo Fisher Scientific) a rozdělili ji do jednotlivých knihoven. Fragmenty osekvenovali a pomocí softwaru MISA hledali tandemové repetice s di-, tri- a tetranukleotidovými motivy. Pro fragmenty (s maximální délkou 200 bp) obsahující repetitivní motiv navrhli prostřednictvím softwaru Primer 3.0 (Rozen *et Skaletsky*, 2000) páry primerů. 11 mikrosatelitních lokusů izolovaných z DNA tučňáka oslího vykazovalo polymorfismus.

Ze 170 tetranukleotidových repetice vybrali 34 polymorfních lokusů, ke kterým pomocí softwaru navrhli páry primerů. Společně se 14 nově nalezenými mikrosatelity tučňáka kroužkového a 9 mikrosatelitními lokusy tučňáka uzdičkového bylo 11 mikrosatelitů tučňáka oslího testováno na 26 jedincích tří druhů tučňáků. Sedm mikrosatelitních lokusů bylo polymorfních u všech tří druhů tučňáků, 2 lokusy byly polymorfní u dvou druhů tučňáků a 2 lokusy byly polymorfní u jednoho druhu tučňáka. Na lokusu se nacházelo od 2 do 7 alel (Vianna *et al.*, 2017).

3.3.1.5 Rod *Spheniscus*

Rod *Spheniscus* zahrnuje celkem 4 druhy, u kterých bylo ve 4 pracích popsáno 26 mikrosatelitních lokusů (Akst *et al.* 2002, Schlosser *et al.*, 2003 a 2009, Labuschagne *et al.*, 2013).

Tučňák magellanský

Izolaci jediného mikrosatelitního lokusu u tučňáka magellanského (M1-11) popsali Akst *et al.* (2002).

Ze vzorků krve tučňáků magellanských pocházejících z Argentiny extrahovali za použití DNeasy Blood and Tissue Kitu (Qiagen) genomickou DNA (Akst *et al.*, 2002). Dle protokolů Armour *et al.* (1994), Fleischer *et Loew* (1995), Hamilton *et al.* (1999) objevili mikrosatelitní dinukleotidový motiv, ke kterému navrhli pár primerů a jeden z nich fluorescenčně označili. Po proběhnutí PCR vzniklé produkty přečistili a osekvenovali. Mikrosatelitní lokus M1-11 pocházející od tučňáka magellanského následně otestovali na genomické DNA 46 jedinců tučňáka magellanského a DNA 46 jedinců tučňáka galapážského. U žádného jedince obou druhů však tento lokus polymorfismus nevykazoval (Akst *et al.*, 2002).

Tučňák galapážský

Pro tučňáka galapážského byly v jedné práci popsány 3 mikrosatelitní lokusy (Akst *et al.*, 2002).

Mikrosatelity pocházející od tučňáka galapážského (G3-11, G3-6 a G3-2), které po osekvenování označili jako polymorfní, následně otestovali na genomické DNA 46 jedinců tučňáka magellanského a DNA 46 jedinců tučňáka galapážského. Všechny tři mikrosatelitní lokusy vykazovaly polymorfismus. Počet alel na lokus se pohyboval od 2 do 19 (Akst *et al.*, 2002).

Tučňák Humboldtův

Pro tučňáka Humboldtova (*Spheniscus humboldti*) bylo ve 3 pracích popsáno 13 mikrosatelitních lokusů. První mikrosatelitní lokus odvozený od tučňáka Humboldtova objevili Akst *et al.* (2002) při studiu genetické variace mezi tučňákem galapážským a tučňákem magellanským. Následně pak Schlosser *et al.* (2003) popsali sedm mikrosatelitních lokusů. Dalších 5 mikrosatelitních lokusů charakterizovali Schlosser *et al.* (2009).

Akst *et al.* (2002) popsali izolaci jednoho mikrosatelitního lokusu (H2-6). Ten následně testovali na DNA 46 jedinců tučňáka galapážského a DNA 46 jedinců tučňáka magellanského. U tučňáka galapážského našli 3 alely a u tučňáka magellanského detekovali 6 alel.

Schlosser *et al.* (2003) charakterizovali u tučňáka Humboldtova 7 polymorfních mikrosatelitních lokusů, kdy 24 tučňákům, pocházejícím ze tří chilských a jedné peruánské kolonie, odebrali vzorky DNA. Extrahovanou DNA (Sambrook *et al.*, 1998) nejdříve rozštěpili pomocí restrikčního enzymu *Tsp590I*. Vzniklé fragmenty dlouhé 500–1 000 bp amplifikovali pomocí PCR, naklonovali je do plazmidů a přenesli na selektivní agarové médium. Bílé pozitivní kolonie osekvenovali a pro vzniklé lokusy navrhli pomocí softwaru Primer 3.0 (Rozen *et Skaletsky*, 1998) páry primerů. Sedm polymorfních lokusů vykazovalo od 5 do 11 alel (Schlosser *et al.*, 2003).

Těchto sedm mikrosatelitů bylo testováno na dalších osmi druzích tučňáků, a to na 20 jedincích tučňáka brýlového (*Spheniscus demersus*), 20 jedincích t. magellanského (*S. magellanicus*), 5 jedincích t. oslího (*Pygoscelis papua*), 2 jedincích t. uzdičkového (*P. antarctica*), 5 jedincích t. jižního skalního (*Eudyptes chrysocome*), 5 jedincích t. žlutorohého (*E. chrysolophus*), 5 jedincích t. patagonského (*Aptenodytes patagonicus*) a 5 jedincích t. nejmenšího (*Eudyptula minor*). Maximálně u 5 druhů tučňáků z testovaných osmi bylo polymorfních všech 7 mikrosatelitních lokusů (Schlosser *et al.*, 2003).

Schlosser *et al.* (2009) popsali dalších 5 mikrosatelitních lokusů vyskytujících se u tučňáka Humboldtova. Genomickou DNA vyizolovali z krve tučňáků žijících ve 22 odlišných koloniích dle protokolu Sambrook *et al.* (1989). Podle protokolu Schlosser *et al.* (2003) a Garner *et al.* (2000) navrhli 28 párů primerů, objevili 12 dinukleotidových motivů, které označili jako polymorfní. Následně zjistili, že sedm lokusů již popsali

v roce 2002. Zbylých pět charakterizovali jako polymorfní. Na lokusu se vyskytovalo 4–16 alel (Schlosser *et al.*, 2009).

Tučňák brýlový

První mikrosatelitní lokus odvozený od tučňáka brýlového (*Spheniscus demersus*) popsali Akst *et al.* (2002). Dalších 8 mikrosatelitních lokusů charakterizovali Labuschagne *et al.* (2013).

Jeden mikrosatelitní lokus (B2-2) odvozený od tučňáka brýlového charakterizovali Akst *et al.* (2002). Následně jej testovali na DNA tučňáků galapážských, u kterých byl hodnocen jako monomorfní, a t. magellanských, u kterých vykazoval 8 alel (Akst *et al.*, 2002).

Labuschagne *et al.* (2013) popsali izolaci 8 mikrosatelitů. 25 dospělým jedincům tučňáka brýlového z oblasti KwaZulu v Jižní Africe, odebrali krev. Za použití DNeasy Blood and Tissue Kitu (Qiagen) z ní vyzolovali genomickou DNA. Repetitivní motivy osekvenovali a pomocí programu MSATCOMMANDER version 0.8.1 (Faircloth, 2008) našli mikrosatelitní motivy s nejméně 8 repeticemi dlouhými 2–6 bp. Pro 12 mikrosatelitních lokusů byly pomocí softwaru Primer 3.0 (Rozen *et Skaletsky*, 1998) navrženy páry primerů. Všech dvanáct lokusů bylo amplifikováno, 8 z nich bylo polymorfních. Počet alel na lokus byl 2–6 (Labuschagne *et al.*, 2013).

3.3.2 Univerzální ptačí mikrosatelity

Jelikož jsou mikrosatelity často druhově specifické, snažili se Dawson *et al.* (2010 a 2013) vytvořit univerzální mikrosatelity, které by byly přenositelné v rámci třídy ptáků. Vyšli ze známých sekvencí dvou velmi vzdálených druhů, zebřičky pestré (*Taeniopygia guttata*) a kura bankivského (*Gallus gallus*) a na základě toho ve dvou pracích popsali charakteristiku 60 párů primerů pro amplifikaci univerzálních ptačích mikrosatelitů (36 párů primerů pro amplifikaci EST ptačích mikrosatelitů a 24 párů primerů pro amplifikaci konzervovaných ptačích mikrosatelitů).

3.3.2.1 EST ptačí mikrosatelity

Dawson *et al.* (2010) navrhli novou metodu identifikace univerzálních ptačích mikrosatelitů a popsali nový jednodušší postup navrhování párů primerů. Nová sada mikrosatelitních markerů byla odvozena z databáze EST sekvencí a je natolik funkční, že se dá použít k testování mezi vzdálenými ptačími druhy. EST sekvence pocházely z cDNA knihovny, která vznikla reverzní transkripcí mRNA.

Ke 135 mikrosatelitním sekvencím (Expressed Sequence Tag, EST) zebřičky pestré (*Taeniopygia guttata*) přiřadili genomové sekvence kura bankivského (*Gallus gallus*). Za použití softwaru MEGA3 (Kumar *et al.*, 2004) porovnali homologní sekvence mezi oběma druhy. K 35 vybraným lokusům, které měly identický repetitivní motiv u obou druhů, navrhli pomocí softwaru Primer 3.0 (Rozen *et Skaletsky*, 2000) páry primerů (Dawson *et al.*, 2010).

Navržené páry primerů byly následně využity ke genotypizaci 52 ptačích druhů. 22 ptačích druhů pocházelo z řádu pěvců, zbylých 30 vybrali z jiných řádů ptáků. 33 párů primerů poskytlo polymorfní produkt s počtem alel v rozmezí 2–6 na lokus. Lokus TG01-086 jako jediný produkt nevytvořil a lokus TG09-014 byl monomorfní (Dawson *et al.*, 2010).

Označení „TG“ získaly páry primerů z počátečních písmen latinských rodových názvů (zebřička *Taeniopygia*, kur *Gallus*). První číslo za označením TG udává, na kterém chromozomu kura se daný lokus nachází, následující číslice označují pozici na chromozomu (v megabazích) (Dawson *et al.*, 2010).

3.3.2.2 Konzervované ptačí mikrosatelity

Dawson *et al.* (2013) se zabývali nejen charakteristikou 24 nových konzervovaných ptačích markerů (ozn. CAM; Conserved Avian Microsatellite), ale také srovnáním polymorfismu CAM s dříve objevenými TG. Tato studie tak podává důkazy o tom, že mikrosatelity získané z celogenomových sekvencí, stejně tak jako mikrosatelity získané z EST sekvencí, poskytují stejnou variabilitu alel (Dawson *et al.*, 2013).

V genomu zebřičky pestré hledali mikrosatelitní lokusy, ke kterým následně přiřadili homologní sekvence kura bankivského. 24 ze 482 sekvencí obsahovalo více než 8 repetitivních motivů u obou zmiňovaných druhů (Dawson *et al.*, 2013).

K 24 nalezeným homologním sekvencím, byly pomocí softwaru Primer 3.0 (Rozen *et Skaletsky*, 2000) navrženy páry primerů. Ty byly následně použity ke genotypizaci jedinců z 12 řádů, zahrnujících pěvce a zástupce dalších ptačích řádů. U pěvců bylo 68 % CAM lokusů polymorfních, u zástupců dalších ptačích řádů byl polymorfismus detekován pouze ve 42 % (Dawson *et al.*, 2013).

4 Materiály a metody

4.1 Biologický materiál

Pro praktickou část této bakalářské práce byly jako biologický materiál použity vzorky krve od 6 nepříbuzných jedinců pelikána bílého (*Pelecanus onocrotalus*) pocházejících ze Zoologické zahrady Dvůr Králové. Ze vzorků krve byla vedoucím bakalářské práce izolována genomická DNA, a to pomocí fenol-chloroformové metody. Výsledná koncentrace DNA po zředění TE pufrem se pohybovala v rozmezí 10–40 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$.

4.2 Chemikálie

Akrylamid (Sigma)

aTaq DNA polymeráza (5 U $\cdot\mu\text{l}^{-1}$), M1241 (Promega)

Bromfenolová modř (Serva)

Deionizovaná voda

dNTPs (100 mmol $\cdot\text{l}^{-1}$, 400 μl od každého), U1240 (Promega)

Dusičnan stříbrný (Sigma)

Ethanol - 96% roztok (Lihovar Vrbátky)

Ethylendiaminotetraoctan sodný (Na₂EDTA) (Lachner)

Formaldehyd (Lachner)

Formamid (Lachner)

Hydroxid sodný (Lachner)

Chlorid sodný (Lachema)

Kyselina boritá (Lachner)

Kyselina dusičná - 65% roztok (Lachner)

Kyselina octová (Lachner)

3 - methakryloxypropyltrimethoxysilan (Serva)

Močovina (Lachner)

N, N' - methylenbisakrylamid (AppliChem)

N, N, N', N' - tetramethylethylendiamin (TEMED) (AppliChem)

Peroxodisíran amonný (Lachner)

Rain Off - tekuté stěrače (Sheron)

Thiosíran sodný (Lachema)

Trishydroxymethylaminomethan (Tris) (AppliChem)

Uhličitan sodný (Lachner)

Xylenová modř (Xylencyanol FF) (AppliChem)

4.3 Roztoky

- **Akrylamid, 6% zásobní roztok**

420 g močoviny

484 ml deionizované vody

50 ml 10x TBE

150 ml 40% zásobního roztoku akrylamidu : N, N' - methylenbisakrylamid (19:1)

- **Dusičnan stříbrný, 0,1% roztok**

800 ml deionizované vody

0,8 g dusičnanu stříbrného

Před použitím přidat 1,2 ml formaldehydu

- **Fix/stop roztok**

800 ml deionizované vody

88 ml ledové kyseliny octové

- **Molekulární lepidlo**

1 ml 0,5% kyseliny octové v 96% ethanolu

3 μ l 3 - methakryloxypropyltrimethoxysilanu

- **Nanášecí pufr**

0,125 g bromfenolové modři

0,125 g xylenové modři

25 ml deionizované vody

100 ml formamidu

- **Hydroxid sodný, roztok 1 mol·l⁻¹**

40 g hydroxidu sodného

Doplňit deionizovanou vodou do 1 l

- **Peroxodisíran amonný, 10% roztok**

1 g peroxodisíranu amonného

Rozpustit v 10 ml deionizované vody

Uchovávat v ledničce

- **Polyakrylamidový gel, 6% roztok**

60 ml 6% zásobního roztoku akrylamidu

40 μl N, N, N', N' - tetramethylethylendiaminu

400 μl 10% roztoku peroxodisíranu amonného

- **Reakční pufr, 10 x**

1,211 g trishydroxymethylaminomethanu

80 ml deionizované vody

pH upravit pomocí HCl na hodnotu 9,0

3,73 g KCl

1 ml Triton X-100

Rozpustit a doplnit do 100 ml

- **TBE pufr, 10x zásobní roztok**

108 g trishydroxymethylaminomethanu

55 g kyseliny borité

40 ml roztoku Na_2EDTA $0,5 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$, pH 8,0

Doplnit deionizovanou vodou na 1 l

- **Vývojka**

800 ml deionizované vody

24 g uhličitanu sodného

Uchovávat v ledničce ($4 \text{ }^\circ\text{C}$)

Před použitím přidat 1,2 ml formaldehydu a 160 μl 1% roztoku thiosíranu sodného

4.4 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 Finnpiette 0,5–10 μl (osmikanálová) (Thermo Labsystems)

Mikropipety Finnpiette 0,3 μl –1 ml (Thermo Labsystems)

Mikropipety Nichipet EX 0,5 μl –1 ml (Nichiryo)

Minicentrifuga CLE CSQSP (Clevaer Scientific)

Minicentrifuga Prism mini (Labnet International)

Negatoskop NEGA1 (Maneko)

Sekvenační elektroforetická komůrka S2 (Whatman Biometra)

Spektrofotometr NanoDrop ND-1000 (Thermo Scientific)

Sušárna CAT 8050 (Contherm)

Termocykler GenePro (BIOER Technology)

Termocykler PTC 100-96 VHB (MJ Research)

Termocykler GenePro (BIOER Technology)

Třepačka Orbit 1 900 (Labnet International)

Vortex mixer (Labnet International)

Vortex MS2 (Ika)

Výrobník deionizované a ultračisté vody typ 02 (AquaOsmotic)

Výrobník ledu Icematic F100 Compact (Castel Mac)

4.5 PCR amplifikace mikrosatelitů

Genomická DNA 6 nepříbuzných jedinců pelikána bílého byla postupně amplifikována 173 páry primerů – 60 páry primerů pro amplifikaci univerzálních ptačích mikrosatelitů a 113 páry primerů pro amplifikaci mikrosatelitů od ptáků z řádu tučňáci (tabulka č. 2 a tabulka č. 3).

Tabulka č. 2: Seznam testovaných mikrosatelitních lokusů pocházejících z řádu tučňáci.

Druh	Název mikrosatelitního 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
	Emm1, Emm2, Emm3, Emm4, Emm5, Emm6, Emm7, Emm8	Billing <i>et al.</i> , 2007
Tučňák nejmenší (<i>Eudyptula minor</i>)	Em1, Em2, Em4, Em5, Em6.2, Em8, Em9, Em12.2, Em13, Em14, Em15, Em21, Em22, Em23, Em24, Em26, Em27, Em28, Em29.2, Em30	Grosser <i>et Waters</i> , 2015
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

Tabulka č. 2: Pokračování.

Druh	Název mikrosatelitního lokusu	Literární zdroj
Tučňák uzdičkový (<i>P. antarctica</i>)	Pygantarc02, Pygantarc03, Pygantarc06, Pygantarc07, Pygantarc11, Pygantarc15, Pygantarc16, Pygantarc18, Pygantarc19, Pygantarc22, Pygantarc24, Pygantarc25, Pygantarc26, Pygantarc27, Pygantarc38, Pygantarc29	Kang <i>et al.</i> , 2015
Tučňák Humboldtův (<i>S. humboldti</i>)	Sh1Ca9, Sh1Ca12, Sh1Ca16, Sh1Ca17, Sh2Ca12, Sh2Ca21, Sh2Ca22 Sh2Ca31, Sh2Ca40, Sh2Ca49, Sh2Ca55, Sh2Ca58	Schlosser <i>et al.</i> , 2003 Schlosser <i>et al.</i> , 2009
Tučňák magellanský (<i>S. magellanicus</i>)	H2-6 M1-11	Akst <i>et al.</i> , 2002
Tučňák galapážský (<i>S. mendiculus</i>)	G2-2, G3-6, G3-11	
Tučňák brýlový (<i>S. demersus</i>)	B2-2 PNN01, PNN03, PNN05, PNN06, PNN07, PNN08, PNN09, PNN12	Labuschagne <i>et al.</i> , 2013

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

Zdroj	Název mikrosatelitního lokusu	Literární zdroj
EST ptačí 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, TG06-046, TG05-053, TG06-009, TG07-022, TG08-024 (1), TG08-024 (2), TG09-014, TG11-011, TG12-015, TG13-009, TG13-016 TG13-017, TG22-001	Dawson <i>et al.</i> , 2010

Tabulka č. 3: Pokračování.

Zdroj	Název mikrosatelitního lokusu	Literární zdroj
Konzervované ptačí mikrosatelity	CAM01, CAM02, CAM03, CAM04, CAM05, CAM06, CAM07, CAM08, CAM09, CAM10, CAM11, CAM12, CAM13, CAM14, CAM15, CAM16, CAM17, CAM18, CAM19, CAM20, CAM21, CAM22, CAM23, CAM24	Dawson <i>et al.</i> , 2013

Postup PCR amplifikace:

1. Jednotlivé reagensie PCR mixu (tabulka č. 4) nechat rozmrazit, následně pak zvortexovat a zcentrifugovat.
2. Do 1,5ml mikrozkušavky připravit PCR mix, opět zvortexovat a zcentrifugovat.
3. Nachystat 6 mikrozkušavek (0,2ml), do každé napipetovat po 1 μ l genomické DNA 6 nepříbuzných jedinců pelikána bílého, poté do každé přidat 9 μ l PCR mixu.

Tabulka č. 4: Složení PCR mixu pro 6 vzorků.

Reagensie	Objem [μ l]
Deionizovaná voda	44,4
Reakční pufr 10x	6,7
Roztok $MgCl_2$ (25 $mmol \cdot l^{-1}$)	4,0
Roztok dNTPs (20 $\mu mol \cdot l^{-1}$)	0,7
Primer F (10 $\mu mol \cdot l^{-1}$)	3,3
Primer R (10 $\mu mol \cdot l^{-1}$)	3,3
<i>aTaq</i> polymeráza (5 $U \cdot \mu l^{-1}$)	1,0

4. PCR mikrozkušavky uzavřít a umístit do termocykleru, nastavit teplotní a časový program (tabulka č. 5). Pro první testování použít základní teplotu *annealingu* 50 °C. Pro následnou optimalizaci PCR podmínek tuto teplotu upravit (snížit/zvýšit). Vysvětlení změny teploty *annealingu* v kapitole Výsledky.

Tabulka č. 5: Základní teplotní a časový rozpis PCR reakce.

1.	94 °C	5 min	1x
2.	94 °C	30 s	
	50 °C	30 s	35x
	72 °C	30 s	
3.	72 °C	7 min	1x

4.6 Elektroforetická separace

Pro elektroforetickou separaci byl použit denaturující 6% polyakrylamidový gel, který byl nalit mezi malé (330 x 390 mm) a velké (330 x 420 mm) sklo. Tloušťka gelu byla 0,4 mm. Separace probíhala v sekvenační elektroforetické komůrce S2 Whatman Biometra.

1. Plochu velkého a malého skla omýt saponátem s použitím kartáče a opláchnout deionizovanou vodou. Plochu obou skel osušit papírovými utěrkami a ošetřit 2x 96% ethanolem.
2. Na plochu velkého skla nanést přípravek pro odpuzování vody (Rain Off). Po zaschnutí omýt 2x deionizovanou vodou a osušit papírovými utěrkami.
3. Malé sklo umístit do digestoře na polystyrenovou podložku a připravit si molekulární lepidlo. Plochu malého skla, ke které přilne gel, ošetřit molekulárním lepidlem. Po zaschnutí umýt 4x 96% ethanolem.
4. Velké sklo položit v digestoři na polystyrenovou podložku, a to ošetřenou plochou skla nahoru. Na dva delší okraje umístit spacers s gumami a překrýt malým sklem ošetřenou plochou dolů. Spacers zarovnat podél okrajů skla a gummy zarovnat k hornímu okraji skla malého. V místě spacerů sepnout okraje skel pomocí klipsů.
5. V kádince připravit 6% roztok polyakrylamidového gelu a opatrně jej promíchat, následně jej nalít mezi připravená skla tak, aby vyplnil všechny prostor mezi nimi.
6. Do prostoru mezi velkým a malým sklem zasunout rovnou stranou hřebínek asi 5 mm hluboko. Toto místo sepnout čtyřmi klipsy a nechat minimálně hodinu polymerizovat a tuhnout.
7. Klipsy odstranit a připravená skla s gelem omýt deionizovanou vodou s použitím kartáče od zbytků polyakrylamidu. Vnější plochu malého skla osušit papírovými utěrkami do sucha.
8. Skla s gelem umístit do sekvenační elektroforetické komůrky tak, aby se plocha malého skla dotýkala hliníkové desky a hřebínek byl umístěn nahoře. Skla upevnit šrouby a prostor katody a anody zalít 0,5x TBE pufrem. Vyjmout hřebínek a vzniklý prostor po hřebínku vyčistit za pomoci injekční stříkačky od případných zbytků gelu a vzduchových bublin.
9. Prostor katody a anody uzavřít a připojit k nim zdroj stejnosměrného elektrického proudu. Hodnotu výkonu nastavit na 90 W, hodnotu elektrického napětí nastavit na 3 000 V a hodnotu elektrického proudu nastavit na 150 mA. Gel nechat za těchto podmínek nahřívát po dobu 30 minut.

10. V průběhu nahřívání gelu připravit vzorky. Do každé zkumavky s předem připraveným vzorkem napipetovat 5 μ l nanášecího pufru. Před nanesením vzorků do gelu je nechat zdenaturovat po dobu 3 minut v termocykleru (94 °C). Následně vzorky umístit na ledovou tříšť, aby nedošlo k renaturaci.
11. Během denaturace vzorků odpojit přívod stejnosměrného elektrického proudu. Prostor pro hřebínek opět vyčistit pomocí injekční stříkačky s 0,5x pufrem, a tím odstranit zbytky močoviny a polyakrylamidu. Do prostoru mezi skly zasunout zoubky hřebínku asi 1 mm hluboko do gelu.
12. Pomocí osmikanálové pipety nanést do gelu vždy po 2 μ l každého vzorku.
13. Prostor katody uzavřít a opět připojit ke zdroji stejnosměrného elektrického proudu. Hodnotu výkonu snížit na 70 W, hodnoty elektrického napětí a proudu ponechat na 3 000 V a 150 mA.
14. Za těchto podmínek nechat vzorky separovat po dobu 1,5–3 hodiny.
15. V průběhu elektroforetické separace připravit fix/stop roztok, 1% roztok kyseliny dusičné, 0,1% roztok AgNO₃ a vývojku. Vývojku umístit do ledničky a nechat vychladit na teplotu 4 °C, 0,1% roztok AgNO₃ umístit do temna.
16. Po uplynutí doby elektroforetické separace vzorků vypnout zdroj stejnosměrného elektrického proudu, odpojit elektrody a povolit šroub ke kanálu odtoku pufru z katodového prostoru do spodní sběrné misky. Skla s gelem položit na misku otočenou dnem vzhůru a vytáhnout spacersy. Za pomoci čepele nože od sebe skla oddělit.
17. Malé sklo s gelem na horní straně vložit do fotomisky umístěné na třepačce a zalít jej fix/stop roztokem. Roztok nechat působit minimálně 20 minut, poté jej slít zpět do baňky. Fotomisku s gelem naplnit 1–1,5 l deionizované vody a promývat po dobu 2 minut. Tento postup promývání opakovat celkem 3x.
18. Fotomisku s gelem opět umístit na třepačku, zalít roztokem 1% HNO₃ a nechat působit 4 minuty. Roztok slít do odpadu, fotomisku s gelem opět naplnit deionizovanou vodou a 4x promýt.
19. Sklo s gelem přemístit do čisté fotomisky a zalít 0,1% roztokem AgNO₃ s předem přidanými 1 200 μ l formaldehydu. Roztok nechat působit minimálně 30 minut, poté jej slít zpět do láhve. Sklo s gelem opláchnout v předem připravené fotomisce s deionizovanou vodou po dobu několika vteřin a následně jej přemístit do čisté fotomisky umístěné na třepačce.

20. Do předem vychlazené vývojky napipetovat 1 200 μl formaldehydu a 160 μl 1% roztoku $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ a takto připraveným roztokem zalít fotomisku s gelem.
21. Po dostatečném zbarvení proužků PCR produktů přilít uchovaný fix/stop roztok, a tím zastavit dobarvování. Po ukončení úniku vyvíjejících se bublinek CO_2 přemístit sklo s gelem do fotomisky s deionizovanou vodou.
22. Po dvou minutách nechat gel okapat a podepsat jej fixem v místě, kde byl dříve spacer. Sklo s gelem umístit do sušárny na dobu 60 minut ($60\text{ }^\circ\text{C}$).
23. Suchý gel vyhodnotit na negatoskopu a následně naskenovat do PC.
24. Sklo s vyhodnoceným gelem ponořit na několik hodin do roztoku NaOH o koncentraci $1\text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ a nechat gel odlepit. Sklo následně umýt saponátem s použitím kartáčku a opláchnout deionizovanou vodou.

5 Výsledky

V rámci mé bakalářské práce jsem za použití metody *cross-species* PCR amplifikace hledala polymorfní mikrosatelitní lokusy u pelikána bílého (*Pelecanus onocrotalus*). Na 6 nepříbuzných jedincích pelikána bílého jsem testovala 173 párů primerů pro druhy z řádu tučňáci a pro univerzální ptačí mikrosatelity. Z celkového počtu 147 objevených a popsáných mikrosatelitů pro druhy z řádu tučňáci jsem testovala pouze 113, jelikož pro zbylé mikrosatelity, které byly objeveny a popsány týmem Vianna *et al.* (2017), nebyly primery v době testování v laboratoři k dispozici. Následně jsem testovala 60 párů primerů navržených pro amplifikaci univerzálních ptačích mikrosatelitů (24 párů primerů pro amplifikaci konzervovaných ptačích mikrosatelitů a 36 párů primerů pro amplifikaci EST ptačích mikrosatelitů).

Nejdříve jsem provedla *cross-species* PCR amplifikaci všech 173 mikrosatelitů při teplotě *annealingu* 50 °C. Následně jsem PCR vzorky nanasla do 6% polyakrylamidového gelu a nechala je separovat po dobu 90 minut. Po následném vyhodnocení jsem podmínky (složení PCR mixu/množství naneseného vzorku do gelu/délky separace) optimalizovala, aby bylo možné mikrosatelit vygenotypovat. V případě, že se na gelu, po prvním testování, neobjevil žádný PCR produkt, snížila jsem teplotu *annealingu* při další PCR na 48 °C. Pokud ani při této teplotě nedošlo k amplifikaci mikrosatelitního lokusu, snížila jsem teplotu *annealingu* až na 44 °C. Pokud byl PCR produkt velmi výrazný a nebylo u něj možno rozlišit počet alel, zvýšila jsem teplotu *annealingu* postupně až na 68 °C.

U čtyř mikrosatelitů jsem snížila koncentraci hořčnatých iontů na polovinu, u tří mikrosatelitů jsem snížila koncentraci hořčnatých iontů na $\frac{3}{4}$. Z důvodu velké molekulové hmotnosti jsem u 6 mikrosatelitů musela prodloužit dobu separace na 120 minut, u jednoho mikrosatelitu na 150 minut a u čtyř mikrosatelitů na 180 minut. U dvou mikrosatelitů (Em21 a Ech008) jsem nanášela do gelu pouze 1 μ l vzorku, jelikož při teplotě *annealingu* 68 °C byly PCR produkty po separaci v gelu velmi výrazné a špatně hodnotitelné, ale při vyšší teplotě *annealingu* (69 °C) už k amplifikaci nedocházelo.

U tří testovaných mikrosatelitů (Ech130, Emm4 a Man22) se mi nepodařilo PCR produkt získat vůbec, u zbylých 170 mikrosatelitů PCR produkt vznikl. 34 párů primerů amplifikovalo celkem 35 polymorfních mikrosatelitních lokusů a jejich charakteristika je uvedena v tabulce č. 6. Zbylých 136 mikrosatelitních lokusů bylo monomorfních.

Tabulka č. 6: Charakteristika 34 párů primerů a jimi amplifikovaných 35 polymorfních mikrosatelitních lokusů na 6 nepříbuzných jedincích pelikána bílého. Společně s názvem lokusu je v tabulce uvedeno jeho identifikační číslo v databázi GenBank, zdrojový druh, sekvence primerů, repetitivní motiv, teplota *annealingu* (T_a), délka elektroforetické separace (t_s) a počet alel (N).

Zdrojový druh	Lokus (GenBank Acc. no.)	Sekvence primerů (5' → 3')	Repetitivní motiv	T_a [°C]	t_s [min]	N
Tuňák žlutorohý (<i>E. chrysolophus</i>)	Ech008 (FM878339)	F: TGGGAAGCGTAACGGCCTAA R: TCAGTCACTCTCCCATTGTTAGGG	CA	67	90	2
	Ech011 (FM878342)	F: CACAGCACTGTGACAGAAGCA R: TTAAGTGGTTCGATTGTCAGTCTTT	GT	67	90	2
	Ech039 (FM878370)	F: TCTTCCCAGGCAAGGAATAAC R: CTCTGACTAATTGCTAAGAAATACTCCTG	TTTCT	51	90	3
	Ech060 (FM878391)	F: CATGTTGGGTTGCAGAAGC R: AACAGACTGTAACACTATCAAGGTATATCATC	TG	64	90	2
	Ech113 (FM878444)	F: TGTGTTTACATTCAATCCATCAATGC R: GCAGGTAGGAACATTAAGTGAACCTTG	GT	62	180	2
Tučňák nejmenší (<i>E. minor</i>)	Emm5 * (DQ837733)	F: ATTAAGTGGCCTTGGGTTTC R: TTTATGCTCCCTCATTCCAC	CTTT	53	90	2
	Emm6 (DQ837734)	F: TTGTTGGTCTGTATCACAAGG R: CAGGGAAGTGTGAGTAAATGG	CT	61	90	2
	Em8 (KM272226)	F: GGTGCTGGGAGATGGCTTC R: ACGAAATGGTTTGGCTGGTG	AGAT	67	90	5
	Em14 (KM272230)	F: CAGGAGTGAACCCAAAGCTG R: AGGTACCGAGGAAGCAAAG	CAA	66	90	2

Tabulka č. 6: Pokračování 1.

Zdrojový druh	Lokus (GenBank Acc. no.)	Sekvence primerů (5' → 3')	Repetitivní motiv	T _a [°C]	t _s [min]	N
Tučňák nejmenší (<i>E. minor</i>)	Em21 (KM272232)	F: CCACATTCATCCACAGGCAG R: CCTCGCAGGGAATATTTGGC	CT	67	90	2
	Em23 (KM272234)	F: GATGCATGTGGAGGAAGTGC R: GGCAACATGGTAGCTGACAC	CA	56	90	2
Tučňák kroužkový (<i>P. adeliae</i>)	AM13 (AF131243)	F: TTTTCCCATCTCTCTCCTG R: CAGTTTTCAACAATCCTTCC	GT/GC	61	90	2
Tučňák brýlový (<i>S. demersus</i>)	PNN05 (JX494405)	F: CAGTGACAGGCAAGGGTCTTAT R: TGAGTAAGCAATGAGTTGGCAC	TG	65	180	2
Tučňák Humboldtův (<i>S. humboldti</i>)	Sh2Ca21* (AF540011)	F: AAAATAAAGCCTATACACAACAGG R: GTGCACTTAATGGGGTGTATG	CA	56	90	2
	Sh2Ca49 (AY435089)	F: GCTTTTCCACCAGCTCTTCC R: TTCTGTTCAAAGCGTGGTTG	CA	64	90	2
Tučňák magellanský (<i>S. magellanicus</i>)	M1-11 (neuvejeno)	F: CTCGTTCTAGCCTTCTGTTCC R: AGCCCAGTCTTCACAACACTGC	TG	57	90	2
Tučňák uzdičkový (<i>P. antarctica</i>)	Pygantarc11 (KP316215)	F: GGGGGAGTGCATATCAGAAA R: CATCAAAGAATTCGCCTTGG	AT	61	90	2
	Pygantarc19 (KP316219)	F: GTATTCCCATGCAGGCTTTG R: CAAGCGTGTTTTTGTTTGCT	ACAGAT	66	120	2

Tabulka č. 6: Pokračování 2.

Zdrojový druh	Lokus (GenBank Acc. no.)	Sekvence primerů (5' → 3')	Repetitivní motiv	T _a [°C]	t _s [min]	N
EST ptačí mikrosatelity	TG01-114 (CK301583)	F: TTGAAACATTGTGAAGCAG R: CAGATAGTGTGCATAACAATACTTTTC	AT/AA	61	120	2
	TG01-148 (CK301512)	F: TTGCAACACATTCTAATATTGC R: TTAAAGTACATCAAACAACAAAATC	AT/AA	50	90	2
	TG03-031 (CK312587)	F: ATTGCACATGAACCTGGAAG R: TCATTACTTGAAGCAGGTCTCTG	AT/TT	64	180	2
	TG03-098 (DV573670)	F: TTTGCCTTAATTCTTACCTCATTG R: TTGCAACCTCTGTGGAAGC	AG/AA	65	120	2
	TG04-012** (CK306810)	F: TGAATTTAGATCCTCTGTTCTAGTGTC R: TTACATGTTTACGGTATTTCTCTGG	GT/CT	61	120	4
	TG04-061* (CK235034)	F: GACAATGGCTATGAAATAAATTAGGC R: AGAAGGGCATTGAAGCACAC	A/GA	60	120	3
	TG08-24(1) (CK314428)	F: CCCACAAATCCTGAATTTTCATATC R: ACTGGCTTATAAAGTCCATGGTGG	AT/AG/AA	66	90	3
	TG13-016 (CK308822)	F: GATTGCTGAGGCTTGATTGC R: GCCTACGGCTTTATTTTACTTGC	A/C/AA/CA/GA	54	90	2+2
	TG13-017 (CK313422)	F: GCTTTGCATCTTGCCTTAAA R: GGTAACACTACAACATTCCAACCTCCT	AT	63	180	3

Tabulka č. 6: Pokračování 3.

Zdrojový druh	Lokus (GenBank Acc. no.)	Sekvence primerů (5' → 3')	Repetitivní motiv	T _a [°C]	t _s [min]	N
Konzervované ptačí mikrosatelity	CAM03 (HG518761)	F: ATTAGCATAGCTCAGCATTGCC R: CGAGCATTCAAMCCTGTCATC	TG	68	90	2
	CAM05** (HG518763)	F: TTACACAGACTGCAAACCGC R: CTGTTKCTCTAGTAATGAGATCCTG	CA	64	150	2
	CAM11 (HG518769)	F: TGGTACAGGGACAGCAAACC R: AGATGCTGRGAGCGGATG	GT	67	90	3
	CAM17* (HG518775)	F: CGGGTTGTAATCAAGAAGATGC R: CTGCGGAGCAATTAACGC	TG	54	90	2
	CAM19 (HG518777)	F: TCTTGGAGGCAGATARGAAGTG R: GAGCAAGCAAAGATCACAAGC	GT	68	120	2
	CAM20** (HG518778)	F: TAACAGGCAGGAATGCAGG R: TCAGCCAGTGTTGGAGGTC	AT	52	90	2
	CAM23 (HG518781)	F: CTCCACTTAGCTTGTAATGGCAC R: CCAAGRAGTGCCCTAGATGTC	TG	67	90	2

Symbol * značí snížení koncentrace MgCl₂ v PCR mixu na ½, ** značí snížení koncentrace MgCl₂ v PCR mixu na ¾.

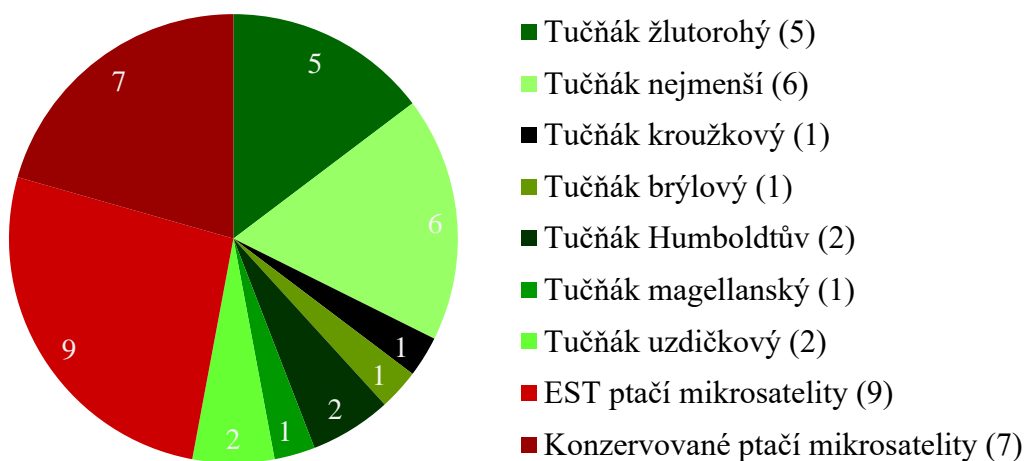
Šest nepříbuzných jedinců pelikána bílého (*Pelecanus onocrotalus*) jsem, prostřednictvím *cross-species* PCR amplifikace, testovala na přítomnost polymorfismu. Z celkového počtu 173 párů primerů poskytlo 34 párů primerů celkem 35 polymorfních lokusů, protože u jednoho lokusu (TG13-016) se vyskytovala dvě místa polymorfismu. Úspěšnost nalezení páru primerů amplifikujícího polymorfní produkt je 19,65 %.

18 párů primerů pocházelo od zástupců z řádu tučňáci – pět párů primerů bylo navrženo pro tučňáka žlutorohého, šest párů primerů pro tučňáka nejmenšího, po dvou párech primerů pro tučňáka Humboldtova a t. uzdičkového a po jednom páru primerů pro tučňáka kroužkového, t. brýlového a t. magellanského. Úspěšnost nalezení polymorfních lokusů amplifikovaných prostřednictvím jednotlivých párů primerů pocházejících od vybraných druhů z řádu tučňáci byla 15,93 %. Polymorfní produkty vykazovaly 2, 3 nebo 5 alel na lokus.

16 párů primerů pocházelo od univerzálních ptačích mikrosatelitů – 9 párů primerů bylo navrženo pro EST ptačí mikrosatelity a 7 pro konzervované ptačí mikrosatelity. Jeden pár primerů, navržený pro lokus TG13-016, nasedal na dvě různá místa v genomu, a proto jsem při vyhodnocení produktu našla dvě místa polymorfismu. Celková úspěšnost nalezení polymorfních produktů amplifikovaných páry primerů navržených pro univerzální ptačí mikrosatelity byla 26,67 %. Polymorfní produkty vykazovaly od 2 do 4 alel.

Zastoupení jednotlivých polymorfních mikrosatelitů (dle zdrojového druhu) je znázorněno v grafu č.1.

Graf č. 1: Rozdělení 34 párů primerů amplifikující polymorfní mikrosatelitní lokus u 6 nepříbuzných jedinců pelikána bílého dle zdrojového druhu s uvedením počtů jednotlivých mikrosatelitů. Odstíny zelené znázorňují mikrosatelity z řádu tučňáci, odstíny červené znázorňují univerzální ptačí mikrosatelity.



U 35 polymorfních mikrosatelitních lokusů amplifikovaných 34 páry primerů se nejčastěji vyskytovaly 2 alely na lokus. U 5 mikrosatelitních lokusů se vyskytovalo po třech alelách, u jednoho mikrosatelitu byly detekovány 4 alely, u jiného 5 alel.

Po optimalizaci složení PCR mixu, množství nanesení vzorku do gelu nebo prodloužení délky separace, byla provedena genotypizace jednotlivých polymorfních lokusů. Genotypy 35 polymorfních mikrosatelitních lokusů, které byly amplifikovány 34 páry primerů, jsou uvedeny v tabulce č. 7.

Tabulka č. 7: Genotypy 35 polymorfních mikrosatelitů amplifikovaných 34 páry primerů u 6 nepříbuzných jedinců pelikána bílého. Spolu s genotypy je v tabulce uveden název polymorfního mikrosatelitního lokusu, zdrojový druh a počet alel (N).

Zdrojový druh	Lokus	N	Genotypy
Tuňák žltorohý (<i>E. chrysolophus</i>)	Ech008	2	$1/1$ $1/2$ $1/1$ $1/1$ $1/2$ $1/1$
	Ech011	2	$2/2$ $2/2$ $1/1$ $2/2$ $2/2$ $2/2$
	Ech039	3	$1/2$ $1/2$ $1/1$ $1/2$ $1/3$ $1/3$
	Ech060	2	$1/2$ $2/2$ $2/2$ $1/2$ $2/2$ $2/2$
	Ech113	2	$1/2$ $1/1$ $1/1$ $1/2$ $2/2$ $2/2$
Tučňák nejmenší (<i>E. minor</i>)	Emm5	2	$2/2$ $1/2$ $1/2$ $2/2$ $1/2$ $1/1$
	Emm6	2	$2/2$ $2/2$ $1/1$ $2/2$ $1/1$ $1/1$
	Em8	5	$2/3$ $1/3$ $1/5$ $2/3$ $2/3$ $3/4$
	Em14	2	$1/2$ $2/2$ $2/2$ $1/2$ $2/2$ $2/2$
	Em21	2	$1/2$ $1/2$ $1/1$ $1/2$ $1/1$ $1/1$
Em23	2	$1/1$ $2/2$ $2/2$ $1/2$ $2/2$ $2/2$	
Tučňák kroužkový (<i>P. adeliae</i>)	AM13	2	$2/2$ $1/2$ $2/2$ $2/2$ $1/2$ $1/2$
Tučňák brýlový (<i>S. demersus</i>)	PNN05	2	$2/2$ $2/2$ $2/2$ $2/2$ $2/2$ $1/2$
Tučňák Humboldtův (<i>S. humboldti</i>)	Sh2Ca21	2	$1/2$ $2/2$ $2/2$ $1/2$ $2/2$ $2/2$
	Sh2Ca49	2	$2/2$ $1/2$ $1/1$ $2/2$ $2/2$ $2/2$
Tučňák magellanský (<i>S. magellanicus</i>)	M1-11	2	$2/2$ $2/2$ $2/2$ $1/2$ $2/2$ $2/2$
Tučňák uzdičkový (<i>P. antarctica</i>)	Pygantarc11	2	$2/2$ $1/2$ $2/2$ $2/2$ $1/2$ $1/2$
	Pygantarc19	2	$1/1$ $2/2$ $1/1$ $1/2$ $1/1$ $2/2$
EST ptačí mikrosatelity	TG01-114	2	$1/1$ $1/2$ $1/1$ $1/1$ $1/1$ $1/2$
	TG01-148	2	$2/2$ $1/2$ $2/2$ $2/2$ $2/2$ $1/1$
	TG03-031	2	$1/1$ $1/1$ $1/2$ $1/2$ $1/1$ $1/1$
	TG03-098	2	$2/2$ $2/2$ $1/1$ $1/2$ $1/2$ $1/2$
	TG04-012	4	$3/4$ $2/3$ $1/4$ $3/4$ $2/3$ $2/3$
	TG04-061	3	$2/2$ $1/1$ $3/3$ $2/3$ $1/2$ $1/3$
	TG08-024 (1)	3	$1/1$ $1/3$ $1/2$ $1/1$ $1/1$ $1/1$
	TG13-016	2+2	$1/2$ $1/1$ $1/1$ $1/2$ $1/1$ $1/1$ $1/2$ $1/2$ $1/2$ $1/2$ $1/1$ $1/1$
	TG13-017	3	$1/2$ $2/3$ $1/3$ $1/3$ $2/3$ $2/3$

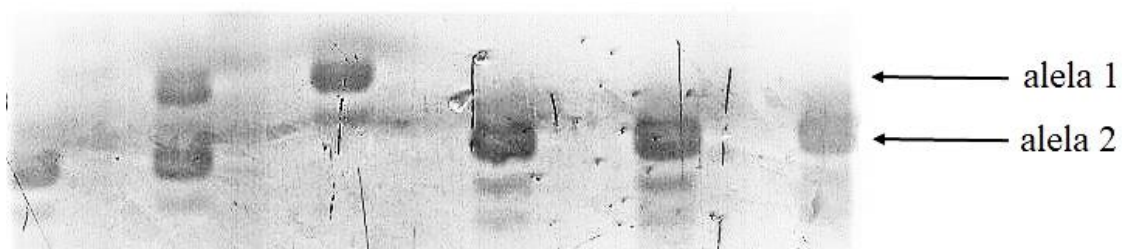
Tabulka č. 7: Pokračování.

Zdrojový druh	Lokus	N	Genotypy
Konzervované ptačí mikrosatelity	CAM03	2	$1/1$ $1/1$ $1/1$ $1/1$ $1/2$ $1/2$
	CAM05	2	$1/1$ $1/1$ $1/1$ $2/2$ $1/1$ $1/2$
	CAM11	3	$1/2$ $3/3$ $2/2$ $2/2$ $2/2$ $2/2$
	CAM17	2	$2/2$ $1/1$ $1/1$ $2/2$ $1/1$ $2/2$
	CAM19	2	$1/2$ $1/1$ $1/1$ $1/1$ $1/1$ $1/1$
	CAM20	2	$2/2$ $1/2$ $1/2$ $2/2$ $2/2$ $1/2$
	CAM23	2	$1/2$ $1/1$ $2/2$ $1/1$ $1/1$ $1/1$

Na následujících obrázcích jsou znázorněny výsledky elektroforetické separace PCR produktů, které jsem získala *cross-species* PCR amplifikací u 6 nepříbuzných jedinců pelikána bílého. Vybrala jsem mikrosatelitní lokusy Ech039 (obrázek č. 5), Sh2Ca49 (obrázek č. 6), TG01-148 (obrázek č. 7) a TG03-098 (obrázek č. 8).



Obrázek č. 5: Elektroforetogram polymorfního mikrosatelitního lokusu Ech039. U 6 nepříbuzných jedinců pelikána bílého byly detekovány 3 alely, které jsou označeny šipkami. Teplota *annealingu* byla 51 °C, délka elektroforetické separace byla 90 minut.



Obrázek č. 6: Elektroforetogram polymorfního mikrosatelitního lokusu Sh2Ca49. U 6 nepříbuzných jedinců pelikána bílého byly detekovány 2 alely, které jsou označeny šipkami. Teplota *annealingu* byla 64 °C, délka elektroforetické separace byla 90 minut.



Obrázek č. 7: Elektroforetogram polymorfního mikrosatelitního lokusu TG01-148. U 6 nepříbuzných jedinců pelikána bílého byly detekovány 2 alely, které jsou označeny šipkami. Teplota *annealingu* byla 50 °C, délka elektroforetické separace byla 90 minut.



Obrázek č. 8: Elektroforetogram polymorfního mikrosatelitního lokusu TG03-098. U 6 nepříbuzných jedinců pelikána bílého byly detekovány 2 alely, které jsou označeny šipkami. Teplota *annealingu* byla 65 °C, délka elektroforetické separace byla 120 minut.

Mimo dobře hodnotitelné mikrosatelity se vyskytovaly také velmi problematicky hodnotitelné mikrosatelitní lokusy, kam patří například CAM05 a TG04-061, které bych pro populační analýzu vůbec nedoporučovala.

6 Diskuse

V praktické části mé bakalářské práce jsem se zabývala hledáním polymorfních lokusů pomocí *cross-species* PCR amplifikace. 173 párů primerů jsem testovala na genomické DNA šesti nepříbuzných jedinců pelikána bílého. Z nich 113 párů primerů bylo navrženo pro amplifikaci mikrosatelitů pocházejících od 9 druhů tučňáků, 36 párů primerů bylo navrženo pro amplifikaci EST ptačích mikrosatelitů a 24 párů primerů bylo navrženo pro amplifikaci konzervovaných ptačích mikrosatelitů. Celkem u 18 mikrosatelitů, izolovaných od 7 druhů tučňáků, byl detekován polymorfní produkt. Amplifikací 16 univerzálních ptačích mikrosatelitů se mi podařilo získat 17 polymorfních produktů, protože jeden pár primerů (TG13-016) poskytl dva polymorfní produkty.

Testovala jsem 25 párů primerů navržených pro tučňáka žlutorohého a u 6 nepříbuzných jedinců pelikána bílého jsem našla 5 polymorfních lokusů. Těchto pět lokusů testovali Ahmed *et al.* (2009) při jednotné teplotě *annealingu* (T_a) 60 °C na DNA 22–28 jedinců tučňáka žlutorohého. U mikrosatelitního lokusu Ech008 našli autoři 4 alely. Já jsem tento mikrosatelit amplifikovala při T_a 67 °C a našla jsem 2 alely. U mikrosatelitu Ech011 našli 8 alel, já jsem při T_a 67 °C našla 2 alely. U mikrosatelitu Ech039 našli 25 alel, já jsem amplifikací při T_a 51 °C získala polymorfní produkt se 3 alelami. U lokusu Ech060 našli 4 alely, já jsem při T_a 64 °C detekovala 2 alely. U lokusu Ech113 se vyskytovalo 7 alel, já jsem při T_a 62 °C našla 2 alely.

Testováním 28 párů primerů pocházejících od tučňáka nejmenšího jsem našla celkem 6 polymorfních lokusů. Při testování lokusu Emm5 na DNA 28 jedinců tučňáka nejmenšího pocházejících z Filipova ostrova a DNA 15 jedinců pocházejících z Troubridgeova ostrova, detekovali Billing *et al.* (2007) 11 a 8 alel. Teplota *annealingu* byla 58 °C. Já jsem při T_a 53 °C našla 2 alely. Lokus Emm6 byl polymorfní jak na DNA 21 jedinců tučňáka nejmenšího z Filipova ostrova, tak na DNA 13 jedinců z Troubridgeova ostrova. Při T_a 56 °C našli 3 a 2 alely na lokus. Já jsem 2 alely detekovala při T_a 60 °C. Z 20 lokusů, které popsali Grosser *et Waters* (2015) jsem polymorfní produkt detekovala u 4 z nich. Všechny lokusy amplifikovali autoři při T_a 60 °C. U lokusu Em8 detekovali 10 alel, já jsem u tohoto lokusu detekovala při T_a 67 °C 5 alel. U lokusu Em14 detekovali 10 alel, já jsem při T_a 66 °C našla 2 alely. Na lokusu Em21 našli autoři 2 alely, já jsem při T_a 67 °C také našla 2 alely. U lokusu Em23 amplifikovali 9 alel, já jsem na DNA 6 jedinců pelikána bílého detekovala 2 alely při T_a 56 °C.

U 6 testovaných mikrosatelitů tučňáka kroužkového popsaných Roeder *et al.* (2001) jsem našla pouze jeden mikrosatelit vykazující polymorfismus. Lokus AM13 amplifikovali při T_a 50 °C a našli u něj 20 alel. Já jsem amplifikací tohoto lokusu u pelikána bílého detekovala při T_a 61 °C 2 alely.

Ve dvou pracích (Akst *et al.*, 2002, Labuschagne *et al.*, 2013) bylo u tučňáka brýlového popsáno celkem 9 mikrosatelitů. Testováním těchto mikrosatelitů na DNA 6 jedinců pelikána bílého jsem našla jediný polymorfní mikrosatelitní lokus. T_a mikrosatelitního lokusu PNN05 uvedli autoři v rozmezí 50–60 °C a detekovali u něj 2 alely. Já jsem při T_a 65 °C také našla 2 alely.

U tučňáka Humboldtova bylo ve třech pracích popsáno 13 mikrosatelitů, ty jsem testovala na DNA 6 jedinců pelikána bílého a našla jsem 2 polymorfní lokusy. Lokus Sh2Ca21 testovali Schlosser *et al.* (2003) na DNA 24 jedinců tučňáka Humboldtova. Při teplotě *annealingu* 53 °C detekovali 6 alel. Já jsem při T_a 56 °C našla 2 alely. Druhý lokus Sh2Ca49 amplifikovali Schlosser *et al.* (2009) při T_a 63 °C a našli u něj 9 alel. Já jsem při T_a 64 °C detekovala 2 alely.

Akst *et al.* (2002) charakterizovali jediný mikrosatelitní lokus pro tučňáka magellanského, který amplifikovali při T_a 53 °C. Tento lokus byl však monomorfní. Lokus M1-11 jsem na DNA pelikána bílého amplifikovala při T_a 57 °C a našla jsem 2 alely.

Kang *et al.* (2015) popsali izolaci 16 polymorfních mikrosatelitních lokusů u tučňáka kroužkového. Následné testování proběhlo na 23 jedincích stejného druhu při měnící se T_a v průběhu 42 cyklů. Prvních 7 cyklů mělo T_a 65 °C, 7 cyklů 61 °C, dalších 7 cyklů 58 °C a zbývajících 21 cyklů mělo T_a 55 °C. Po otestování všech mikrosatelitů na DNA 6 jedinců pelikána bílého jsem jako polymorfní detekovala dva. První mikrosatelit Pygantarc11 jsem amplifikovala při T_a 61 °C a detekovala jsem u něj 2 alely. U druhého mikrosatelitu Pygantarc19 jsem při T_a 66 °C identifikovala také 2 alely.

U mikrosatelitních lokusů pocházejících od dvou druhů tučňáků (t. galapážského a t. žlutookého) se mi podařilo detekovat pouze monomorfní PCR produkty.

U 6 nepříbuzných jedinců pelikána bílého jsem testovala také 60 párů primerů navržených pro amplifikaci univerzálních ptačích mikrosatelitů (36 párů primerů navržených pro amplifikaci EST ptačích mikrosatelitů a 24 párů primerů navržených pro amplifikaci konzervovaných ptačích mikrosatelitů). Prostřednictvím 9 párů primerů navržených pro EST ptačí mikrosatelity jsem našla 10 polymorfních produktů.

Cross-species PCR amplifikací s páry primerů navržených pro konzervované ptačí mikrosatelity jsem našla 7 polymorfních lokusů.

Dawson *et al.* (2010) popsali 35 mikrosatelitních lokusů, pro které bylo navrženo 36 párů primerů. Celkem jsem u pelikána bílého našla 9 polymorfních lokusů. Amplifikaci 35 polymorfních lokusů provedli autoři při jednotné T_a 56 °C na DNA 4 jedinců zebřičky pestré, jednoho jedince kura bankivského a čtyř jedinců kura domácího. U lokusů TG01-114, TG01-148 a TG04-061 našli autoři po dvou alelách u zebřičky pestré a po jedné alele u kurů. Já jsem lokus TG01-114 amplifikovala při T_a 61 °C, stejně tak jako lokus TG04-061 a lokus TG01-148 jsem amplifikovala při T_a 50 °C. U pelikána bílého jsem u dvou polymorfních lokusů (TG01-114 a TG01-148) našla po dvou alelách a na lokusu TG04-061 jsem našla 3 alely. U lokusů TG03-031, TG03-098 a TG13-017 detekovali autoři po třech alelách u zebřičky pestré a po jedné alele u kurů. Já jsem při T_a 64 °C u lokusu TG03-031 a 65 °C u lokusu TG03-098 detekovala 2 alely. Amplifikací lokusu TG13-017 jsem při T_a 63 °C detekovala 3 alely. Lokus TG04-012 obsahoval dle autorů 3 alely u zebřičky pestré, jednu alelu u kura bankivského a dvě alely u kura domácího. Já jsem u pelikána bílého zaznamenala při T_a 61 °C 4 alely. Lokus TG08-024 (1) byl dle autorů monomorfní u všech testovaných jedinců. Já jsem při T_a 66 °C našla 3 alely. Při testování pomocí *cross-species* PCR amplifikace mikrosatelitního lokusu TG13-016 detekovali autoři u zebřičky pestré a kura bankivského po jedné alele a u kura domácího detekovali 2 alely. Já jsem amplifikací tohoto lokusu při T_a 54 °C našla dvě místa polymorfismu se 2 alelami v každé oblasti. 34 mikrosatelitních lokusů bylo následně testováno *cross-species* PCR amplifikací na DNA 22 druhů ptáků (17 druhů ptáků pocházelo z řádu pěvců a 5 druhů pocházelo z jiných ptačích řádů). 33 lokusů bylo polymorfních u všech testovaných druhů ptáků.

Dawson *et al.* (2013) popsali 24 konzervovaných ptačích mikrosatelitů, které testovali při jednotné T_a 56 °C na DNA 7–12 jedinců zebřičky pestré a na DNA 2–4 jedinců kura bankivského. Já jsem pomocí *cross-species* PCR amplifikace na DNA 6 nepříbuzných jedinců pelikána bílého našla celkem 7 polymorfních mikrosatelitních lokusů. Testováním lokusu CAM03 našli autoři 11 alel u zebřičky pestré a 2 alely u kura bankivského. Já jsem u pelikána bílého našla při T_a 68 °C 2 alely. U lokusů CAM05 a CAM17 detekovali autoři 6 alel u zebřičky pestré a 2 alely u kura bankivského. Já jsem při T_a 64 °C (CAM05) a 54 °C (CAM17) našla u pelikána bílého po dvou alelách. Amplifikací lokusů CAM11, CAM19 a CAM20 našli autoři 6 alel u zebřičky pestré, u kura bankivského byly tyto lokusy monomorfní. Já jsem amplifikací lokusu CAM11

při T_a 67 °C detekovala u pelikána bílého 3 alely, u lokusu CAM19 při T_a 66 °C a lokusu CAM20 při T_a 52 °C jsem našla po dvou alelách. U lokusu CAM23 našli autoři u zebřičky pestré 5 alel, u kura bankivského byl tento lokus monomorfní. Já jsem tento lokus testovala při T_a 67 °C a našla jsem 2 alely.

V Laboratoři populační genetiky na Katedře buněčné biologie a genetiky Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého v Olomouci byly provedeny *cross-species* PCR amplifikace mikrosatelitů z řádu tučňáci a univerzálních ptačích mikrosatelitů na DNA dalších 6 druhů ptáků pocházejících z kladu *Aequorlitorornithes* (tabulka č. 8).

Pechová (2014) testovala 77 párů primerů navržených pro amplifikaci mikrosatelitů odvozených od zástupců řádu tučňáci, 34 párů primerů pro amplifikaci EST ptačích mikrosatelitů a 24 párů primerů pro amplifikaci konzervovaných ptačích mikrosatelitů. *Cross-species* PCR amplifikací na 6 jedincích nesyta indomalajského získala celkem 13 polymorfních mikrosatelitních lokusů. 9 polymorfních mikrosatelitních lokusů pocházelo od řádu tučňáci, z nichž ani jeden nebyl polymorfní u pelikána bílého. 4 mikrosatelity (Em8, Em14, Em21 a Em23), které byly polymorfní u pelikána bílého, však netestovala. Testování 34 párů primerů navržených pro amplifikaci EST ptačích mikrosatelitů byl u nesyta indomalajského detekován pouze jediný polymorfní lokus, který byl také polymorfní u 6 jedinců pelikána bílého. Pouze 2 ze 3 nalezených konzervovaných ptačích mikrosatelitů byly polymorfní zároveň u nesyta indomalajského a pelikána bílého (tabulka č. 8).

Filipová (2016) testovala, pomocí *cross-species* PCR amplifikace, 171 párů primerů navržených pro mikrosatelity z řádu tučňáci a univerzální ptačí mikrosatelity na DNA 6 nepříbuzných jedinců potápky roháče a detekovala 19 polymorfních mikrosatelitních lokusů. Šest lokusů bylo polymorfních u dvou druhů z řádu tučňáci (*t. žlutorohý* a *t. nejmenší*), osm u EST ptačích mikrosatelitů a 5 u konzervovaných ptačích mikrosatelitů. Janušová (2017) následně všechny tyto mikrosatelity charakterizovala u 13 nepříbuzných jedinců potápky roháče. Sedm z nich jsem také vyhodnotila jako polymorfní u 6 jedinců pelikána bílého (tabulka č. 8).

Šuláková (2017) hledala polymorfní lokusy *cross-species* PCR amplifikací u 6 nepříbuzných jedinců pelikána skvrnozobého. Stejně jako já testovala 113 párů primerů navržených pro amplifikaci mikrosatelitů pocházejících od 9 druhů tučňáků a 60 párů primerů navržených pro amplifikaci univerzálních ptačích mikrosatelitů. Z osmi mikrosatelitů izolovaných od druhů z řádu tučňáci, které vyhodnotila jako polymorfní,

bylo 5 taktéž polymorfních u pelikána bílého. Polymorfismus detekovala také u 6 univerzálních ptačích mikrosatelitů. Z nichž 4 byly také polymorfní u pelikána bílého (tabulka č. 8).

Zlochová (2017) našla celkem 23 polymorfních mikrosatelitních lokusů u pelikána karibského. Testovala 171 párů primerů navržených pro amplifikaci mikrosatelitů z řádu tučňáci a univerzálních ptačích mikrosatelitů. Z 16 polymorfních lokusů pocházejících od druhů z řádu tučňáci jsem jako polymorfní u pelikána bílého označila 4, ze 7 polymorfních univerzálních ptačích mikrosatelitů u pelikána karibského byly 3 polymorfní také u pelikána bílého (tabulka č. 8).

Klaclová (2018) provedla *cross-species* PCR amplifikaci se 113 páry primerů pocházejících od řádu tučňáci, 36 páry primerů navržených pro amplifikaci EST ptačích mikrosatelitů a 24 páry primerů navržených pro konzervované ptačí mikrosatelity u 6 nepříbuzných jedinců plameňáka růžového. Detekovala celkem 24 polymorfních produktů, 9 z nich bylo polymorfních také u pelikána bílého (tabulka č. 8).

Adámková (2019) získala *cross-species* testováním stejného množství mikrosatelitů jako Šuláková (2017) a Klaclová (2018) 12 polymorfních lokusů u 6 nepříbuzných jedinců pelikána afrického. Pět z dvanácti nalezených mikrosatelitů bylo polymorfních zároveň u pelikána bílého a pelikána afrického (tabulka č. 8).

Cross-species PCR amplifikace polymorfních lokusů od 9 druhů tučňáků a univerzálních ptačích mikrosatelitů byla, v porovnání s ostatními testovanými druhy z kladu Aequorlitorornithes, nejúspěšnější právě u pelikána bílého a činila 19,65 %. Dále jsem zjistila, že žádný mikrosatelitní lokus nebyl polymorfní u všech testovaných druhů ptáků z kladu Aequorlitorornithes. Nejúspěšnějším mikrosatelitem byl CAM11, který byl polymorfní u 6 ze 7 testovaných druhů, následoval Emm5, který byl polymorfní u pěti ze sedmi testovaných druhů a Em8, který byl polymorfní u 4 testovaných druhů. Všechny ostatní mikrosatelity byly polymorfní u tří a méně testovaných druhů.

Díky 15,93% úspěšnosti nalezení polymorfních mikrosatelitních lokusů pocházejících od 9 druhů tučňáků doporučuji otestovat 34 mikrosatelitů objevených týmem Vianna *et al.* (2017), neboť by mohly poskytnout 3–4 polymorfní mikrosatelitní lokusy.

Tabulka č. 8: Srovnání polymorfních mikrosatelitních lokusů pocházejících z řádu tučňáků a univerzálních ptačích mikrosatelitů, které byly testovány pomocí *cross-species* PCR amplifikace u pelikána bílého s výsledky z 6 prací zabývajících se taktéž hledáním polymorfních lokusů pomocí výše zmíněných mikrosatelitů. V tabulce je uveden název lokusu, číslem je v tabulce vyznačen počet alel nalezený na daném lokusu, písmeno M značí, že byl produkt monomorfní, BP značí bez produktu (nedošlo tedy k amplifikaci) a NT značí netestování daného mikrosatelitu. Počet testovaných jedinců u každého druhu byl 6.

Lokus	Druh (zdroj)						
	Pelikán bílý (tato práce)	Pelikán africký (Adámková, 2019)	Pelikán skvrnozobý (Šuláková, 2017)	Plameňák růžový (Klaclová, 2018)	Plameňák karibský (Zlochová, 2017)	Nesyt indomalajský (Pechová, 2014)	Potápka roháč (Filipová, 2016)
Ech008	2	2	3	M	M	M	M
Ech011	2	M	M	3	3	M	M
Ech039	3	M	M	M	7	M	M
Emm5	2	2	2	4	M	M	2
Emm6	2	2	2	M	M	M	M
Em8	5	5	3	4	M	NT	M
Em14	2	M	M	M	M	NT	3
Em21	2	M	M	M	M	NT	2
Em23	2	M	M	4	3	NT	M
AM13	2	M	2	M	M	M	M
Sh2Ca21	2	M	M	M	2	M	M
M1-11	2	2	M	BP	M	M	M
TG01-148	2	M	M	2	M	M	M
TG03-098	2	M	M	M	M	2	2
TG04-012	4	M	M	M	M	M	8
TG04-061	3	M	M	M	4	M	5
CAM03	2	M	M	2	M	4	M
CAM05	2	M	5	M	M	M	M
CAM11	3	M	2	2	2	5	5
CAM17	2	M	3	M	M	M	2
CAM19	2	M	M	2	M	M	4
CAM20	2	M	M	3	3	M	M
CAM23	2	M	2	M	M	M	6

V Laboratoři populační genetiky na Katedře buněčné biologie a genetiky Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého v Olomouci bylo dosud u pelikána bílého otestováno celkem 724 mikrosatelitů pocházejících od řádů veslonozí, vrubozobí, brodiví, plameňáci, tučňáci a univerzálních ptačích mikrosatelitů. Ve třech diplomových pracích (Ranochová, 2008, Mikulová, 2010 a Bartoňková, 2013) bylo testováno celkem 414 párů primerů, ve dvou bakalářských pracích (Buržáková, 2011, tato bakalářská práce) bylo testováno celkem 310 párů primerů. V současné době probíhá testování 213 párů primerů odvozených od řádu trubkonosí. Celkem bylo u pelikána bílého nalezeno 192 mikrosatelitních lokusů, které poskytly polymorfní produkt. Protože tyto ptáci patří stejně jako rod pelikán do kladu Aequorlornithes, doporučuji otestovat mikrosatelity, které se po dokončení prací, které se tomu věnovaly, objevily a dále bych doporučovala otestovat mikrosatelity pocházející od řádu dlouhokřídlí (Charadriiformes), protože tento řád také patří do kladu Aequorlornithes a až na několik výjimek nebyly tyto mikrosatelity dosud v naší laboratoři testovány.

7 Závěr

V této bakalářské práci jsem prostřednictvím *cross-species* PCR amplifikace hledala polymorfní mikrosatelitní lokusy u 6 nepříbuzných jedinců pelikána bílého (*Pelecanus onocrotalus*). Testovala jsem celkem 173 párů primerů navržených pro mikrosatelitní lokusy pocházejících od 9 druhů tučňáků a univerzální ptačí mikrosatelity.

113 párů primerů bylo navrženo pro amplifikaci mikrosatelitů pocházejících od 9 druhů tučňáků (tučňáka žlutorohého, t. nejmenšího, t. žlutookého, t. kroužkového, t. uzdičkového, t. brýlového, t. Humboldtova, t. galapážského a t. magellanského). 36 párů primerů bylo navrženo pro amplifikaci 35 EST ptačích mikrosatelitů a 24 pro amplifikaci konzervovaných ptačích mikrosatelitů.

Prostřednictvím 34 párů primerů jsem u pelikána bílého amplifikovala celkem 35 polymorfních mikrosatelitních produktů. S 18 páry primerů, pocházejících od řádu tučňáci, jsem amplifikovala 18 polymorfních mikrosatelitních produktů. Úspěšnost amplifikace mikrosatelitů z řádu tučňáci tak činila 15,93 %. Devíti páry primerů pocházejících z EST ptačích mikrosatelitů jsem amplifikovala 10 polymorfních produktů (u lokusu TG13-016 se nacházela dvě místa polymorfismu) a prostřednictvím sedmi párů primerů pocházejících od konzervovaných ptačích mikrosatelitů jsem detekovala 7 polymorfních lokusů. Úspěšnost amplifikace univerzálních ptačích mikrosatelitů činila 26,67 %. Teplota *annealingu* se u polymorfních mikrosatelitních lokusů pohybovala v rozmezí 51–68 °C, délka elektroforetické separace byla 90–180 minut, počet alel na lokus byl 2–5.

8 Použitá literatura

- Adámková, V. (2019): *Cross-species* amplifikace mikrosatelitů z řádu tučňáci a konzervovaných ptačích mikrosatelitů u pelikána afrického (*Pelecanus rufescens*). Bakalářská práce. Depon in: Knihovna biologických oborů PřF UPOL Olomouc.
- Ahmed, S., Hart, T., Dawson, D.A., Horsburgh, G.J., Trathan, P.N., Rogers, A.D. (2009): Isolation and characterization of macaroni penguin (*Eudyptes chrysolophus*) microsatellite loci and their utility in other penguin species (Spheniscidae, AVES). *Molecular Ecology Resources*, 9, 1530–1535.
- Akst, E., Boersma, P., Fleischer, R. (2002): A comparison of genetic diversity between the Galapagos Penguin and the Magellanic Penguin. *Conservation Genetics*, 3, 375–383.
- Aljanabi, S.M., Martinez, I. (1997): Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. *Nucleic Acids Research*, 25, 4692–4693.
- Armour, J.A.L., Neumann, R., Gobert, S., Jeffreys, A.J. (1994): Isolation of human simple repeat loci by hybridization selection. *Human Molecular Genetics*, 3, 599–605.
- Bartoňková (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.
- Billing, T.M., Guay, P.J., Peucker, A.J., Mulder, R.A. (2007): Isolation and characterization of polymorphic microsatellite loci for the study of paternity and population structure in the little penguin *Eudyptula minor*. *Molecular Ecology Notes*, 7, 425–427.
- Boessenkool, S., King, T.M., Seddon, P.J., Waters, J.M. (2008): Isolation and characterization of microsatellite loci from the yellow-eyed penguin (*Megadyptes antipodes*). *Molecular Ecology Resources*, 8, 1043–1045.
- Bradford, A. (2014): Penguin Facts: Species and Habits. Live Science: The most Interesting Articles, Mysteries and Discoveries. Navštíveno dne 24.11.2018 na <https://www.livescience.com/27434-penguin-facts.html>.

- Buržáková (2011): Analýza vybraných polymorfních *cross-species* mikrosatelitů pro determinaci paternity u pelikána bílého (*Pelecanus onocrotalus*) a pelikána skvrnozobého (*P. philippensis*). Bakalářská práce. Depon in: Knihovna biologických oborů PřF UPOL Olomouc.
- Chistiakov, D.A., Hellemans, B., Volckaert, F.A.M. (2006): Microsatellites and their genomic distribution, evolution, function, applications: A review with special reference to fish genetics, *Aquaculture*, 255, 1–29.
- Dawson, D.A., Horsburgh, G.J., Küpper, C., Stewart, I.R.K., Ball, A.D., Durrant, K.L., Burke, T. (2010): New methods to identify conserved microsatellite loci and develop primer sets of high cross-species utility – as demonstrated for birds. *Molecular Ecology Resources*, 10, 475–494.
- Dawson, D.A., Ball, A.D., Spurgin, L.G., Martín-Gálvez, D., Stewart, I.R.K., Horsburgh, G.J., Burke, T. (2013): High-utility conserved avian microsatellite markers enable parentage and population studies across a wide range of species. *BMC Genomics*, 14, 176.
- Del Hoyo, J., Elliot, A., Sargatal, J., Imboden, C. (1992): *Handbook of the Birds of the World. Volume 1. Ostrich to Duck*. Lynx Edition, Barcelona.
- Ellegren, H. (1992): Polymerase chain reaction (PCR) of microsatellites – a new approach to studies of genetic relationships in birds. *The Auk*, 109, 886–895.
- 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.
- Fleischer, R.C., Loew, S. (1995): Construction and screening of microsatellite-enriched genomic libraries. *Molecular Zoology: Advantages, Strategies and Protocols*. 459–468.
- Gaisler, J., Zima, J. (2018): *Zoologie obratlovců*. Academia, Akademie věd České republiky, Praha.
- Garner, T.W.J., Gautschi, B., Röthlisberger, S., Reyer, H.U. (2000): A set of CA repeat microsatellite markers derived from the pool frog, *Rana lessonae*. *Molecular Ecology*, 9, 2173–2174.
- Glenn, T.C., Schable, N.A. (2005): Isolating microsatellite DNA loci. *Methods in Enzymology*, 395, 202–222.
- Gosler, A. (1994): *Atlas ptáků světa, České vydání 1. Příroda*, Bratislava.

- Grosser, S., Waters, J.M. (2015): Development and characterisation of 20 novel microsatellite markers for the little blue penguin (*Eudyptula minor*) using next-generation sequencing. *Conservation Genetics Resources*, 7, 143–145.
- 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., Yuri, T. (2008): A phylogenomic study of birds reveals their evolutionary history. *Science*, 320, 1763–1767.
- Hamilton, M.B., Pincus, E.L., Di Fiore, A., Fleischer, R.C. (1999): Universal linker and ligation procedures for construction of genomic DNA libraries enriched for microsatellites. *Biotechniques*, 27, 500–507.
- Huang, T., Peng, J., Zhao, Y., Xu, Z., (2018): The complete mitochondrial genome of *Pelecanus occidentalis* (Pelecaniformes: Pelecanidae) and its phylogenetic analysis. *Mitochondrial DNA Part B: Resources*, 3, 782–783.
- Hudec, K., Hanzák, J. (1974): Světem zvířat. Díl 2. Část 1, Ptáci. Druhé přepracované vydání. Albatros, Praha.
- Janušová (2017): Charakteristika vybraných polymorfních *cross-species* mikrosatelitů z kladu Aequorlitorornithes u potápky roháče (*Podiceps cristatus*). Diplomová práce. Depon in: Knihovna biologických oborů PřF UPOL Olomouc.
- 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., Sichteritz-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.
- Kang, S., Jung, J.W., Ahn, D.H., Lee, J.E., Kim, J.H., Park, H. (2015): Isolation and characterization of polymorphic microsatellite loci from the Chinstrap penguin, *Pygoscelis antarctica*. *Conservation Genetics Resources*, 7, 561–563.
- Kennedy, M., Taylor, S.A., Nádvorník, P., Spencer, H.G. (2013): The phylogenetic relationship of extant pelicans inferred from DNA sequence data: *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 66, 215–222.
- Klaczlová, M. (2018): *Cross-species* amplifikace mikrosatelitů z řádu tučňáci a konzervovaných ptačích mikrosatelitů u plameňáka růžového (*Phoenicopterus roseus*). Bakalářská práce. Depon in: Knihovna biologických oborů PřF UPOL Olomouc.
- Kumar, S., Tamura, K., Nei, M. (2004): MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. *Briefings in Bioinformatics*, 5, 150–163.
- Labuschagne, C. van Wyk, A.M., Kotzé, A., Grober, P., Dalton, D.L. (2013): Isolation and characterization of species-specific microsatellite loci in African penguin (*Spheniscus demersus*). *Conservation Genetics Resources*, 5, 169–171.
- Martínez, I., Bonan, A. (2018): Penguins (Spheniscidae). In: del Hoyo, J., Elliott, A., Sargatal, J., Christie, D.A., de Juana, E. (eds.): *Handbook of the Birds of the world alive*. Lynx Edicions, Barcelona. Navštíveno dne 24.11.2018 na <https://www.hbw.com/family/penguins-spheniscidae>.
- Mason, A.S. (2015): SSR Genotyping. In: Batley J. (eds) *Plant Genotyping. Methods in Molecular Biology*, Humana Press, 77-89.
- Mikulová (2010): Mikrosatelitové lokusy pro determinaci paternity u vybraných druhů pelikánů (*Pelecanus* spp.). Diplomová práce. Depon in: Knihovna biologických oborů PřF UPOL Olomouc.
- Nelson, J.B. (2005): *Pelicans, Cormorants and their Relatives*. Oxford University Press, Oxford.
- Nicholls, J.A., Double, M.C., Rowell, D.M., Magrath, R.D. (2000): The evolution of cooperative and pair breeding in thornbills *Acanthiza* (Pardalotidae). *Journal of Avian Biology*, 31, 165–176.

- Oliveira, E.J., Pádua, J.G., Zucchi, M.I., Vencovsky, R., Vieira, M.L.C. (2006): Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. *Genetics and Molecular Biology*, 29, 294–307.
- Pechová, A. (2014): *Cross-species* amplifikace mikrosatelitů z řádu tučňáci a konzervovaných ptačích mikrosatelitů u nesyta indomalajského (*Mycteria leucocephala*). Bakalářská práce. Depon in: Knihovna biologických oborů PřF UPOL Olomouc.
- Pérez-Jiménez, M., Besnard, G., Dorado, G., Hernandez, P. (2013): Varietal tracing of virgin olive oils based on plastid DNA variation profiling. *PLoS One*, 8.
- Perrin, C., Roy, M.S. (2000): Rapid and efficient identification of microsatellite loci from the sea urchin, *Evechinus chloroticus*. *Molecular Ecology*, 9, 2221–2223.
- Phumichai, C., Phumichai, T., Wongkaew, A. (2015): Novel chloroplast microsatellite (cpSSR) markers for genetic diversity assessment of cultivated and wild Hevea rubber. *Plant Molecular Biology Report*, 33, 1486–1498.
- Primmer, C.R., Moller, A.P., Ellegren, H. (1996): A wide-range survey of cross-species microsatellite amplification in birds. *Molecular Ecology*, 5, 365–378.
- Prum, R.O., Berv, J.S., Dornburg, A., Field, D.J., Townsend, J.P., Lemmon, E.M., Lemmon, A.R. (2015): A comprehensive phylogeny of birds (Aves) using targeted next-generation DNA sequencing. *Nature*, 525, 569–573.
- Ranochová (2008): Analýza mikrosatelitových lokusů pro determinaci paternity u vybraných druhů pelikánů. Diplomová práce. Depon in: Knihovna biologických oborů PřF UPOL Olomouc.
- Roeder, A.D., Marshall, R.K., Mitchelson, A.J., Visagathilagar, T., Ritchie, P.A., Love D.R., Lambert, D.M. (2001): Geneflow on the ice: genetic differentiation among Adélie penguin colonies around Antarctica. *Molecular Ecology*, 10, 1645–1656.
- Rozen S, Skaletsky, H.J. (2000): Primer 3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology*. Humana Press, Totowa, NJ. 365–386.
- Rozen, S., Skaletsky, H.J. (1998): Primer 3. Dostupné online (1998): http://www-genome.wi.mit.edu/genome_software/other/primer3.html
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. (1989): *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Sibley, C.G., Ahlquist, J.E., Monroe, B.L. (1988): A classification of the Living Birds of the World Based on DNA-DNA Hybridization Studies. *The Auk*, 105, 409–423.

- Schlosser, J.A., Dubach, J.M., Garner, T.W.J., 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.
- Schlosser, J.A., Dubach, J.M., Garner, T.W.J., Araya, B., Bernal, M., Simeone, A., Wallace, R.S. (2009): Evidence for gene flow differs from observed dispersal patterns in the Humboldt penguin, *Spheniscus humboldti*. *Conservation Genetics*, 10, 839–849.
- Schlötterer, C., Tautz, D. (1992): Slippage synthesis of simple sequence DNA. *Nucleic Acids Research*, 20, 211–215.
- Shamjana, U., Bharadway, T., Grace, T. (2015): Microsatellites: A Versatile Markers for Genetic, Evolutionary, and Ecological Studies. *International journal of advanced biological research*, 5, 86–95.
- Šťastný, K., Bejček, V., Hudec, K. (1998): Svět zvířat IV., Ptáci 1. Albatros, Praha.
- Šťastný, K., Hudec, K. (2016): Fauna ČR, Ptáci 1, Academia, Praha.
- Šuláková, M. (2017): *Cross-species* amplifikace mikrosatelitů z řádu tučňáci a konzervovaných ptačích mikrosatelitů u pelikána skvrnozobého (*Pelecanus philippensis*). Bakalářská práce. Depon in: Knihovna biologických oborů PřF UPOL Olomouc.
- Tóth, G., Spari, Z.G. and Jurka, J. (2000): Microsatellites in different eukaryotic genomes: survey and analysis. *Genome Research*, 15, 967–981.
- Vianna, J.A., Noll, D., Mura-Jornet, I., González-Acuña, D., Navarro, C., Loyola, D.E., Dantas, G.P.M. (2017): Comparative genome-wide polymorphic microsatellite markers in Antarctic penguins through next generation sequencing. *Genetics and Molecular Biology*, 40, 676–687.
- Vieira, M.L.C., Santini, L., Diniz, A.L., Munhoz, C. (2016): Microsatellite markers: what they mean and why they are so useful. *Genetics and Molecular Biology*, 39, 312–328.
- Zlochová, A. (2017): *Cross-species* amplifikace mikrosatelitů z řádu tučňáci a konzervovaných ptačích mikrosatelitů u plameňáka karibského (*Phoenicopterus ruber*). Bakalářská práce. Depon in: Knihovna biologických oborů PřF UPOL Olomouc.