

Univerzita Palackého v Olomouci

Přírodovědecká fakulta

Katedra botaniky



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

Bakalářská práce

Veronika Adámková

Studijní program: Chemie se zaměřením na vzdělávání

Studijní obor: Chemie-Biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2019

Vedoucí práce: RNDr. Petr Nádvorník, Ph.D

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně v průběhu bakalářského studia pod vedením RNDr. Petra Nádvorníka, Ph.D. za použití uvedených literárních zdrojů.

V Olomouci dne 18. 12. 2018

Chtěla bych poděkovat RNDr. Petru Nádvořníkovi, Ph.D. za jeho trpělivost a čas, který mi věnoval po celou dobu zpracování teoretické i experimentální části mé bakalářské práce, za jeho odborné rady a věcné připomínky a také materiály, které mi poskytl.

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení: Veronika Adámková

Název práce: *Cross-species* amplifikace mikrosatelitů z řádu tučňáci a konzervovaných ptačích mikrosatelitů u pelikána afrického (*Pelecanus rufescens*)

Typ práce: Bakalářská

Pracoviště: Katedra buněčné biologie a genetiky, Přírodovědecká fakulta Univerzity Palackého v Olomouci

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

Rok obhajoby: 2019

Abstrakt

V mé bakalářské práci jsem se zabývala hledáním polymorfních mikrosatelitů pomocí *cross-species* PCR amplifikace u pelikána afrického (*Pelecanus rufescens*).

V teoretické části jsem se věnovala taxonomickému zařazení pelikána afrického do systému ptáků, dále jsem popsala řád veslonozí (Pelecaniformes), čeleď pelikánovití (Pelecanidae) a rod pelikán (*Pelecanus*). V poslední části jsem se zaměřila na popis mikrosatelitů, s důrazem na mikrosatelity u ptáků z řádu tučňáci a univerzální ptačí mikrosatelity.

V experimentální části jsem testovala pomocí *cross-species* PCR amplifikace u 6 nepříbuzných jedinců pelikána afrického 173 párů primerů, z nichž 113 bylo navrženo pro PCR amplifikaci polymorfních mikrosatelitů u 9 druhů tučňáků a 60 párů primerů pro PCR amplifikaci univerzálních ptačích mikrosatelitů. Nalezla jsem 12 polymorfních mikrosatelitních lokusů, u kterých jsem detekovala od 2 do 5 alel. Po jednom polymorfním mikrosatelitu od tučňáka žlutorohého, tučňáka Humboldtova, tučňáka galapážského a tučňáka žlutookého, 4 polymorfní mikrosatelity od tučňáka nejmenšího, 2 polymorfní konzervované ptačí mikrosatelity a 2 polymorfní EST ptačí mikrosatelity.

Klíčová slova: pelikán africký (*Pelecanus rufescens*), tučňáci (Sphenisciformes), DNA, mikrosatelit, *cross-species* PCR amplifikace

Počet stran: 58

Počet příloh: 1

Jazyk: Český

Bibliographic identification

Author's first name and surname: Veronika Adámková

Title of thesis: Cross-species amplification of microsatellites from Sphenisciformes and conserved avian microsatellites for African pelican (*Pelecanus rufescens*)

Type of thesis: Bachelor

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

Supervisor: RNDr. Petr Nádvorník, Ph.D.

The year of presentation: 2019

Abstract

In my bachelor thesis I was searching for polymorphic microsatellites by means of cross-species PCR amplification for African pelican (*Pelecanus rufescens*).

The theoretical part deals with taxonomic classification of African pelican within the birds system. I described the Pelecaniformes order, the Pelecanidae family and *Pelecanus* genus. The last part contains the description of microsatellites with an emphasis on penguin microsatellites as well as universal bird microsatellites.

The experimental part provides the results of tests by means of cross-species PCR amplification for 6 unrelated individuals of African pelicans of 173 primer pairs of which 113 were suggested for PCR amplification of polymorphic microsatellites within 9 species of penguins and 60 primer pairs for PCR amplification of universal bird microsatellites. I have found 12 polymorphic microsatellite loci with 2–5 detected alleles. I have found one polymorphic microsatellite of macaroni penguin, one of Humboldt penguin, one of Galápagos penguin and one of yellow-eyed penguin, 4 polymorphic microsatellites of the little penguin, 2 polymorphic conserved avian microsatellites and 2 polymorphic EST bird microsatellites.

Keywords: Pink-backed pelican (*Pelecanus rufescens*), penguins (Sphenisciformes), DNA, microsatellite, cross-species PCR amplification

Number of pages: 58

Number of appendices: 1

Language: Czech

Obsah

1	Úvod	7
2	Cíle práce	8
3	Literární přehled	9
3.1	Řád veslonozí	9
3.2	Čeled' pelikánovití	10
3.3	Pelikán africký	11
3.4	Mikrosatelity	13
3.4.1	Mikrosatelity druhů řádu tučňáci	14
3.4.2	Univerzální ptačí mikrosatelity	20
4	Materiál a metody	23
4.1	Biologický materiál	23
4.2	Chemikálie	23
4.3	Roztoky	24
4.4	Laboratorní přístroje	26
4.5	PCR amplifikace mikrosatelitů	26
4.6	Elektroforetická separace PCR produktů	29
5	Výsledky	32
6	Diskuze	38
7	Závěr	47
8	Seznam použitých zkratk	48
9	Didaktická část	49
10	Přílohy	50
10.1	Pracovní list pro žáky k didaktické části	50
10.2	Pracovní list pro učitele k didaktické části	51
11	Literatura	52

1 Úvod

Mikrosatelity jsou sekvence DNA, které jsou složené z krátkých opakujících se repeticí několika párů bází. Můžeme je lokalizovat v genomu prokaryotních i eukaryotních organismů. Velký význam mají polymorfní mikrosatelity, jejichž rozsah využití je široký a to zejména jako molekulární markery ke studiu paternity a nebo k testování fylogenetické příbuznosti organismů.

V rámci Laboratoře populační genetiky na Katedře buněčné biologie a genetiky PřF UPOL už byly na pelikánu africkém testovány mikrosatelity pocházející od plameňáků, veslonohých a brodivých. Touto prací bych měla na předešlé práce navázat.

Ve své bakalářské práci budu pomocí *cross-species* PCR amplifikace hledat polymorfní mikrosatelity pomocí 173 párů primerů u 6 nepříbuzných jedinců pelikána afrického, z toho je 113 párů primerů odvozeno od ptáků z řádu tučňáci a 60 párů primerů, které amplifikovaly univerzální ptačí mikrosatelity (24 konzervovaných ptačích mikrosatelitů a 36 EST ptačích mikrosatelitů).

2 Cíle práce

1. Shromáždění dostupných literárních zdrojů.
2. Vypracování rešerše na téma bakalářské práce.
3. PCR amplifikace DNA pelikána afrického (*Pelecanus rufescens*) s využitím *cross-species* primerů pro mikrosatelity z řádu tučňáci a pro univerzální ptačí mikrosatelity.

3 Literární přehled

3.1 Řád veslonozí

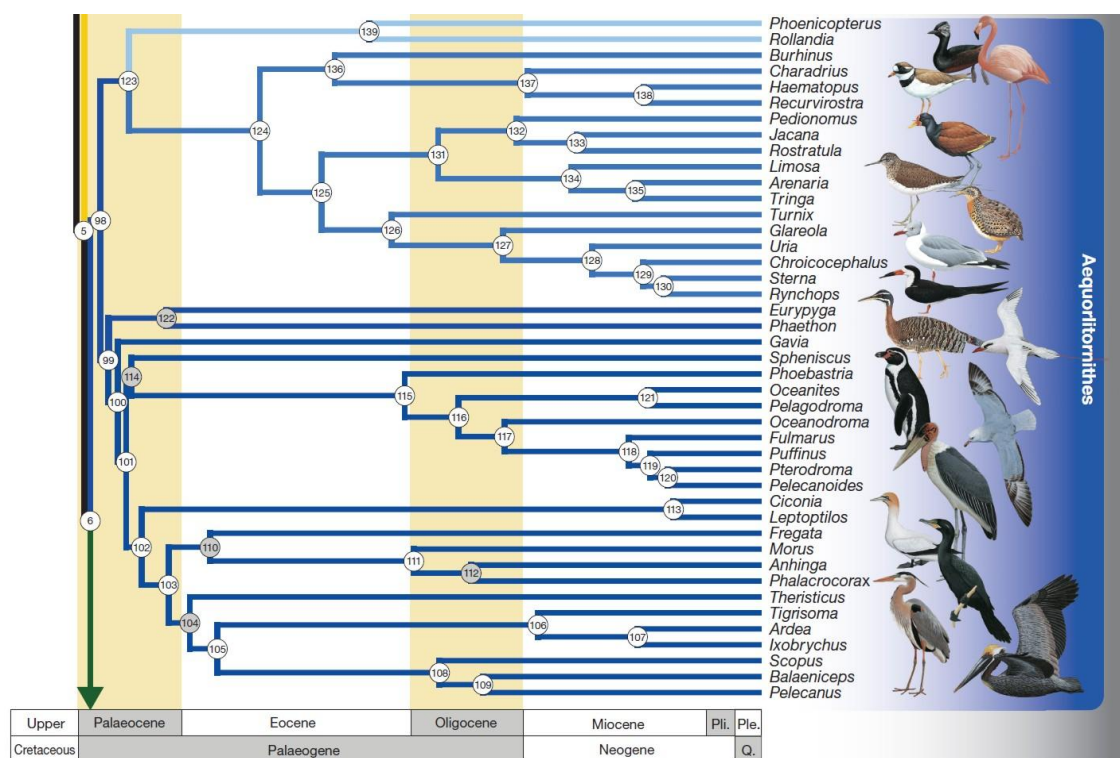
Řád veslonozí (Pelecaniformes) v tradičním pojetí zahrnuje asi 60 recentních druhů (Gosler, 1994). Do řádu veslonozí se řadí šest čeledí: pelikánovití (Pelacnidae), kormoránovití (Phalacrocoracidae), fregatkovití (Fregatidae), anhingovití (Anhingidae), terejovití (Sulidae) a faetonovití (Phaethontidae) (del Hoyo *et al.*, 1992). Pelecaniformes jsou velcí vodní ptáci, kteří mají veslovací nohu se čtyřmi prsty spojenými plovací blánou. Všichni zástupci tohoto řádu mají mohutný zobák a hrdelní vak různé velikosti. Dále je pro ně charakteristická přítomnost kostrční žlázy, roztažitelný jícen a silný jazyk. Vnější nozdry mají redukované a vomer jim chybí. Při lovu potravy z vody se buď pro kořist potápějí (Phalacrocoracidae a Anhingidae), nebo volí taktiku střemhlavého pádu do vody (Sulidae a Phaethontidae) a nebo sbírají potravu z hladiny za letu (Fregatidae). Jedná se o živočichy obývajících převážně tropy a subtropy, ale i oblasti mírného pásu (Gaisler *et Zima*, 2007). Čeledi fregatkovití, terejovití, faetonovití, anhingovití a kormoránovití jsou převážně mořští nebo oceánští ptáci. Pelikáni preferují spíše sladké vody, avšak některé druhy pelikánů naopak dávají přednost mořským vodám. Z morfologického hlediska se jedná o velmi různorodé skupiny, z toho důvodu je složité studium jejich fylogeneze (del Hoyo *et al.*, 1992).

Radikální změnu v názoru na systém a fylogenezi veslonohých přináší Brown *et al.* (1982), kteří tuto skupinu ptáků pokládají za polyfyletickou a dělí ji na 2 podřády. Prvním podřádem jsou Phaethontes, který zahrnuje čeleď faetonovití a druhým podřádem jsou Pelecani, do kterého se řadí pelikánovití, terejovití, kormoránovití, anhingovití a fregatkovití. Rod pelikán se dále dělí na další dvě větve (Kennedy *et al.*, 2013). Molekulární studie ukazují, že faetoni jsou příbuzní rybákovitým, fregatky jsou spjaty s burňákovitými, albatrosovitými, potáplicovitými a tučňákovitými (Hedges *et Sibley*, 1994).

S rozvojem molekulárních markerů došlo k několika výrazným taxonomickým změnám v rámci veslonohých. Autoři novějších studií fylogenetické příbuznosti ptáků předpokládají, že čeleď faetonovití není součástí řádu veslonohých (např. Jarvis *et al.*, 2014, Prum *et al.*, 2015). Jarvis *et al.* (2014) zavrhl tradiční rozdělení veslonohých a brodivých a jednotlivé jejich čeledi mezi sebou promíchali a vytvořili mezi nimi nové vztahy, což podle těchto autorů lépe odráží fylogenezi těchto ptáků. Do řádu

veslonohých zařadili čeledi pelikánovití, volavkovití, ibisovití a kormoránovití. DNA analýzy poukazují na to, že nejbližšími příbuznými pelikánů jsou člunozobec africký a kladivouš africký. Blízcí příbuzní pelikánů jsou také volavky a ibisové. Prum *et al.*, (2015) zavádějí nový fylogenetický klad Aequorlornithes, který zahrnuje všechny vodní ptáky bez vrubozobých a dělí se na dvě sesterské skupiny. Do první skupiny zahrnuli plameňáky, potápky a dlouhokřídle a do druhé skupiny zahrnuli slunatce, kagu, potáplice, tučňáky, trubkonosé a všechny zástupce brodivých a veslonohých (Obrázek č. 1).

Obrázek č. 1: Klad Aequorlornithes (Prum *et al.*, 2015).



3.2 Čeleď pelikánovití

Čeleď pelikánovití (Pelecanidae) se vyskytuje jak v tropickém, tak i v mírném pásu. Kontinent, na kterém se pelikáni nevyskytují, je Antarktida. Dále pak oblast Nového Zélandu a Oceánie (Gaisler *et* Zima, 2007). Čeleď pelikánovití zahrnuje v 1 rodu 8 druhů a to pelikána bílého (*Pelecanus onocrotalus*), kadeřavého (*P. crispus*), hnědého (*P. occidentalis*), afrického (*P. rufescens*), australského (*P. conspicillatus*), severoamerického (*P. erythrorhynchos*), skvrnozobého (*P. philippensis*) a chilského (*P. thagus*). Podle del Hoyo *et al.* (1992) se první pelikáni objevují již v oligocénu, který se datuje 30–40 milionů let zpátky.

Jedná se o jedny z nejtěžších vodních létajících ptáků, jejichž hlavní dovedností je lov ryb (Geisler *et* Zima, 2007). Největší pelikán je pelikán kadeřavý s rozpětím křídel kolem tří a tři čtvrtě metru a maximální hmotností 13 kilogramů. Naopak pelikán hnědý je nejmenší zástupce rodu. Délka od konce prstů nohou po špičku zobáku je kolem jednoho metru, hmotnost 4 kilogramy a rozpětí křídel je okolo dvou metrů (del Hoyo *et al.*, 1992).

Peří pelikánů je hedvábně šedé, bílé, ojediněle i černé. Pelikáni mají dlouhá křídla, která dosahují středního rozpětí v rámci třídy ptáků (Brown *et al.*, 1982). Během lovu pelikáni plavou vždy se zdviženými křídly nad vodou, ale i tak je pro ně velmi náročný vzlet z hladiny do vzduchu (Alderton, 1995). Jelikož se jedná o letce, jejich tělo muselo být uzpůsobeno k letu a to zejména díky lehkým a dutým kostem. Pneumatizované kosti způsobují i to, že se nedokáží ponořit hluboko, na rozdíl od kormoránů nebo anhing (del Hoyo *et al.*, 1992).

Zobák mají pelikáni velice zajímavě utvořen, je dlouhý a na konci zahnutý. Jedná se o velice citlivou část těla, díky které mohou detekovat ryby i v zakalené vodě. Spodní čelist je složena ze dvou tenkých a poměrně pružných na špičce spojených větví, mezi nimiž můžeme najít široký a roztažitelný vak, který se též nazývá volátko (Gaisler *et* Zima, 2007). Volátko používají například v horkých dnech pro ochlazení těla. V deštivých obdobích slouží k chytání dešťové vody. Nohy jsou ve srovnání s tělem krátké, daleko od sebe a jsou situovány hodně vzadu, aby umožňovaly pádlování. Tělo pelikánů je dobře adaptované na plavání. Pelikáni jsou dobří plavci, ale když opustí vodní plochy a vyjdou na souš, jejich chůze působí mírně neohrabaně (del Hoyo *et al.*, 1992).

Hnízdí na stromech nebo na zemi a stavějí si hnízda z větví (Gosler, 1994). Hodně druhů pelikánů dává přednost životu v hejnech i při přeletu na jakoukoliv vzdálenost a tvoří tvar do V nebo letí v jedné linii, protože je to aerodynamicky výhodnější (del Hoyo *et al.*, 1992).

3.3 Pelikán africký

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

říše: živočichové (Animalia)

kmen: strunatci (Chordata)

podkmen:	obratlovci (Vertebrata)
třída:	ptáci (Aves)
podtřída:	praví ptáci (Ornithurae)
nadrád:	letci (Neognathae)
řád:	veslonozí (Pelecaniformes)
podřád:	pelikáni (Pelecani)
čeleď:	pelikánovití (Pelecanidae)
rod:	pelikán (<i>Pelecanus</i>)
druh:	pelikán africký (<i>Pelecanus rufescens</i>)

Délka nataženého těla pelikána afrického od konce prstů nohou po špičku zobáku je kolem jednoho a půl metru, hmotnost je v rozmezí 4–7 kg a rozpětí křídel je kolem dvou a půl metru, tím se řadí spíše mezi menší pelikány (del Hoyo *et al.*, 1992). Hnízdí většinou na stromech nebo v závislosti na vodních podmínkách okolního prostředí. Pokud přelétává na delší vzdálenost, tak nemá křídly, ale pouze plachtí (Brown *et al.*, 1982).

Jedná se o šedého ptáka se světlejší spodní částí těla a zády. Zadní část těla má růžovou. Zbarvení peří je místy šedohnědé nebo šedé. Je menší než pelikán bílý a také tmavěji zbarvený. Zobák má růžový, zakončený růžovou či oranžovou špičkou (Brown *et al.*, 1982). Malý jazyk, který ovládá volátko, umožňuje pelikánům vypotit až 13 litrů vody po lovu. Při letu má pelikán africký svůj dlouhý zobák položený na prsou, kde je blíže těžišti těla a tím tak šetří energii (del Hoyo *et al.*, 1992).

Pelikán africký se živí rybami o hmotnosti do půl kilogramu. Průměrná denní spotřebovaná potrava u tohoto druhu se odhaduje kolem tři čtvrtě kilogramu, což odpovídá přibližně 14 % jeho tělesné hmotnosti. Potravu vyhledává se vztyčenou hlavou i krkem, poté dává hlavu na záda a ke kořisti se přibližuje opatrně a pomalu. Potom najednou ponoří hlavu do vody a na kořist zaútočí. Úspěšnost této taktiky je 40–50 % (Brown *et al.*, 1982). Mezi nejoblíbenější potravu pelikánů patří sardinky. Mláďata vybírají natrávenou potravu z vaku rodičů (Alderton, 1995). Díky velké spotřebě ryb dochází často k vyčerpání zdrojů, a proto se musí přemístit na jinou lokalitu. Pelikáni loví potravu především během dne, proto se řadí mezi diurnální

živočichy, v noci jen občas loví za měsíčního svitu (del Hoyo *et al.*, 1992). Při páření dochází k nárůstu šedé chocholky a černých kruhů kolem očí. Volátka je v době páření zbarveno do sytě žluté s černými vertikálními pruhy. Páří se během celého roku, většinou na konci období dešťů. Obvykle naklade 2 vejce, která jsou zbarvena do bledě modra s křídovým potahem. Nově vylíhnutá mláďata jsou nahá, mají růžovou barvu a jsou odkázána na pomoc rodičů (Brown *et al.*, 1982). Rodiče se střídají v sezení na vejcích. Inkubační doba je kolem 30 dnů a samotné vylíhnutí mláďete trvá okolo 24 hodin (del Hoyo *et al.*, 1992).

Rozšíření pelikána afrického je od východu Gambie po Adenský záliv, a dále jižně od Kapské provincie, Etiopie, Senegalů a dříve se vyskytoval i na Madagaskaru (Brown *et al.*, 1982, del Hoyo *et al.*, 1992). Upřednostňuje spíše sladkovodní jezera, močály či rybníčky. Někdy se může objevovat i podél pobřeží, ale to spíše výjimečně. Často ho můžeme nalézt po boku pelikána bílého (Gosler, 1994). Nejedná se o druh, který by byl ohrožen, je běžně rozšířený, mnohdy na určitých místech i přemnožený (del Hoyo *et al.*, 1992).

3.4 Mikrosatelity

Mikrosatelity jsou často označovány jako jednoduchá sekvenční opakování (SSRs - *Simple Sequence Repeats*) nebo jako jednoduchá tandemová opakování (STRs - *Short Tandem Repeats*). Dlouho byly považovány za hlavní zdroj genetické variace (Tautz *et al.*, 1986; Tautz, 1989; Weber *et al.*, 1989). Jsou využívány jako molekulární markery, které jsou rozptýleny v rámci celého genomu. Mikrosatelity jsou tandemově opakované úseky DNA. Nacházejí se v prokaryotických i v eukaryotických organismech (Zane *et al.*, 2002, Oliveira *et al.*, 2006).

Mikrosatelity mohou být klasifikovány na základě toho, jaký motiv se v nich opakuje, například mono-, di-, tri-, tetranukleotidy a podle kontinuity motivů (dokonalé, nedokonalé, přerušené a složené) (Kantartzi *et al.*, 2013). Dokonalé mikrosatelity jsou takové, které mají nepřerušenu jednotku repetice (např. TATATATATA), naopak nedokonalé mají přerušenu repetici jednou bází (např. ATATATCATATAT). Přerušené mikrosatelity jsou takové, kdy je repetitivní jednotka přerušena jiným krátkým motivem (např. TATATACGCTTATA). A v poslední řadě také složené mikrosatelity, které tvoří dvě na sebe navazující repetitivní sekvence, každá s jinou jednotkou opakování (např. TATATAGTGTGT) (Oliveira *et al.*, 2006). Nejčastějšími

motivy jsou $(AT)_n$, $(GA)_n$, $(GAA)_n$, kde n je celkový počet opakování, obvykle se pohybující v rozmezí 10–100. Repetice poly(A)/poly(T) jsou frekventovanější než repetice poly(C)/poly(G) (Goldstein *et al.*, 1999). Frekvence u tetra-, penta- a hexanukleotidických opakování je velice nízká ve všech rostlinných i živočišných genomech (Kantartzi *et al.*, 2013).

Četnost mikrosatelitových mutací se dá zjistit na základě analýz rodokmenů (Weber *et Wong*, 1993) nebo analýzou četností alel (Chakroborty *et al.*, 1997). Míra, při které mutují SSRs lokusy, se liší a závisí na sekvenci motivu a počtu jeho opakování, na sekvencích motivů unikátních sekvencí DNA obklopujících repetici, pozici mikrosatelitů na chromozomech a dalších faktorech. Mutace mikrosatelitů jsou specifické a spočívají obvykle v inzerci nebo deleci jednotky repetice (Kantartzi *et al.*, 2013).

Mikrosatelity jsou pro svou vysokou schopnost polymorfismu využívány v různých základních i aplikovaných oborech biologických věd především pro eukaryotní organismy. Mikrosatelity jsou také rozsáhle používány například v zemědělství, kde se pomocí nich charakterizuje genetický materiál nebo selektují rostliny. I když se mikrosatelity vyskytují hlavně v nekódujících oblastech genomu, EST databáze ukázaly, že sekvence mikrosatelitů se vyskytují také v kódujících oblastech (Kantartzi *et al.*, 2013).

3.4.1 Mikrosatelity druhů řádu tučňáci

Do řádu tučňáci patří pouze 17 druhů, které se dělí do 6 rodů. V 11 pracech pro 9 druhů tučňáků bylo dodnes popsáno celkem 147 polymorfních mikrosatelitních lokusů.

3.4.1.1 12 mikrosatelitů pro tučňáka žlutookého

Boessenkool *et al.* (2008) popsali a charakterizovali u tučňáka žlutookého (*Megadyptes antipodes*) 12 mikrosatelitních lokusů. Připravili dvě repeticemi obohacené genomické knihovny DNA tučňáka žlutookého pomocí upravené verze protokolu, který popsali Perrin *et al.* (2000). První genomická knihovna, jejíž genomická DNA byla izolována pomocí DNeasy blood and tissue kit (QIAGEN) a štěpena pomocí restričního enzymu *MboI* (Promega). Dále byly fragmenty DNA ligovány do pUC 19 klonovacího vektoru, poté byly amplifikovány pomocí M13 primerů. Sekvence obsahující repetice byly selektivně izolovány pomocí magnetických

částic, potažených streptavidinem (Roche Applied Science). U druhé genomické knihovny následně došlo opět ke štěpení takto izolovaných produktů restrikcí enzymem *MboI*, ty byly ligovány do pUC19 klonovacího vektoru a transformovány pomocí One Shot Top (Invitrogen) do komplementárních buněk. Nakonec bylo z 2976 vybráno 159 pozitivních klonů a ty byly následně amplifikovány a sekvenovány pomocí M13 primerů.

Boessenkool *et al.* (2008) celkem navrhli 38 párů primerů pro sekvence z prvních dvou genomických knihoven DNA a 20 párů primerů bylo navrženo ze třetí knihovny. Amplifikace těchto párů primerů byla testována na 12 jedincích tučňáka žlutookého. Bylo nalezeno 12 polymorfních mikrosatelitních lokusů, které vykazovaly polymorfismus a následně je genotypizovali na 43 jedincích pocházejících z Campbellova ostrova. Polymorfní lokusy obsahovaly od 2 do 8 alel.

3.4.1.2 16 polymorfních mikrosatelitů u tučňáka uzdičkového

U tučňáka uzdičkového (*Pygoscelis antarctica*) bylo izolováno a charakterizováno 16 mikrosatelitních lokusů, které vykazovaly polymorfismus (Kang *et al.*, 2015). Krevní vzorky byly odebrány 7 jedincům tučňáka uzdičkového z krční žíly pomocí injekční stříkačky a následně byly uchovány ve zkumavkách s roztokem EDTA. Z těchto krevních vzorků byla poté vyizolována genomická DNA pomocí DNeasy blood and tissue kit (QIAGEN). Data byla zpracována softwarem QDD3 (Meglécz *et al.*, 2014), který našel repetitivní oblasti.

Z třiceti navržených párů primerů bylo 29 mikrosatelitních lokusů úspěšně amplifikováno a 16 z nich bylo polymorfních. Počet alel se pohyboval v rozmezí od 2 do 9 alel na lokus. Pouze u dvou lokusů (Pygantarc 11 a Pygantarc 18) se objevila větší odchylka od Hardy-Weinbergovy rovnováhy a dále byla provedena *cross-species* PCR amplifikace u dalších 3 druhů tučňáků a to u tučňáka oslího (*Pygoscelis papua*), tučňáka kroužkového (*P. adeliae*) a u tučňáka žltorohého (*Eudyptes chrysolophus*). U těchto druhů tučňáků autoři uvádějí, že proběhla úspěšná *cross-species* PCR amplifikace, ale neuvádějí, zda výsledné produkty byly či nebyly polymorfní (Kang *et al.*, 2015).

3.4.1.3 25 polymorfních mikrosatelitů pro tučňáka žltorohého

U tučňáka žltorohého (*Eudyptes chrysolophus*) bylo popsáno a izolováno 25 mikrosatelitních lokusů (Ahmed *et al.*, 2009). Vzorky krve byly odebrány dospělým tučňáka žltorohého na místě, které se nazývá Macaroni Cwm na Ptačím ostrově v souostroví Jižní Georgie. Bylo odebráno 0,1 ml krve z křídelní žíly, a ta byla okamžitě

uskladněna do 1,4 ml absolutního etanolu. Genomická DNA byla extrahována pomocí octanu amonného (Nicholls *et al.*, 2000). Bylo vybráno 288 bakteriálních transformovaných kolonií, u kterých došlo k oboustrannému osekvenování. Celkem 132 jedinečných sekvencí obsahovalo mikrosatelitní motivy, 47 z nich obsahovalo minimálně 8 opakování. Primery byly navrženy pro 32 těchto sekvencí pomocí softwaru PRIMER3 (Rozen *et Skaletsky*, 2000). Pomocí PCR amplifikace bylo testováno všech 32 párů primerů na 28 jedincích tučňáka žlutorohého. PCR produkty byly zředěny a následně došlo k určení velikosti alel pomocí ABI 3730 DNA analyzátoru. Z 32 párů primerů bylo vyřazeno 7 mikrosatelitních lokusů kvůli nespolehlivé PCR amplifikaci. Zbýlých 25 polymorfních lokusů bylo testováno na DNA 28 jedinců tučňáka žlutorohého. Devítialelový lokus Ech020 vykazoval vazbu na Z-chromozom. U 6 mikrosatelitních lokusů byla prokázána značná odchylka od Hardy-Weinbergovy rovnováhy (Ech005, Ech012, Ech063, Ech091, Ech113 a Ech130). Některé z nich měly přítomny nulové alely. Pomocí *cross-species* PCR amplifikace bylo testováno 25 mikrosatelitních lokusů na DNA dalších 4 druhů, na tučňáku patagonském (*Aptenodytes patagonicus*), tučňáku oslím (*Pygoscelis papua*), tučňáku uzdičkovém (*P. antarctica*) a tučňáku kroužkovém (*P. adeliae*). 17 mikrosatelitních lokusů bylo polymorfních alespoň u jednoho ze čtyř testovaných druhů tučňáků, 8 mikrosatelitních lokusů (Ech008, Ech012, Ech030, Ech051, Ech060, Ech071, Ech081 a Ech091) bylo polymorfních u 3 druhů tučňáků. Počty alel autoři neuvádějí (Ahmed *et al.*, 2009).

3.4.1.4 8 polymorfních mikrosatelitů u tučňáka nejmenšího

U tučňáka nejmenšího (*Eudyptula minor*) bylo popsáno a charakterizováno 8 polymorfních mikrosatelitních lokusů (Billing *et al.*, 2007). Genomická DNA byla extrahována vysolovací metodou z krevních vzorků tučňáka nejmenšího na Filipově ostrově u Austrálie a následně štěpena pomocí restriktivního enzymu *Sau3A* (Promega). Fragmenty DNA byly ligovány a následně děleny v agarózovém gelu pomocí elektroforetické separace. Ze 192 klonů, které byly obohaceny o GA sekvence bylo vybráno z genomické knihovny celkem 18 pozitivních klonů, které byly osekvenovány a pro 9 z nich byly vytvořeny templáty, které obsahovaly 7 a více repetitivních jednotek GA. Z genomické knihovny, která byla obohacena o sekvence GAAA, bylo z celkových 179 kolonií osekvenováno 10 klonů. Pouze pro 1 byl navržen pár primerů, protože obsahoval dostatečně velký počet repetitivních jednotek. Emm 4 byl monomorfní v populaci na Filipově ostrově, ale polymorfní na Troubridgeově ostrově. Zbývajících 5

mikrosatelitních lokusů vykazovalo větší variabilitu. Lokusy Emm 2 a Emm 8 se výrazně odchylovaly od Hardy-Weinbergovy rovnováhy z důvodu vyšší frekvence nulových alel. Počty alel autoři neuvádějí.

3.4.1.5 20 polymorfních mikrosatelitů u tučňáka nejmenšího

Grosser *et* Waters (2015) se též zabývali mikrosatelity u tučňáka nejmenšího a popsali a izolovali 20 dalších mikrosatelitů. Krevní vzorky byly odebrány jedincům pocházejícím z Nového Zélandu a Austrálie. Genomická DNA byla extrahována pomocí fenol-chloroformové metody a následně byla osekvenována. Byly prozkoumány sekvence s di-, tri- a tetranukleotidovými jednotkami repetice, které měly nejméně 5 opakujících se repetitivních jednotek a byly navrženy páry primerů pomocí softwaru MSATCOMMANDER v1.0.8 (Faircloth 2008). Pro 346 sekvencí byly navrženy páry primerů, z nichž bylo vybráno 30 lokusů pro PCR amplifikaci. 10 párů primerů neposkytovalo produkt nebo produkt byl monomorfní, pouze 20 párů primerů amplifikovalo polymorfní produkt. Bylo sestaveno 7 multiplexových mixů a následně došlo k amplifikaci. Dále byly mikrosatelitní lokusy testovány na odchylku od Hardy-Weinbergovy rovnováhy. Vazba byla prokázána u 4 párů lokusů (Em9 a Em2, Em8 a Em2, Em5 a Em24, Em9 a Em13). Lokus Em15 vykazoval odchylku od Hardy-Weinbergovy rovnováhy pouze v populaci, která se vyskytuje na Novém Zélandě, dále lokusy Em2, Em6 a Em28 vykazovaly odchylku od Hardy-Weinbergovy rovnováhy každý pouze v jedné populaci. Takováto odchylka mohla být způsobena výskytem nulových alel. Počet alel nebyl uveden.

3.4.1.6 8 polymorfních mikrosatelitů u tučňáka brýlového

U tučňáka brýlového (*Spheniscus demersus*) bylo popsáno a izolováno celkem 8 mikrosatelitních lokusů (Labuschagne *et al.*, 2013). Krevní vzorky byly odebrány 25 dospělým jedincům tučňáka brýlového v kolonii v provincii KwaZulu Natal v Jižní Africe. Od každého jedince bylo odebráno 30 μ l krve, která byla dána na filtrační papír. DNA extrakce byla provedena pomocí DNeasy blood and tissue kit (QIAGEN). Knihovna obohacená o mikrosatelitní lokusy byla osekvenována přístrojem Roche 454 GS-FLX. Primery byly navrženy pomocí softwaru PRIMER3 (Rozen *et* Skaletsky, 2000) pro 12 mikrosatelitních lokusů. Na lokusech zaznamenali od 2 do 6 alel. Z 12 mikrosatelitních lokusů bylo nalezeno 8 polymorfních, u kterých nebyla prokázána odchylka od Hardy-Weinbergovy rovnováhy (Labuschagne *et al.*, 2013).

3.4.1.7 4 polymorfní mikrosatelity u tučňáka magellanského

U tučňáka galapážského a u tučňáka magellanského bylo objeveno 6 mikrosatelitních lokusů odvozených z DNA od 4 druhů rodu *Spheniscus*: tučňáka galapážského (*S. mendiculus*), t. magellanského (*S. magellanicus*), t. Humboldtova (*S. humboldti*) a t. brýlového (*S. demersus*) (Akst *et al.*, 2002).

Krev byla odebrána 46 jedincům tučňáka galapážského na ostrovech Isabela a Ferdinanda a 46 jedincům tučňáka magellanského v oblasti Punta Tombo v Argentině. U obou tučňáků byla krev odebrána z křídelní žíly nebo z žíly na chodidle a následně byly vzorky uloženy do uchovávacího pufru. Mikrosatelitní markery byly navrženy pro každý ze 4 druhů rodu *Spheniscus* podle protokolu Armour *et al.* (1994). Dinukleotidové repetice obsahovalo 6 mikrosatelitních lokusů. PCR podmínky byly odlišné pro každý pár primerů. F primery byly fluorescenčně značeny nebo alternativou bylo do reakce přidat fluorescenčně značené nukleotidy. PCR produkty byly sekvenovány na ABI 377 automatickém DNA sekvenátoru s ROX značeným velikostním standardem (Applied Biosystems Inc).

U tučňáka magellanského byly 4 lokusy polymorfní (G2-2, G3-6, H2-6 a B3-2) a dále bylo určeno jestli lokusy jsou či nejsou v Hardy-Weinbergově rovnováze. Tyto lokusy byly testovány u 46 jedinců a bylo nalezeno 6–19 alel.

U tučňáka galapážského byly 3 mikrosatelitní lokusy polymorfní. Lokus G3-6 vykazoval odchylku od Hardy-Weinbergovy rovnováhy. Lokusy G3-6 a G3-2 byly odvozeny od tučňáka galapážského a lokus H2-6 byl odvozen od tučňáka Humboldtova. Na těchto lokusech byly nalezeny 2–3 alely v rámci populace u tučňáka galapážského z ostrovů Isabela a Ferdinanda. Nejfrekventovanější alely měly frekvenci 93,5–98,9 % z toho vyplývá, že tyto mikrosatelity nejsou u tučňáka galapážského vhodné pro populační analýzu (Akst *et al.*, 2002).

3.4.1.8 5 polymorfních mikrosatelitů u tučňáka kroužkového

U tučňáka kroužkového (*Pygoscelis adeliae*) bylo izolováno celkem 6 mikrosatelitních lokusů (Roeder *et al.* 2001). Krev byla odebrána 442 jedincům z 13 kolonií Antarktidy a přilehlých ostrovů. Vzorky krve byly umístěny do kapalného dusíku, nebo při teplotě $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ nebo při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Genomická DNA byla extrahována pomocí fenol-chloroformové metody (Sambrook *et al.*, 1989) nebo Progenome II kitu (Progen Industries). Dále byly vzorky DNA rozpuštěny ve vodě nebo v roztoku EDTA a uchovány při teplotě $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ nebo $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Byly sestaveny 2 genomické knihovny. První

genomická knihovna obsahovala DNA fragmenty v rozsahu 250–900 bp, které byly následně ligovány do plazmidu pUC18. Plazmidy byly transformovány do komplementních buněk DH5 α a nechaly se kultivovat na Luria-Bertani agarózovém médiu, které obsahovalo ampicilin. Kolonie byly z agarózového gelu přeneseny na nylonovou membránu a po hybridizaci se sondou došlo k identifikaci inzertů s repeticemi. U pozitivních klonů byly navrženy páry primerů pomocí programu PRIMER3 (Rozen *et Skaletsky*, 2000). Druhá genomická knihovna byla sestavena z DNA fragmentů o velikosti 300–600 bp. Fragmenty s obsahem repetice (AC)_n(GT)_n byly ligovány do plazmidu pUC18 a transformovány do MAX Eficiency buněk (Gibco BRL). Kolonie byly purifikovány a osekvenovány a pro amplifikaci mikrosatelitů byly vytvořeny páry primerů. Celkem bylo izolováno 6 mikrosatelitních lokusů. Autoři také úspěšně použili *cross-species* PCR amplifikaci lokusu HrU2 (*Hirundo rustica*) (Ellegren, 1992; Primmer *et al.*, 1996), který byl použit pro genotypování jedinců tučňáka kroužkového. Lokus TP500 byl použit pro populace ze západní Antarktidy a lokus HrU2 byl použit pro populace z východní Antarktidy.

5 mikrosatelitních lokusů bylo použito pro genotypizaci 422 DNA vzorků pocházejících od jedinců ze 13 kolonií. 9 kolonií prokázalo odchylku od Hardy-Weinbergovy rovnováhy. Počet alel se pohyboval v rozmezí od 4 (AM3) do 20 (AM13) na lokus. Celkem bylo identifikováno 69 alel.

3.4.1.9 7 polymorfních mikrosatelitů u tučňáka Humboldtova

U tučňáka Humboldtova bylo popsáno 7 mikrosatelitních lokusů (Schlosser *et al.*, 2003). Vzorky pro izolaci DNA pocházely od tučňáků z hnízdních kolonií z Peru a Chile. Izolace proběhla podle protokolu Garner *et al.* (2000) a Gautschi *et al.* (2000). Extrahovaná DNA byla štěpena pomocí *Tsp509I* (New England Biolabs). DNA fragmenty o velikosti 500–1000 bp byly izolovány a ligovány do TSPADLONG/TSPADSHORT linkerů (Tenzer *et al.*, 1999). PCR fragmenty byly hybridizovány s biotinylovanými probami obsahujícími CA repetice. Takto vzniklé produkty byly zachyceny na částicích Dynabeads M-280 Streptavidin (DYNAL, France), které byly pokryty streptavidinem. Následně byla provedena druhá PCR amplifikace, tyto obohacené fragmenty obsahující repetice byly klonovány pomocí Invitrogen TA cloning kitu. Pro navržení primerů byl použit software PRIMER3 (Rozen *et Skaletsky*, 2000). K charakterizaci a vizualizaci byl použit software DNA ANALYSIS SYSTEM, verze 4.3.9 (Beckman Coulter, Inc.). Bylo charakterizováno 7

polymorfních amplifikovaných lokusů, z toho 6 lokusů bylo v Hardy-Weinbergově rovnováze a jeden (Sh2Ca22) se od ní nepatrně odchyloval. Pomocí těchto mikrosatelitních lokusů bylo testováno dalších 8 druhů tučňáků: tučňák oslí (*Pygoscelis papua*), t. uzdičkový (*P. anartica*), t. skalní (*Eudyptes chrysocome*), t. žlutorohý (*E. chrysolophus*), t. patagonský (*Aptenodytes patagonicus*) a t. nejmenší (*Eudyptula minor*). Všechny 7 mikrosatelitních lokusů bylo polymorfních u tučňáka magellanského, brýlového, oslího, skalního a nejmenšího. U tučňáka patagonského byly lokusy Sh1Ca17 a Sh2Ca12 monomorfní. Tučňák žlutorohý měl monomorfní lokusy Sh1Ca12 a Sh1Ca17. U tučňáka uzdičkového vykazoval polymorfismus lokus Sh2Ca22, ostatní lokusy byly u tohoto druhu monomorfní. Počet alel nebyl v této studii uveden.

3.4.1.10 12 polymorfních mikrosatelitů pro tučňáka Humboldtova

Tým Schlosser *et al.* (2009) popsali a charakterizovali dalších 5 mikrosatelitních lokusů. Genomická DNA byla izolována z krve 336 jedinců ze 4 různých lokalit. Primery byly navrženy jako v předchozí studii (Schlosser *et al.*, 2003). Navrhli 28 párů primerů pro PCR amplifikaci. 12 produktů obsahovalo dinukleotidové repetice. Primery byly fluorescenčně označeny WellRed Beckman Coulter barvivem. Za použití DNA ANALYSIS SYSTEM, verze 4.3.9 (Beckman Coulter, Inc.) došlo k popsání, vizualizaci a charakterizaci všech genotypů. Počet alel se pohyboval v rozmezí od 4 do 16 na lokus.

3.4.2 Univerzální ptačí mikrosatelity

V minulosti byly pokusy o nalezení univerzálních ptačích mikrosatelitů většinou směřovány na konkrétní skupinu ptáků například pro pěvce. Průlomem v tomto snažení byl tým z univerzity v Sheffieldu. Autoři ve 2 pracech popsali téměř univerzální mikrosatelity napříč různými druhy třídy ptáci (Dawson *et al.*, 2010 a 2013).

3.4.2.1 EST mikrosatelity

Dawson *et al.* (2010) popsali postup k vytvoření nových sad primerů pro konzervované ptačí mikrosatelity napříč širokou škálou druhů ptáků. Většina nově vytvořených párů primerů byla identická pro zebříčku pestrou (*Taeniopygia guttata*) a kura bankivského (*Gallus gallus*), což jsou 2 taxonomicky vzdálené druhy ptáků. Zebříčka pestrá patří do řádu pěvci a kur bankivský do řádu hrabavých.

Celkem bylo vybráno 687 EST mikrosatelitních sekvencí, které se vyskytovaly u zebříčky pestré, z nichž 465 bylo homologních i u kura bankivského. Z nich autoři

vybrali 135 sekvencí, které nejlépe vyhovovaly zvoleným kritériím, pomocí nástroje BLAST.

Izolovali celkem 36 ptačích EST mikrosatelitních lokusů, které měly vysoký stupeň sekvenční homologie mezi zebříčkou pestrá a kura bankivským a vytvořili pro ně sady primerů. Komplementární sekvence k nim se nacházely u obou zmíněných druhů. 36 párů primerů pro amplifikaci 35 lokusů (pro jeden lokus byly navrženy dvě sady primerů) bylo testováno pomocí *cross-species* PCR amplifikace. 33 párů primerů bylo amplifikováno u 17 druhů pěvců a 99 % lokusů u 5 ostatních druhů. U pěvců bylo polymorfních 48 % mikrosatelitních lokusů a u ostatních druhů 21 % mikrosatelitních lokusů (Dawson *et al.*, 2010).

Navržené primery byly použity ke genotypizaci 52 druhů z 15 různých řádů ptáků. Testované druhy zahrnovaly 22 druhů z řádu pěvců a 30 druhů z dalších jiných řádů ptáků. Názvy lokusů jsou odvozeny od zdrojových druhů (kód TG znamená první latinské písmeno z rodového jména zebříčky a kura), čísla, která se nacházejí za TG, označují chromozom, na kterém je lokus lokalizován a poslední tři čísla označují pozici na chromozomu (Dawson *et al.*, 2010).

Očekávané velikosti alel u zebříčky pestré byly porovnávány s velikostí alel u kura bankivského a jejich velikost se lišila maximálně o 24 bp. Lokusy TG01-000, TG03-002 a TG13017 se lišily o 50–155 bp. Lokus TG01-086 neposkytl produkt ani v jednom případě, byl testován na 29 druzích. Pouze jeden lokus TG09-014 byl monomorfní u všech druhů pěvců a všech ostatních testovaných druhů. Pro lokus TG08-024 byly navrženy 2 sady primerů. První sada primerů byla amplifikována a poskytla velikost 243 bp, kdežto druhá pouze 128 bp. Navržené homologní sekvence byly srovnávány pomocí programu MEGA3 (Kumar *et al.*, 2004) a PRIMER3 (Rozen *et Skaletsky*, 2000).

3.4.2.2 Konzervované ptačí mikrosatelity

Dawson *et al.* (2013) pokračovali ve svých výzkumech a izolovali vysoce konzervované sekvence s vysokým počtem opakováním u zebříčky pestré a kura bankivského. Bylo izolováno 24 sad primerů podle homologních sekvencí zebříčky pestré a kura bankivského, které musely obsahovat alespoň 8 repetitivních jednotek u obou výše zmíněných druhů. Všechny primery byly zcela shodné s DNA zebříčky pestré a po zohlednění degenerovaných bází byla shoda s DNA kura bankivského

nejméně 86 %. Většina nových konzervovaných ptačích mikrosatelitů, označovaných jako CAM (*Conserved Avian Microsatellite*) byla amplifikována u všech 12 testovaných druhů, v průměru 94 % u pěvců a 95 % u ostatních druhů ptáků. Tyto nově vytvořené markery měly obzvláště vysokou hodnotu polymorfismu u pěvců, kolem 68 % a u ostatních druhů 42 % (Dawson *et al.*, 2013).

Amplifikované sekvence od zebřičky pestré byly dlouhé 421–487 bp. Páry primerů byly navrženy pomocí softwaru MEGA3 (Kumar *et al.*, 2003) a PRIMER3 (Rozen *et Skaletsky*, 2000). Z každé sady primerů, byl jeden primer označen fluorescenční barvivem HEX nebo 6-FAM (Dawson *et al.*, 2013).

4 Materiál a metody

4.1 Biologický materiál

Biologický materiál pro experimentální část mé bakalářské práce pocházel ze Zoologické zahrady Dvůr Králové. Krev byla odebrána 6 nepříbuzným jedincům pelikána afrického (*Pelecanus rufescens*) z tarzální žíly dolní končetiny. Pomocí fenol-chloroformové metody byla z krve izolována genomická DNA. Následně byla vyzolovaná DNA rozpuštěna v TE pufru a koncentrace se pohybovala v rozmezí 10–60 µg/ml.

4.2 Chemikálie

- Akrylamid (Sigma)
- *aTaq* DNA polymeráza (5 U/µl), M1241 (Promega)
- Bromfenolová modř (Serva)
- Deionizovaná voda
- dNTPs (100 mmol/l, 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)
- Močovina (Lachner)
- N, N'-metylenbisakrylamid (Serva)
- N, N, N', N'-tetramethylethylendiamin – TEMED (Serva)
- Peroxodisíran amonný (Serva)
- Rain-off – tekuté stěrače (Sheran)
- Thiosíran sodný (Lachema)
- Trishydroxymethylaminomethan – Tris (AppliChem)
- Uhličitan sodný (Lachner)

- Xylenová modř – Xylenecyanol FF (AppliChem)
- 3-methakryloxypropyltrimethoxysilan (Serva)

4.3 Roztoky

Akrylamid, 6% zásobní roztok

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

Dusičnan stříbrný, 0,1% roztok

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

Fix/stop roztok

- 800 ml deionizované vody
- 88 ml ledové kyseliny octové

Hydroxid sodný, 1mol/dm³ roztok

- 40 g hydroxidu sodného
- deionizovanou vodou doplnit do 1 l

Kyselina dusičná, 1% roztok

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

Molekulární lepidlo

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

Nanášecí pufr pro polyakrylamidové gely

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

Peroxodisíran amonný, 10% roztok

- 1 g peroxodisíranu amonného
- 10 ml deionizované vody
- rozpustit ve vodě a roztok uchovávat v lednici

Polyakrylamidový gel, 6% roztok

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

Reakční pufr pro *Taq* DNA polymerázu, 10x

- 80 ml deionizované vody
- 1,211 g Tris (nebo 6,7 ml Tris 1 mol/l)
- upravit pH pomocí HCl na hodnotu 9
- 3,73 g KCl
- 1 ml Triton X-100
- po rozpuštění doplnit na 100 ml

TBE pufr, 10x zásobní roztok

- 55 g kyseliny borité
- 108 g trishydroxymethylaminomethanu (Tris)
- 40 ml roztoku Na₂EDTA 0,5 mol/l, pH 8,0
- doplnit do 1 l deionizovanou vodou

Vývojka

- 24 g uhličitanu sodného

- 800 ml deionizované vody
- vychladit na teplotu nižší než 10 °C
- před použitím přidat 1,2 ml formaldehydu a 160 µl 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) 0,3 µl–1 ml (jednokanálové) (Thermo Labsystem)
- Mikropipety Nichipet EX 0,5 µl–1 ml (Nichiryo)
- Minicentrifuga CLE CSQSP (Clever Scientific)
- Minicentrifuga Prism mini (Labnet International)
- Negatoskop NEGA (Maneko)
- Sekvenační elektroforetická komůrka S2 (Whatman Biometra)
- Sušárna CAT 8050 (Contherm)
- Termocykler GenePro (BIOER Technology)
- Termocykler PTC 100-96 VHB (MJ Research)
- Termocykler TC XP (BIOER Technology)
- Třepačka Orbit 1 900 (Labnet International)
- Vortex mixer (Labnet International)
- Vortex MS2 (Ika)
- Výrobník deionizované a ultračisté vody typ 01 (AquaOsmotic)
- Výrobník ledu Icematic F100 Compact (Castel Mac)

4.5 PCR amplifikace mikrosatelitů

Pomocí PCR amplifikace byla genomická DNA 6 nepříbuzných jedinců pelikána afrického testována se 173 páry primerů, které byly navrženy pro amplifikaci mikrosatelitů. Z toho 113 párů primerů bylo navrženo pro amplifikaci u druhů z řádu tučňáci (viz Tabulka č. 2), 24 párů primerů pro konzervované ptačí mikrosatelity a 36 párů primerů pro EST ptačí mikrosatelity (viz Tabulka č. 3). V každém PCR reakčním

mixu byl vždy testován pouze jeden pár primerů. Složení PCR reakční směsi je uvedeno v Tabulce č. 1.

Tabulka č. 1: Složení PCR reakční směsi pro 6 vzorků.

Složky PCR mixu	Objem [μ l]
Deionizovaná voda	44,4
Reakční pufr 10x	6,7
Roztok $MgCl_2$ (25 mmol/l)	4,0
Roztok dNTPs (20 mmol/l)	0,7
Primer F (10 μ mol/l)	3,3
Primer R (10 μ mol/l)	3,3
<i>aTaq</i> DNA polymeráza (5 U/ μ l)	1,0

Postup přípravy PCR mixu:

1. Jednotlivé složky PCR mixu nechat rozmraznout, zvortexovat, centrifugovat a podle Tabulky č. 1 napipetovat do mikrozkušavek o objemu 1,5 ml a znova celou PCR reakční směs zvortexovat a zcentrifugovat.
2. Nachystat si 0,2ml PCR mikrozkušavky do stojánku po 6 a do každé z nich přidat pomocí osmikanálové pipety 1 μ l genomické DNA 6 nepříbuzných jedinců pelikána afrického a 9 μ l PCR reakční směsi.
3. Dobře uzavřené mikrozkušavky vložit do termocykleru a zvolit příslušný program. Teplota annealingu se liší podle párů primerů (podrobněji rozebráno v kapitole Výsledky). Teplotní a časový rozpis PCR reakce je následující:
 1. 94 °C ... 5 min
 2. 94 °C ...30 s
 - 50 °C ...30 s 35x
 - 72 °C... 30 s
 3. 72 °C ...7 min

Tabulka č. 2: Seznam mikrosatelitů od druhů z řádu tučňáci testovaných na polymorfismus u pelikána afrického.

Zdrojový druh	Mikrosatelity	Literární zdroj
Tučňák žlutorohý (<i>Eudyptes chrysolophus</i>)	Ech003, Ech005, Ech007, Ech008, Ech009, Ech010, Ech011, Ech012, Ech014, Ech020, Ech024, Ech029, Ech030, Ech036, Ech039, Ech050, Ech051, Ech060, Ech063, Ech065, Ech071, Ech081, Ech091, Ech113, Ech130	Ahmed <i>et al.</i> (2009)
Tučňák nejmenší (<i>Eudyptula minor</i>)	Emm 1, Emm 2, Emm 3, Emm 4, Emm 5, Emm 6, Emm 7, Emm 8 Em1, Em2, Em4, Em5, Em6, Em8, Em9, Em12, Em13, Em14, Em15, Em21, Em22, Em23, Em24, Em26, Em27, Em28, Em29, Em30	Billig <i>et al.</i> (2007) 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)
Tučňák uzdičkový (<i>P. antarctica</i>)	Pygantarc02, Pygantarc03, Pygantarc06, Pygantarc07, Pygantarc11, Pygantarc15, Pygantarc16, Pygantarc18, Pygantarc19, Pygantarc22, Pygantarc24, Pygantarc25, Pygantarc26, Pygantarc27, Pygantarc28, Pygantarc29	Kang <i>et al.</i> (2015)
Tučňák brýlový (<i>Spheniscus demersus</i>)	B3-2 PNN01, PNN03, PNN05, PNN06, PNN07, PNN08, PNN09, PNN12	Akst <i>et al.</i> (2002) Labuschang <i>et al.</i> (2013)
Tučňák Humboldtův (<i>S. humboldti</i>)	H2-6 Sh1Ca9, Sh1Ca12, Sh1Ca16, Sh1Ca17, Sh2Ca12, Sh2Ca21, Sh2Ca22 Sh2Ca31, Sh2Ca40, Sh2Ca49, Sh2Ca55, Sh2Ca58	Akst <i>et al.</i> (2002) Schlosser <i>et al.</i> (2003) Schlosser <i>et al.</i> (2009)
Tučňák magellanský (<i>S. magellanicus</i>)	G3-11, G3-6, G3-2	Akst <i>et al.</i> (2002)
Tučňák galapážský (<i>S. mendiculus</i>)	M1-11	

Tabulka č. 3: Seznam univerzálních ptačích mikrosatelitů testovaných na polymorfismus u pelikána afrického.

Zdroj	Mikrosatelity	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, TG04-041, TG04-061, TG05-030, TG05-046, 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)
Konzervované ptačí mikrosatelity	CAM-01, CAM-02, CAM-03, CAM-04, CAM-05, CAM-06, CAM-07, CAM-08, CAM-09, CAM-10, CAM-11, CAM-12, CAM-13, CAM-14, CAM-15, CAM-16, CAM-17, CAM-18, CAM-19, CAM-20, CAM-21, CAM-22, CAM-23, CAM-24	Dawson <i>et al.</i> (2013)

4.6 Elektroforetická separace PCR produktů

Elektroforetická separace využívá vyhřívané sekvenační elektroforetické komůrky S2 Whatman Biometra. Rozměr velkého skla byl 330 x 420 mm a rozměr malého skla 330 x 390 mm a tloušťka gelu byla 0,4 mm. K elektroforetické separaci dochází za denaturujících podmínek.

Pracovní postup:

1. Velké sklo umýt vodou a saponátem pomocí kartáčku. Poté sklo 2x opláchnout deionizovanou vodou a usušit ubrouskem. Dále velké sklo ošetřit přípravkem Rain off na ploše, která se bude dotýkat gelu. Po zaschnutí sklo opět umýt deionizovanou vodou a znova usušit.
2. Malé sklo nejprve umýt 2x deionizovanou vodou ze stříčky a vysušit ubrouskem a poté 2x opláchnout 96 % etanolem a usušit. Na ploše, která bude v kontaktu s gelem, je nutno sklo ošetřit roztokem molekulárního lepidla. Sklo se nechá 5 minut zaschnout a poté se očistí 4x 96% ethanolem.
3. Velké sklo položit do digestoře na polystyrenovou podložku ošetřenou plochou nahoru a po stranách přiložit 2 spacers, které mají tloušťku 0,4 mm. Na ně

položít malé sklo ošetřenou plochou dolů. Spacery urovnat tak, aby doléhaly k okrajům skla a zafixovat na delší straně pomocí 4 klipsů.

4. V kádince si připravit 6% polyakrylamidový gel. Vzniklý roztok opatrně rozmíchat a následně jej nalévat mezi velké a malé sklo. Nutno poklepávat na sklo druhou rukou, aby nedošlo k tvorbě bublin.
5. Po vyplnění prostoru mezi skly gelem zasunout hřebínek rovnou stranou do gelu asi 0,5 cm. Skla připevnit 4 klipsy a nechat polymerizovat minimálně 60 minut.
6. Po ztuhnutí gelu klipsy odstranit a opláchnout vodou pomocí kartáčku, aby došlo k odstranění zbytků gelu.
7. Menší sklo řádně osušit papírovými ubrousky, připevnit s velkým sklem a gelem do elektroforetické komůrky. Musí směřovat k hliníkové desce a hřebínek musí být nahoře. Poté přitáhnout úchytky držící skla.
8. Katodový i anodový prostor zalít 0,5x TBE pufrem po rysku a vytáhnout hřebínek. Vzniklý prostor promýt proudem 0,5x TBE pufru pomocí injekční stříkačky. Uzavřít katodový i anodový prostor, připojit elektrody ke zdroji stejnosměrného elektrického proudu a nechat gel nahřívat půl hodiny při výkonu 90 W, napětí 3000 V a proudu 150 mA.
9. Během 30 minut nahřívání gelu si připravit vzorky, ke kterým se přidá 5 μ l nanášecího pufru a 5 minut před nanášením vzorků vložit vzorky na 3 minuty do termocyklu, který je vytemperovaný na teplotu 96 °C. Po uplynutí 3 minut termocykler vypnout a denaturované vzorky vložit do nádoby s ledem.
10. Po 30 minutách vypnout zdroj, odpojit elektrody a opět umýt prostor proudem 0,5x TBE pufru injekční stříkačkou. Do prostoru mezi skly opatrně zasunout očištěný hřebínek do gelu asi 1 mm hluboko.
11. Pomocí osmikanálové pipety nanést 2 μ l každého vzorku. Po nanesení opět zavřít víko katodového prostoru, znovu připojit elektrody ke zdroji stejnosměrného proudu a nastavit výkon 70 W, napětí 3000 V a proud 150 mA. Takto nechat probíhat elektroforetickou separaci v rozmezí 90–180 minut.
12. Během elektroforetické separace přichystat fix/stop roztok, 1% roztok HNO₃ a vývojku. Vývojku řádně promíchat, aby došlo k rozpuštění uhličitanu sodného a umístit do ledničky.
13. Po uplynutí doby elektroforetické separace vypnout zdroj stejnosměrného elektrického proudu, odpojit elektrody, vypustit 0,5x TBE pufr z katodového a anodového prostoru. Povolit úchytky, vyjmout skla a položit na misku.

Vytáhnout spacers a pomocí nože oddělit od sebe skla, aby nedošlo k poškození gelu.

14. Menší sklo s gelem umístit do misky, která je určená na fix/stop roztok a roztok 1% HNO_3 . Misku položit na třepačku a zalít fix/stop roztokem. Nechat působit 20 minut.
15. Po 20 minutách slít fix/stop roztok zpět do baňky a sklo s gelem promýt důkladně 3x deionizovanou vodou.
16. Následně umístit misku zpět na třepačku a zalít 1% roztokem HNO_3 a nechat působit po dobu 4 minut. Po uplynutí času vylít roztok do odpadu a sklo s gelem 4x umýt deionizovanou vodou.
17. Sklo s gelem umístit do další fotomisky a zalít 0,1% roztokem AgNO_3 , do kterého je nutno přidat 1200 μl formaldehydu. Tento roztok nechat působit na gel po dobu 30 minut.
18. V průběhu působení 0,1% roztoku AgNO_3 si přichystat misku na deionizovanou vodu, do které se po 30 minutách vloží na 5–10 vteřin sklo s gelem. Poté sklo přenést do fotomisky na třepačce.
19. Sklo s gelem zalít vývojkou, do které bylo přidáno 1200 μl formaldehydu a 160 μl 1% roztoku $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$. Sledovat vyvíjení hnědočerných pruhů PCR produktů. Pokud jsou pruhy dostatečně zbarvené, zalít fix/stop roztokem, aby došlo k zastavení vyvolávání. Roztok nechat působit po dobu 2 minut a následně vylít roztok do odpadu.
20. Sklo s gelem umístit na 2 minuty do vody a poté ho přesunout do sušárny na 30 minut při teplotě 95 °C.
21. Usušený gel položit na negatoskop, kde se hodnotí. Gely je nutno naskenovat pro uchování informací.
22. Vyhodnocený gel namočit do roztoku NaOH o koncentraci 1 mol/l, kde dojde k odlepení gelu. Poté sklo umýt deionizovanou vodou a nechat uschnout. To může být následně znova použito.

5 Výsledky

V mé bakalářské práci jsem pomocí *cross-species* PCR amplifikace testovala polymorfismus u 6 nepříbuzných jedinců pelikána afrického (*Pelecanus rufescens*) pomocí 173 párů primerů. 113 párů primerů bylo izolováno od zástupců z řádu tučňáci a zbylých 60 párů primerů pro univerzální ptačí mikrosatelity, do kterých bylo zahrnuto 24 párů primerů pro konzervované ptačí mikrosatelity a 36 párů primerů pro EST ptačí mikrosatelity.

Všechny mikrosatelity jsem nejdříve testovala na základní teplotu annealingu 50 °C. PCR produkty byly poté separovány v polyakrylamidovém gelu po dobu 90 minut. Některé mikrosatelity po následné optimalizaci podmínek PCR neposkytovaly produkt, proto u nich byla teplota annealingu snížena až na 44 °C. V případě, že byl PCR produkt hodně intenzivní, bylo nutné teplotu annealingu zvýšit a to až na 65 °C, aby bylo možné produkty vyhodnotit. Polymorfní mikrosatelity byly dále testovány, abych zjistila ideální podmínky optimalizace PCR. U některých produktů byla nutná elektroforetická separace o délce až 180 minut, z důvodu jejich vysoké relativní molekulové hmotnosti. Dále bylo v některých případech nutno snížit koncentraci hořečnatých iontů (respektive MgCl₂) z počáteční 1,42 mmol/l na sedmiosminovou (1,24 mmol/l) a poté i na třičtvrtinovou koncentraci (1,07 mmol/l).

V případě lokusu G2-1 jsem opakovaně nezískala žádný produkt, a to ani při teplotě annealingu 44 °C. Ve všech ostatních případech jsem PCR produkt získala. Ve 160 případech byl produkt monomorfní, pouze 12 z testovaných mikrosatelitů poskytlo polymorfní produkt.

12 polymorfních mikrosatelitů spolu s jejich charakteristikou je uvedeno v Tabulce č. 4.

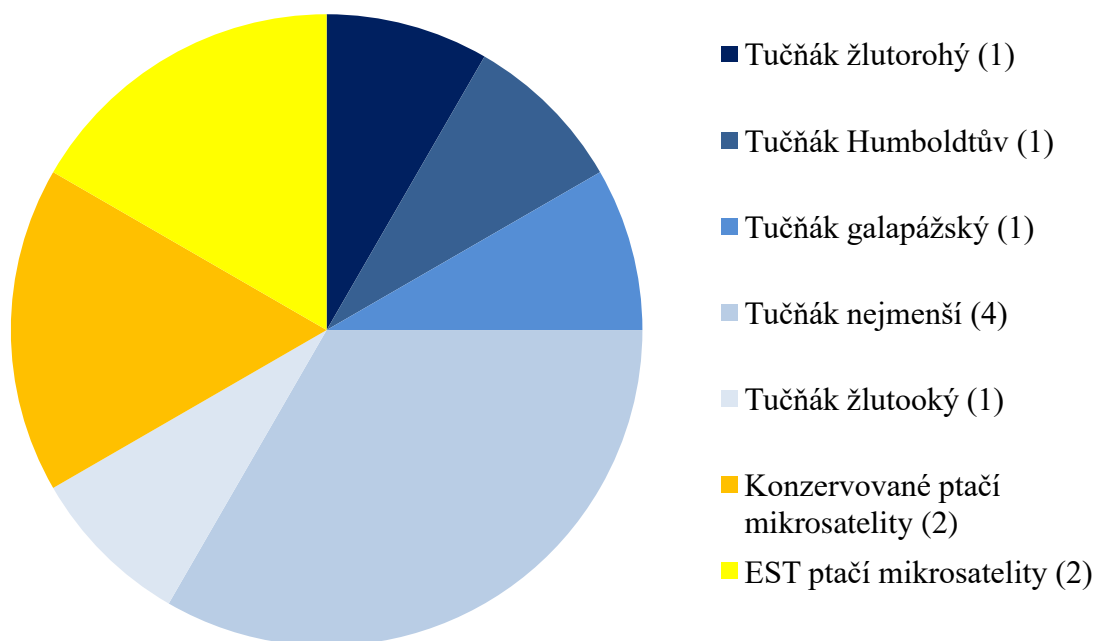
Tabulka č. 4: Charakteristika 12 polymorfních mikrosatelitů, které jsem testovala u 6 nepříbuzných jedinců pelikána afrického. V tabulce je uveden název lokusu a číslo v databázi GenBank, zdroj mikrosatelitů, sekvence primerů, jednotka repetice, počet alel, teplota annealingu a délka elektroforetické separace.

Název lokusu (GenBank - Accession no.)	Zdroj	Sekvence primerů (5'→3')	Jednotka repetice	N	T _a [°C]	ELFO [min]
Ech008 FM878339	Tučňák žlutorohý	F: TGGGAAGCGTAACGGCCTAA R: TCAGTCACTCTCCCATTTGTAGGG	CA	2	58	90
Emm 5 DQ837733	Tučňák nejmenší	F: ATTAAGTTGGCCTTGGGTTC R: TTTATGCTCCCTCATTCCAC	CTTT	2	44	90
Emm 6 DQ837734		F: TTGTTGGTCTGTATCACAAGG R: CAGGGAAGTGTGAGTAAATGG	CT	2	57	90
Emm 8 DQ852599		F: TGCACACTAGCAGATACGG R: GACAAATTGTGCTTGTGTCAGC	CA/CT	3	65	120
Em8 KM272226		F: GGTGCTGGGAGATGGCTTC R: ACGAAATGGTTTGGCTGGTG	AGAT	5	65	120
Man13 EU267111	Tučňák žlutooký	F: AACACATTTGACAGCCTG R: GTTATTCCAACACCAAGC	GT	3	57	90
Sh1Ca9 AF540006	Tučňák Humboldtův	F: AGCAGATGTGGGGGTTGTAG R: AAGTCAGTGTTATGCCAAGATACG	T/GT	2	47	90
M1-11 neuveдено	Tučňák galapážský	F: CTCGTTCTAGCCTTCCTGTTCC R: AGCCCAGTCTTCACAAGTGC	TG	2	46	90
CAM-07 neuveдено	Konzervované ptačí mikrosatelity	F: AAATGATGARTCTGGGTGAG R: CCATTTCCAAGWGATTTGC	CT	2	57	180
CAM-24 neuveдено		F: CCCACTTCAGTCTTCAGAGC R: TGGAGTATTTGGGATTGGAG	CA	2	60	90
TG04-041 CK316380	EST ptačí mikrosatelity	F: CTGAATTGTTGACCTTTGCTTAC R: GTCCTTTTAGAAAGCAGCACAG	AG/TG	2	63	120
TG11-011 CK308096		F: ACAAATAAGTACATCTATATCTGAAG R: TAAATACAGGCAACATTGG	AT/AA	2	56	120

U šesti nepříbuzných jedinců pelikána afrického (*Pelecanus rufescens*) jsem testovala pomocí *cross-species* PCR amplifikace 173 párů primerů a našla jsem 12 polymorfních mikrosatelitů. Úspěšnost nalezení polymorfních mikrosatelitů byla tedy 6,93 %.

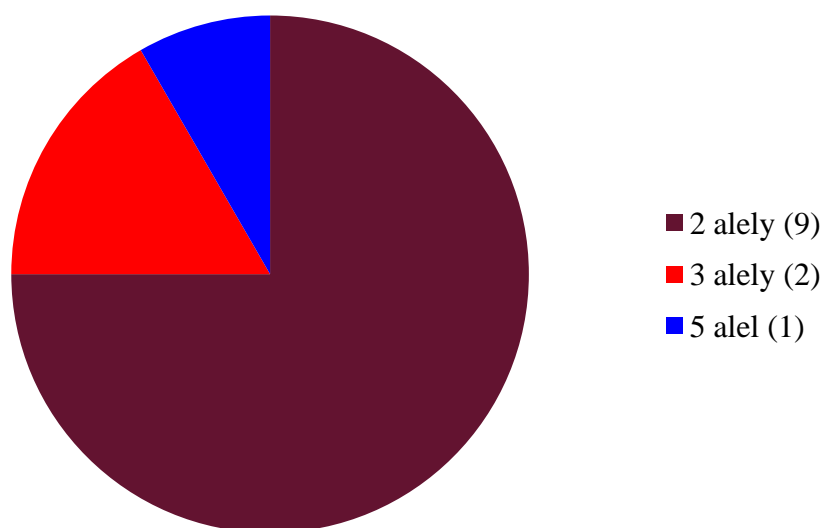
Z celkového počtu 113 mikrosatelitů odvozených od druhů řádu tučňáci bylo 8 polymorfních. Po jednom mikrosatelitu od tučňáka žlutorohého, tučňáka Humboldtova, tučňáka galapážského a od tučňáka žlutookého. Nejvíce polymorfních mikrosatelitů jsem našla od tučňáka nejmenšího a to 4. Úspěšnost nalezení polymorfních mikrosatelitů odvozených od druhů řádu tučňáci byla 7,08 %. Dále univerzálních ptačích mikrosatelitů bylo celkem 60, z nichž polymorfní produkt poskytly 4 mikrosatelity (úspěšnost nalezení byla 6,67 %). Z toho konzervovaných ptačích mikrosatelitů bylo celkem 24, z nich polymorfní produkt poskytly 2 mikrosatelity (úspěšnost nalezení byla 8,33 %) a EST ptačích mikrosatelitů jsem testovala 36 s tím, že jsem našla pouze 2 polymorfní mikrosatelity (úspěšnost nalezení byla 5,55 %). Nalezené polymorfní mikrosatelity vzhledem k jejich původu uvádím v Grafu č. 1.

Graf č. 1: Rozdělení 12 polymorfních mikrosatelitů nalezených u 6 nepříbuzných jedinců pelikána afrického vzhledem k jejich původu (respektive druhu od kterého byly odvozeny v případě tučňáků). Modrými odstíny jsou označeny mikrosatelity odvozené z řádu tučňáci, oranžovou barvou jsou zobrazeny konzervované ptačí mikrosatelity a žlutou barvou EST ptačí mikrosatelity. Čísla v závorkách udávají počty polymorfních mikrosatelitů odvozených od konkrétní skupiny (respektive druhu tučňáka).



Počet alel se pohyboval v rozmezí od 2 do 5, což uvádím v Grafu č. 2. Nejvíce alel (5) bylo zjištěno u mikrosatelitu Em8, který je odvozen od tučňáka nejmenšího. U devíti polymorfních mikrosatelitů bylo detekováno po 2 alelách (Ech008, Sh1Ca9, M1-11, Emm 6, Emm 5, CAM-07, CAM-24, TG04-041 a TG11-011). U dvou mikrosatelitů bylo objeveno po 3 alelách (Emm 8 a Man13).

Graf č. 2: Rozdělení 12 polymorfních mikrosatelitů nalezených u 6 nepříbuzných jedinců pelikána afrického vzhledem k počtu nalezených alel. Čísla v závorkách udávají počet mikrosatelitů u kterých jsem detekovala příslušný počet alel.



U všech 12 nalezených polymorfních mikrosatelitů byla provedena genotypizace, která je zaznamenána v Tabulce č. 5.

Tabulka č. 5: Genotypy 12 polymorfních mikrosatelitů u 6 nepříbuzných jedinců pelikána afrického.

Lokus	Zdroj	Alely	Genotypy					
Ech008	Tučňák žlutorohý	2	1/1	1/2	1/1	1/2	2/2	1/1
Sh1Ca9	Tučňák Humboldtův	2	1/2	1/1	1/1	1/2	1/2	1/2
M1-11	Tučňák galapážský	2	1/2	1/1	1/2	1/1	1/1	2/2
Emm 5	Tučňák nejmenší	2	1/1	1/1	1/1	1/1	1/2	1/2
Emm 6		2	1/1	1/1	2/2	1/2	1/1	1/1
Emm 8		3	1/3	2/2	1/2	2/3	3/3	1/3
Em8		5	3/3	5/5	1/2	3/5	4/5	5/5
Man13	Tučňák žlutooký	3	2/3	3/3	3/3	1/1	1/3	3/3
CAM-07	Konzervované ptačí mikrosatelity	2	2/2	2/2	2/2	2/2	1/1	1/2
CAM-24		2	2/2	2/2	2/2	1/2	2/2	1/2
TG04-041	EST ptačí mikrosatelity	2	1/1	1/2	1/2	1/2	1/2	1/2
TG11-011		2	1/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2

Některé z polymorfních mikrosatelitů, které jsem našla u 6 nepříbuzných jedinců pelikána afrického jsou zobrazeny na následujících elektroforetogramech a to mikrosatelity Ech 008 (Obrázek č. 2), Emm 6 (Obrázek č. 3), M1-11 (Obrázek č. 4) a Man13 (Obrázek č. 5).

Obrázek č. 2: Elektroforetogram mikrosatelitu Ech008. U 6 nepříbuzných jedinců pelikána afrického jsem našla 2 alely, které jsou na obrázku vyznačeny šipkami. Teplota *annealingu* byla 58 °C a doba separace byla 90 minut.



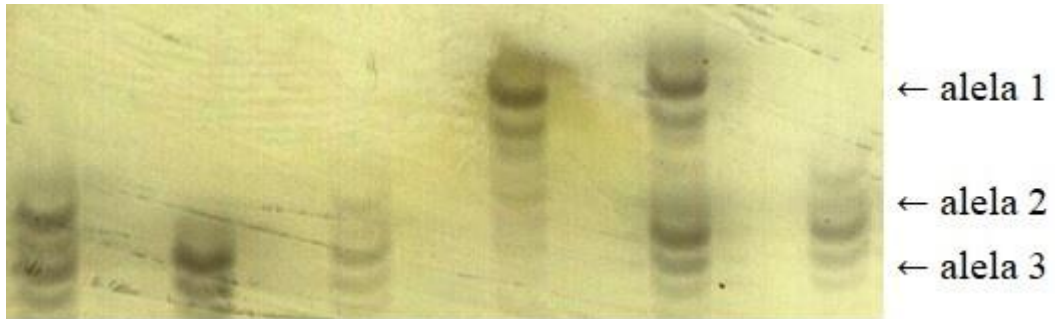
Obrázek č. 3: Elektroforetogram mikrosatelitu Emm 6. U 6 nepříbuzných jedinců pelikána afrického jsem našla 2 alely, které jsou na obrázku vyznačeny šipkami. Teplota *annealingu* byla 57 °C a doba separace byla 90 minut.



Obrázek č. 4: Elektroforetogram mikrosatelitu M1-11. U 6 nepříbuzných jedinců pelikána afrického jsem našla 2 alely, které jsou na obrázku vyznačeny šipkami. Teplota *annealingu* byla 46 °C a doba separace byla 90 minut.



Obrázek č. 5: Elektroforetogram mikrosatelitu Man13. U 6 nepříbuzných jedinců pelikána afrického jsem našla 3 alely, které jsou na obrázku vyznačeny šipkami. Teplota *annealingu* byla 57 °C a doba separace byla 90 minut.



6 Diskuze

V experimentální části mé bakalářské práce jsem se zabývala testováním polymorfismu pomocí *cross-species* PCR amplifikace u 6 nepříbuzných jedinců pelikána afrického (*Pelecanus rufescens*). Testovala jsem celkově 113 párů primerů, odvozených od 9 druhů tučňáků a to tučňáka uzdičkového (*Pygoscelis antarctica*), t. kroužkového (*P. adeliae*), t. žlutookého (*Megadyptes antipodes*), t. nejmenšího (*Eudyptula minor*) t. brýlového (*Spheniscus demersus*), t. Humboldtova (*S. humboldti*), t. galapážského (*S. mendiculus*), t. magellanského (*S. magellanicus*) a t. žltorohého (*Eudyptes chrysolophus*), z nichž jsem polymorfismus našla u 8 mikrosatelitů, a dále jsem testovala 60 univerzálních ptačích mikrosatelitů (36 konzervovaných ptačích mikrosatelitů a 24 EST ptačích mikrosatelitů), polymorfismus jsem našla u 4 z nich.

Boessenkool *et al.* (2008) charakterizovali 12 mikrosatelitních lokusů u tučňáka žlutookého, které vykazovaly polymorfismus u 43 jedinců pocházejících z Campbellova ostrova. Polymorfismus jsem našla u jednoho mikrosatelitu - Man13, u kterého jsem našla 3 alely. Autoři ve své práci uvádějí, že při T_a 48 °C našli 2 alely, přičemž já jsem tento mikrosatelit amplifikovala při T_a 57 °C.

Ahmed *et al.* (2009) popsali u tučňáka žltorohého celkem 25 mikrosatelitních lokusů amplifikovaných u 28 jedinců. Já jsem našla polymorfni jen jeden lokus - Ech008. Autoři našli 4 alely, ale teplotu annealingu neuvádějí. Já jsem při T_a 58 °C detekovala 2 alely.

U tučňáka nejmenšího bylo celkem ve 2 studiích popsáno 28 polymorfních mikrosatelitů.

Billig *et al.* (2007) popsali celkem 8 mikrosatelitních lokusů. Celkem jsem našla 3 mikrosatelity, které vykazovaly polymorfismus u 6 nepříbuzných jedinců pelikána afrického. Lokus Emm 5 amplifikovali při T_a 58 °C a našli 3 alely u 28 jedinců z Troubridgeova ostrova a z populace na Filipově ostrově u 28 jedinců našli 11 alel. Já jsem při T_a 44 °C našla 2 alely. Další lokus Emm 6 testovali při T_a 56 °C u 15 jedinců z Troubridgeova ostrova a našli 8 alel a u 21 jedinců pocházejících z Filipova ostrova detekovali pouze 3 alely. Já jsem u lokusu Emm 6 našla při T_a 57 °C 2 alely. Lokus Emm 8 amplifikovali při T_a 56 °C u 5 jedinců z Troubridgeova ostrova a u 26 jedinců

z Filipova ostrova, kde našli 3 alely. Stejně jako autoři jsem našla 3 alely při T_a 65 °C.

Grosser *et al.* (2015) objevili dalších 20 mikrosatelitních lokusů u tučňáka nejmenšího. Jediný polymorfní mikrosatelit amplifikovaný u 6 nepříbuzných jedinců pelikána afrického byl Em8. Autoři tento lokus amplifikovali při T_a 60 °C a našli celkem 10 alel. Já jsem při T_a 65 °C našla 5 alel.

Akst *et al.* (2002) charakterizovali u tučňáka magellanského 4 polymorfní mikrosatelitní lokusy. Já jsem při svém testování našla jeden polymorfní mikrosatelit (M1-11). Autoři získali monomorfní produkt při T_a 53 °C. Já jsem našla 2 alely, při T_a 46 °C.

Schlosser *et al.* (2003) našli 7 mikrosatelitních lokusů, které amplifikovali na 24 jedincích tučňáka Humboldtova. Já jsem našla jeden mikrosatelit, který vykazoval polymorfismus a to lokus Sh1Ca9, u něhož jsem získala produkt při T_a 47 °C a detekovala jsem u něho celkem 2 alely. Autoři amplifikovali tento lokus při T_a 56 °C a našli 5 alel.

Žádný polymorfní mikrosatelit se mi nepodařilo nalézt testováním mikrosatelitů od tučňáka uzdičkového, u kterého Kang *et al.* (2015) našli celkem 16 mikrosatelitních lokusů, ani od tučňáka brýlového, u něhož Labuschang *et al.* (2013) našli 8 polymorfních mikrosatelitů.

Dále jsem testovala 60 párů primerů pro amplifikaci univerzálních ptačích mikrosatelitů u 6 nepříbuzných jedinců pelikána afrického. Našla jsem celkem 2 polymorfní mikrosatelitní lokusy patřící do konzervovaných ptačích mikrosatelitů a 2 mikrosatelity, které se řadí do EST ptačích mikrosatelitů.

Dawson *et al.* (2010) charakterizovali EST ptačí mikrosatelity, přičemž našli 36 párů primerů pro 35 mikrosatelitů. Našla jsem celkem 2 mikrosatelity, které u 6 nepříbuzných jedinců pelikána afrického vykazovaly polymorfismus. U lokusu TG11-011, testovaného u 4 jedinců zebřičky pestré, stejně jako já autoři našli 2 alely při T_a 52 °C, já jsem použila teplotu *annealingu* 56 °C. U lokusu TG04-041, který autoři amplifikovali u 4 jedinců zebřičky pestré, stejně jako já autoři našli 2 alely, při teplotě *annealingu* 58 °C. Já jsem použila teplotu *annealingu* 63 °C. Tyto 2 polymorfní EST

ptačí mikrosatelity, které autoři testovali na 22 druzích ptáků jsem zaznamenala do Tabulky č. 6. Lokus TG04-041 byl polymorfní na 8 druzích testovaných ptáků a počet alel se pohyboval od 2 do 3. Lokus TG11-011 byl polymorfní u 15 testovaných druhů ptáků a počet alel byl od 2 do 4 alel.

Tabulka č. 6: EST ptačí mikrosatelity TG04-041 a TG11-011, které byly polymorfní u 6 nepříbuzných jedinců pelikána afrického (tato práce) s doplněnými údaji o polymorfismu u dalších 22 druhů ptáků (Dawson *et al.*, 2010). V tabulce je uveden testovaný druh, počet alel u jednotlivých druhů (písmeno M znamená, že je daný lokus monomorfní, písmeno P, že je daný lokus polymorfní) a v závorkách počet testovaných jedinců.

Druh	Lokus	
	TG04-041	TG11-011
Zebříčka pestrá (<i>Taeniopygia guttata</i>)	2 (4)	2 (4)
Linduška kanárská (<i>Anthus berthelotii</i>)	M (4)	M (1)
Vrabec domácí (<i>Passer domesticus</i>)	M (4)	2 (4)
Amada Gouldova (<i>Erythrura gouldiae</i>)	2 (4)	2 (4)
Sýkora koňadra (<i>Parus major</i>)	M (4)	M (4)
Sýkora modřinka (<i>Cyanistes caeruleus</i>)	M (4)	2 (4)
Straka americká (<i>Pica hudsonia</i>)	M (4)	M (4)
Sova pálená (<i>Tyto alba</i>)	M (4)	M (4)
Kos černý (<i>Turdus merula</i>)	M (4)	4 (4)
Rákosník velký (<i>Acrocephalus arundinaceus</i>)	2 (4)	2 (4)
Kolibřík rezavolesklý (<i>Selasphorus rufus</i>)	M (4)	M (4)
Popelač šedý (<i>Struthidea cinerea</i>)	M (4)	2 (4)
Kur bankivský (<i>Gallus gallus</i>)	M (4)	M (4)
Zvonek zelený (<i>Carduelis chloris</i>)	3 (20)	P (4)
Křivka obecná (<i>Loxia curvirostra</i>)	2 (16)	P (4)
Pěnkava obecná (<i>Fringilla coelebs</i>)	2 (20)	P (4)
Hýl obecný (<i>Pyrrhula pyrrhula</i>)	2 (23)	P (4)
Vlaštovka australská (<i>Petrochelidon ariel</i>)	M (4)	3 (4)
Sýkořice vínoprsá (<i>Paradoxornis webbianus</i>)	M (4)	3 (4)
Timálievec pruhokřídlý (<i>Pomatostomus ruficeps</i>)	3 (4)	2 (4)
Kulík mořský (<i>Charadrius alexandrinus</i>)	M (4)	M (4)
Agapornis růžohrdý (<i>Agapornis roseicollis</i>)	M (4)	2 (4)
Pelikán africký (<i>Pelecanus rufescens</i>)	2 (6)	2 (6)

Dawson *et al.* (2013) popsali celkem 24 párů primerů pro amplifikaci konzervovaných ptačích mikrosatelitů, které amplifikovali u dvou druhů - zebříčky pestré a kura bankivského. Testovala jsem u pelikána afrického všech 24 mikrosatelitů a našla jsem celkem 2 mikrosatelity, které vykazovaly polymorfismus. Dawson *et al.* (2013) amplifikovali u 12 jedinců zebříčky pestré lokus CAM-07 při T_a 56 °C a našli celkem 6 alel. Já jsem amplifikovala lokus CAM-07 u pelikána afrického při T_a 57 °C a našla jsem 2 alely. Další lokus, který vykazoval polymorfismus, byl CAM-24, který u 24 jedinců zebříčky pestré měl 6 alel. Já jsem u lokusu CAM-24, testovaného u pelikána afrického, získala produkt při T_a 60 °C a detekovala jsem 2 alely. Polymorfní konzervované ptačí mikrosatelity testované Dawson *et al.* (2013) u 12 druhů ptáků jsem uvedla do Tabulky č. 7. Lokus CAM-07 byl polymorfní u 5 testovaných druhů ptáků a počet alel se pohyboval od 3 do 6 na lokus. Lokus CAM-24 byl polymorfní u 5 testovaných druhů ptáků a počet alel se pohyboval od 2 do 6 na lokus.

Tabulka č. 7: Konzervované ptačí mikrosatelity CAM-07 a CAM-24, které byly polymorfní u 6 nepříbuzných jedinců pelikána afrického (tato práce) s doplněnými údaji o polymorfismu u dalších 12 druhů ptáků (Dawson *et al.*, 2013). V tabulce je uveden testovaný druh, název lokusu a počet alel vyskytujících se u jednotlivých druhů (písmeno M znamená, že daný lokus je monomorfní). V závorkách je uveden počet testovaných jedinců.

Druh	Lokus	
	CAM-07	CAM-24
Zebříčka pestrá (<i>Taeniopygia guttata</i>)	6 (12)	6 (12)
Vrabec domácí (<i>Passer domesticus</i>)	6 (12)	M (12)
Linduška kanárská (<i>Anthus berthelotii</i>)	M (4)	M (4)
Pěnkava obecná (<i>Fringilla coelebs</i>)	3 (4)	M (4)
Hýl obecný (<i>Pyrrhula pyrrhula</i>)	3 (4)	M (4)
Sýkora koňadra (<i>Parus major</i>)	M (3)	M (4)
Kos černý (<i>Turdus merula</i>)	M (3)	M (4)
Pokřovník zelený (<i>Acanthisitta chloris</i>)	3 (4)	2 (4)
Burňáček dlouhokřídlý (<i>Hydrobates leucorhous</i>)	M (6)	6 (6)
Sova pálená (<i>Tyto alba</i>)	M (3)	M (4)
Mandelík hajní (<i>Coracias garrulus</i>)	M (4)	4 (4)
Kur bankivský (<i>Gallus gallus</i>)	M (3)	M (4)
Pelikán africký (<i>Pelecanus rufescens</i>)	2 (6)	2 (6)

V rámci Laboratoře populační genetiky na Katedře buněčné biologie a genetiky PřF UPOL byly již mikrosatelity, které jsou známé od zástupců z řádu tučňáci a univerzální ptačí mikrosatelity, testovány *cross-species* PCR amplifikací na dalších 6 druzích ptáků kladu *Aequorlitorornithes* (nesyta indomalajského - Pechová (2014), potápky roháče - Filipová (2016), pelikána skvrnozobého - Šuláková (2017), plameňáka karibského - Zlochová (2017), plameňáka růžového - Klaclová (2018) a pelikána kadeřavého - Nádvorník, osobní sdělení). V Tabulce č. 8 jsou zaznamenány všechny polymorfnní mikrosatelity, které jsem detekovala já u 6 nepříbuzných jedinců pelikána afrického a porovnávala jsem je s těmito 6 bakalářskými pracemi.

Pechová ve své práci (2014) testovala pomocí *cross-species* PCR amplifikace 135 párů primerů u 6 nepříbuzných jedinců nesya indomalajského, z nichž 77 bylo navrženo pro mikrosatelity od zástupců z řádu tučňáci, z nichž našla celkem 5 polymorfnních mikrosatelitů. I když jsme testovaly stejné mikrosatelity, tak pouze jediný lokus Man13 vykazoval polymorfismus také v mé práci u 6 nepříbuzných jedinců pelikána afrického. Dále Pechová testovala 34 EST ptačích mikrosatelitů a našla jeden mikrosatelit, který vykazoval polymorfismus a 24 párů primerů, které byly odvozeny pro konzervované ptačí mikrosatelity, kde detekovala celkem 3 polymorfnní, z nich žádný nebyl polymorfnní u pelikána afrického. Podrobněji viz Tabulka č. 8.

Filipová (2016) testovala polymorfismus u 6 nepříbuzných jedinců potápky roháče a našla celkem 19 polymorfnních mikrosatelitních lokusů. Testovala 171 párů primerů. Od zástupců z řádu tučňáci našla 6 polymorfnních mikrosatelitů, přičemž lokus Emm 5 byl polymorfnní i u pelikána afrického. 7 polymorfnních EST ptačích mikrosatelitů a 5 polymorfnních konzervovaných ptačích mikrosatelitů. Lokus CAM-24 vykazoval polymorfismus i u 6 nepříbuzných jedinců pelikána afrického (viz Tabulka č. 8).

Šuláková (2017) testovala *cross-species* PCR amplifikací polymorfismus u 6 nepříbuzných jedinců pelikána skvrnozobého a našla celkem 14 polymorfnních mikrosatelitů. K dispozici měla 173 párů primerů, z nichž 113 pocházelo od zástupců z řádu tučňáci a našla 8 polymorfnních mikrosatelitů. U 36 párů primerů pro EST ptačí mikrosatelity našla 1 polymorfnní produkt a z konzervovaných ptačích mikrosatelitů polymorfismus vykazovalo 5. Lokusy Ech008, Emm 5, Emm 6, Emm 8, Em8 a Man13 jsem měla polymorfnní i já u 6 nepříbuzných jedinců pelikána afrického. Podrobněji viz Tabulka č. 8.

Zlochová (2017) testovala celkem 171 párů primerů u 6 nepříbuzných jedinců plameňáka karibského. Z řádu tučňáci bylo amplifikováno celkem 113 párů primerů, z nichž našla 16 polymorfních lokusů. Dále testovala celkem 58 párů primerů pro univerzální ptačí mikrosatelity kde našla 7 polymorfních mikrosatelitních lokusů. Pouze lokus CAM-24 vykazoval polymorfismus během mého testování u pelikána afrického. Podrobněji viz Tabulka č. 8.

Klaclová (2018) testovala pomocí *cross-species* PCR amplifikací 173 párů primerů. Polymorfismus testovala na 6 nepříbuzných jedincích plameňáka růžového. Celkem našla 24 polymorfních mikrosatelitních lokusů. 113 párů primerů bylo amplifikováno od zástupců z řádu tučňáci a 60 párů primerů pocházelo od univerzálních ptačích mikrosatelitů. Polymorfismus u pelikána afrického vykazovaly lokusy Emm 5 a Em8 od druhů z řádu tučňáci, dále pak lokus CAM-07 a CAM-24 z EST ptačích mikrosatelitů a TG04-041, jenž je řazen mezi konzervované ptačí mikrosatelity (viz Tabulka č. 8).

Tabulka č. 8: Srovnání mikrosatelitů pocházejících od druhů z řádu tučňáci a univerzálních ptačích mikrosatelitů, které byly polymorfní u pelikána afrického s výsledky získanými u dalších 6 druhů kladu *Aequorlornithes* (Pel. afr. - pelikán africký, tato práce, Pel. skv. - pelikán skvrnozobý, Šuláková (2017), Pel. kad. - pelikán kadeřavý - Nádvorník, osobní sdělení, Pl. kar. - plameňák karibský, Zlochová (2017), Pl. růž. - plameňák růžový, Klaclová (2018). P. roh. - potápka roháč, Filipová (2016), N. ind. - nesyt indomalajský, Pechová (2014)). Ve všech případech byly testy provedeny na 6 nepříbuzných jedincích. V tabulce je uveden název lokusu, testovaný druh a počet alel nalezených u jednotlivých druhů. Písmeno M znamená, že daný lokus byl monomorfní.

Lokus	Druh						
	Pel. afr.	Pel. skv.	Pel. kad.	Pl. kar.	Pl. růž.	P. roh.	N. ind.
Ech008	2	M	2	M	3	M	M
Sh1Ca9	2	M	M	M	M	M	M
M1-11	2	M	M	M	M	M	M
Emm 5	2	M	M	2	2	M	4
Emm 6	2	M	M	M	2	M	M
Emm 8	3	M	M	M	2	M	M
Em8	5	M	M	M	3	M	4
Man13	3	2	M	M	4	M	M
CAM-07	2	M	M	M	M	M	3
CAM-24	2	M	2	4	2	4	6
TG04-041	2	M	M	M	M	M	2
TG11-011	2	M	M	M	3	M	M

V nedokončené bakalářské práci, vedené mým školitelem (Nádvorník, osobní sdělení) bylo testováno pomocí *cross-species* PCR amplifikací 173 mikrosatelitních lokusů na 6 nepříbuzných jedincích pelikána kadeřavého. Z řádu tučňáci bylo amplifikováno celkem 113 mikrosatelitů a pro univerzální ptačí mikrosatelity bylo amplifikováno 60 mikrosatelitů. Celkem byly nalezené pouze 4 polymorfní mikrosatelitní lokusy, všechny se 2 alelami. Podrobněji viz Tabulka č. 8. U pelikána afrického vykazovaly polymorfismus jen lokusy Ech008 a CAM-24.

Z tabulky č. 8 vyplývá několik skutečností – žádný z uvedených mikrosatelitů nebyl polymorfní u všech 7 druhů ptáků. Za nejuniverzálnější mikrosatelit můžeme považovat CAM-24, který byl polymorfní u 6 ze 7 testovaných druhů, dále mikrosatelit Emm 5, který vykazoval polymorfismus u 4 ze 7 zmíněných druhů. Mikrosatelity Em8, Ech008 a Man13 byly polymorfní u 3 ze 7 testovaných druhů a mikrosatelity Emm 6, Emm 8, CAM-07, TG04-041 a TG11-011 byly polymorfní pouze u 2 ze 7 testovaných druhů. Mikrosatelity Sh1Ca9 a M1-11 byly polymorfní pouze u pelikána afrického, ale u žádného z dále testovaných druhů kladu *Aequorliornithes*.

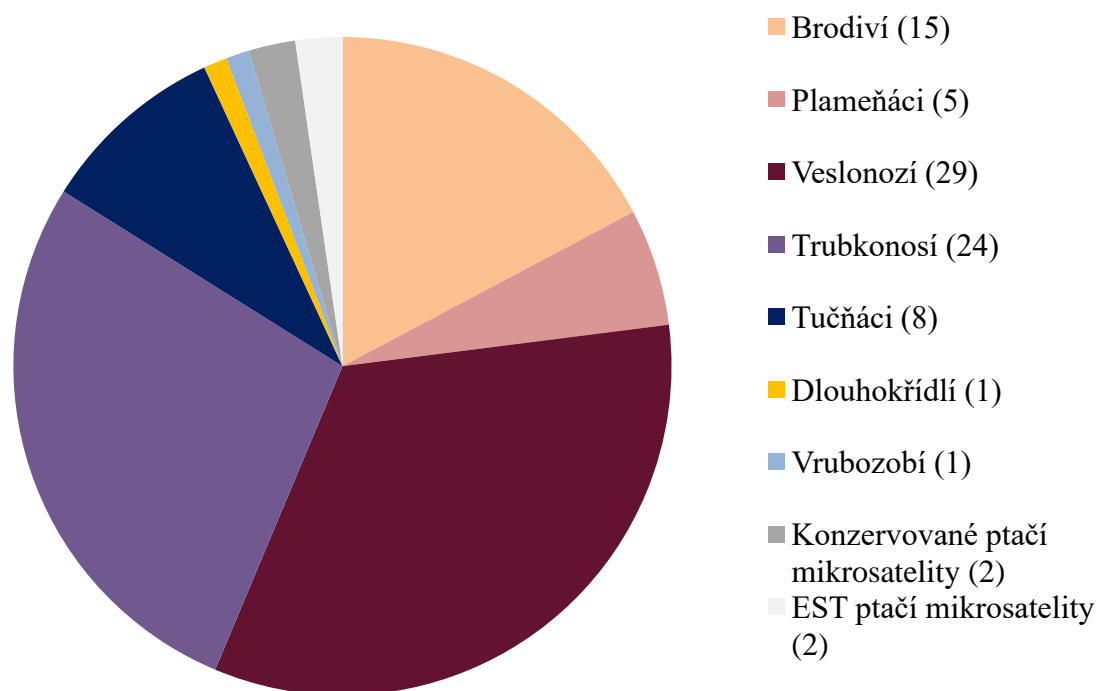
V rámci Laboratoře populační genetiky na Katedře buněčné biologie a genetiky PřF UPOL bylo doposud u pelikána afrického otestováno celkem 772 mikrosatelitů. 388 párů primerů od 8 různých řádů ptáků bylo testováno v bakalářských (Dvořáková, 2010; Chmelařová, 2010) a v diplomových pracích (Ranochová, 2008; Mikulová, 2010; Chmelařová, 2012), v nichž bylo celkem nalezeno 51 polymorfních mikrosatelitů, které byly vygenotypovány na 12 nepříbuzných jedincích pelikána afrického a následně byly otestovány pomocí softwaru CERVUS 3.0 (Kalinowski *et al.*, 2007). U těchto mikrosatelitů bylo dále zjištěno, zda jsou v souladu s Hardy-Weinbergovou rovnováhou, jakou mají vypovídací hodnotu a frekvenci výskytu nulových alel. Dále byly provedeny testy, zdali některý z těchto mikrosatelitů není vázaný na Z-chromozom. Pomocí softwaru GENOPOP 4.7.0 (Rousset, 2008) bylo zkoumáno, zda některé 2 z 51 polymorfních mikrosatelitů nejsou ve vazbě.

Dále bylo v rámci Laboratoře populační genetiky na Katedře buněčné biologie a genetiky otestováno zatím pouze na 6 nepříbuzných jedincích pelikána afrického 386 párů primerů pro amplifikaci polymorfních mikrosatelitů. V mé bakalářské práci jsem testovala 173 párů primerů pro amplifikaci polymorfních mikrosatelitů, 113 od druhů z řádu tučňáci a 60 pro univerzální ptačí mikrosatelity, kde jsem našla 12 polymorfních mikrosatelitů. Dále Kopečná (2018) testovala 213 párů primerů pro amplifikaci

polymorfních mikrosatelitů, z nichž 207 pocházelo od ptáků z řádu trubkonosí, 5 od ptáků z řádu dlouhokřídlí a 1 od zástupce z řádu pěvci, nalezla 24 polymorfních mikrosatelitů. Těchto celkem 36 mikrosatelitů by bylo vhodné v budoucnu též genotypovat na 12 nepříbuzných jedincích a analyzovat pomocí softwaru CERVUS 3.0 (Kalinowski *et al.*, 2007) a GENEPOP 4.7.0 (Rousset, 2008), aby se potvrdilo, zda jsou vhodné pro genetické studie u pelikána afrického.

Pokud těchto 36 polymorfních mikrosatelitů projde bezproblémově těmito testy, poté by bylo celkem pro pelikána afrického 87 nezávislých polymorfních mikrosatelitů. Zastoupení polymorfních mikrosatelitů, které byly doposud u pelikána afrického nalezeny, vzhledem k jejich původu, uvádím v Grafu č. 3.

Graf č. 3: Polymorfní mikrosatelity, které byly dosud u pelikána afrického testovány vzhledem k jejich původu (řád resp. skupina).



Během mé bakalářské práce bylo objeveno a popsáno dalších 34 mikrosatelitů od 3 druhů tučňáků rodu *Pygoscelis* (Vianna *et al.*, 2017). Dále 15 mikrosatelitů od ibisa skalního z čeledi ibisovití (Wirtz *et al.*, 2016), 15 mikrosatelitů od buňňáka réunionského (Danckwerts *et al.*, 2016) a 9 mikrosatelitů od buňňáka trinidadského (Booth Jones *et al.*, 2017) z čeledi burňákovití, 11 mikrosatelitů od kormorána neotropického z čeledi kormoránovití (Rodrigues *et al.*, 2017) a 11 mikrosatelitů od čápa bílého z čeledi čápoovití (Feldman Turjeman *et al.*, 2016), proto by bylo vhodné do budoucna provést podrobnější testy i těchto nově objevených mikrosatelitů.

Dále by bylo vhodné otestovat další mikrosatelity od dosud netestovaných řádů kladu Aequorlitorhithes. V první řadě by bylo vhodné otestovat mikrosatelity, které pocházejí od řádu dlouhokřídlí, aby se zjistilo, které z nich jsou vhodné pro populační analýzy. Od druhů tohoto řádu je známo téměř 400 mikrosatelitů, z toho již 7 bylo v naší laboratoři otestováno (Chmelařová, 2014; Kopečná, 2018), z nichž byl u pelikána afrického polymorfní mikrosatelit Apy07 (Chmelařová, 2014).

7 Závěr

V mé bakalářské práci jsem pomocí metody *cross-species* PCR amplifikace hledala polymorfní mikrosatelity u 6 nepříbuzných jedinců pelikána afrického (*Pelecanus rufescens*).

Celkem jsem testovala 173 párů primerů, z nichž 113 bylo odvozeno od 9 druhů tučňáků a to od tučňáka žlutorohého (*Eudyptes chrysolophus*), t. nejmenšího (*Eudyptula minor*), t. žlutookého (*Megadyptes antipodes*), t. kroužkového (*Pygoscelis adeliae*), t. uzdičkového (*P. antarctica*), t. brýlového (*Spheniscus demersus*), t. Humboldtova (*S. humboldti*), t. magellanského (*S. magellanicus*) a t. galapážského (*S. mendiculus*). Zbývajících 60 párů primerů bylo navrženo pro amplifikaci univerzálních ptačích mikrosatelitů. Ty zahrnovaly 36 párů primerů pro amplifikaci EST ptačích mikrosatelitů a 24 párů primerů pro konzervované ptačí mikrosatelity.

Pomocí *cross-species* PCR amplifikace se mi podařilo nalézt 12 polymorfních mikrosatelitů. Celková úspěšnost *cross-species* PCR amplifikace byla 6,93 %. Z řádu tučňáci bylo celkem 8 polymorfních mikrosatelitů (úspěšnost 7,08 %) – konkrétně po jednom mikrosatelitu od tučňáka žlutorohého, t. Humboldtova, t. galapážského, t. žlutookého a 4 mikrosatelity od tučňáka nejmenšího. Z univerzálních ptačích mikrosatelitů jsem našla 4 polymorfní mikrosatelity (úspěšnost nalezení polymorfních mikrosatelitů byla 6,67 %), z nichž 2 byly EST ptačí mikrosatelity a 2 konzervované ptačí mikrosatelity. Polymorfní mikrosatelity měly teplotu annealingu v rozmezí 44–65 °C a délka elektroforetické separace se pohybovala od 90 do 180 minut. Zaznamenala jsem 2–5 alel na lokus.

8 Seznam použitých zkratek

A	adenin
Bp	páry bází
C	cytosin
CAM	konzervované ptačí mikrosatelity (Conserved Avian Microsatellite)
cDNA	komplementární deoxyribonukleová kyselina
DNA	deoxyribonukleová kyselina
dNTPs	deoxyribonukleosid trifosfáty
EST	exprimované sekvenční úseky (Expressed Sequence Tag)
G	guanin
PCR	polymerázová řetězová reakce (Polymerase Chain Reaction)
SSRs	opakování jednoduchých sekvencí (Simple Sequence Repeats)
STRs	krátké tandemové repetice (Short Tandem Repeats)
T	thymin
T _a	teplota annealingu

9 Didaktická část

1) Zařazení tématu do výuky

Má bakalářská práce má širší rozsah, která je nad rámec RVP, a proto bych se spíše zabývala biologií pelikánů, která je řazena do biologie živočichů, což bylo také v této práci popsáno. Biologie pelikánů je vhodné téma při studiu střední školy a gymnázia.

2) Plán výuky

Na téma biologie pelikánů bych si stanovila jednu vyučovací hodinu. Na začátku hodiny bych žáky seznámila s jejich rozšířením, dále bych pelikány zařadila do systému ptáků. Následně bych popsala základní anatomické a morfologické znaky tohoto rodu. V další části hodiny bych žákům rozdala pracovní listy, kde by měli za úkol doplnit křížovku o pelikánu africkém a dále vybrat z obrázků siluet ptáků ty, kteří patří mezi vodní ptáky. Za správné vyplnění pracovního listu by žáci byli ohodnoceni známkou.

10 Přílohy

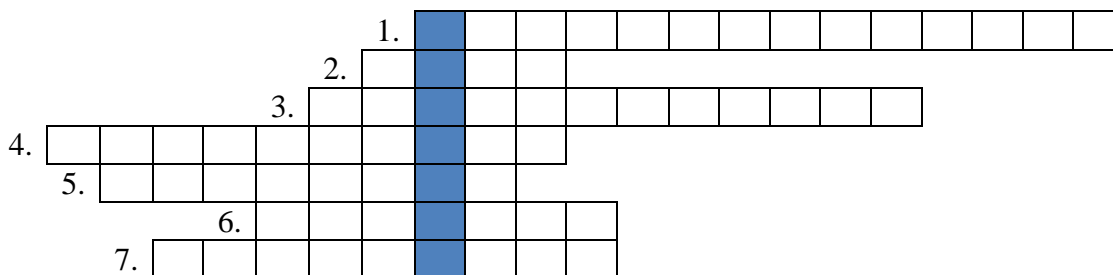
10.1 Pracovní list pro žáky k didaktické části

Úkol č. 1: Vyberte z obrázků siluet ptáků ty, kteří patří do vodních ptáků (Zdroj: <https://cz.depositphotos.com/4904322/stock-illustration-birds-silhouettes.html>, navštíveno dne 12. 12. 2018).



Úkol č. 2: Doplňte křížovku.

1. Speciálně uzpůsobené kosti k letu.
2. Barva peří pelikána afrického.
3. Čeleď, do které pelikáni patří.
4. Kontinent, na kterém se pelikáni nevyskytují.
5. Rod ryb, které pelikáni preferují jako svoji hlavní složku potravy.
6. Jiný název pro roztažitelný vak.
7. Řád, ve kterém se pelikán nachází.



11 Literatura

Alderton, D. (1995): Ptáci. Nakladatelský dům OP, Praha.

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.

Armour, J. A., Neumann, R., Gobert, S., Jeffreys, A. J. (1994): Isolation of human simple repeat loci by hybridization selection. *Human Molecular Genetics*, 3, 599–665.

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.

Booth Jones, K., Nicoll, M. A. C., Raisin, C., Dawson, D. A., Hipperson, H., Horsburgh, G. J., Groombridge, J. J., Ismar, S. M. H., Sweet, P., Jones, C. G., Tatayah, V., Ruhomaun, K., Norris, K. (2017): Widespread gene flow between oceans in a pelagic seabird species complex. *Molecular Ecology*, 26, 5716–5728.

Brown, L. H., Urban, E. K., Newman, K. (1982): The birds of Africa, Volume I, Academic Press Limited, London.

Danckwerts, D. K., Corré, S., Pinet, P., Le Corre, M., Humeau, L. (2016): Isolation and characterization of 15 polymorphic microsatellite loci for Barau's Petrel (*Pterodroma barau*), an endangered endemic of Réunion Island (Indian Ocean). *The Waterbird Society*, 39, 413–416.

Dawson, D. A., Ball, A. D., Spurgin, L. G., Martín-Gálvez, D., Stewart, I. R., Horsburgh, G. J., Potter, J., Molina-Morales, M., Bicknell, A. W. J., Preston, S. A. J., Ekblom, R.,

- Slate, J., Burke, T. (2013): High-utility conserved avian microsatellite markers enable parentage and population studies across a wide range of species. *BMC Genomics*, 14, 176.
- Dawson, D. A., Horsburgh, G. J., Küpper, C., Stewart, I. R. K., Ball, A. D., Durrant, K. L., Hansson, B., Bacon, I., Bird, S., Klein, Á., Krupa, A. P., Lee, J. W., Martín-Gálvez, D., Simeoni, M., Smith, G., Spurgin, L. G., Burke, T. (2010): New methods to identify conserved microsatellite loci and develop primer sets of high cross-species utility - as demonstrated for birds. *Molecular Ecology Resources*, 10, 475–494.
- Del Hoyo, J., Elliott, A., Sargatal, J., Imboden, C. (1992): Handbook of the birds of the world. Volume 1. Ostrich to Ducks. Lynx Editions, Barcelona.
- Dvořáková, B. (2010): Analýza polymorfních *cross-species* mikrosatelitů pro determinaci paternity u pelikána afrického (*Pelecanus rufescens*). Bakalářská práce. Depon in: Knihovna biologických oborů PřF UPOL Olomouc.
- Ellegren, H. (1992): Polymerase-Chain-Reaction (PCR) Analysis of Microsatellites: A New Approach to Studies of Genetic Relationships in Birds. *The Auk*, 109, 886–895.
- Faircloth, B. C. (2008): MSATCOMMANDER: Detection of microsatellite repeat arrays and automated, locus-specific primer design. *Molecular Ecology Resources*, 8, 92–94.
- Feldman Turjeman, S., Centeno–Cuadros, A., Nathan, R. (2016): Isolation and characterization of novel polymorphic microsatellite markers for the white stork (*Ciconia ciconia*): applications in individual-based and population genetics. *Animal Biodiversity and Conservation*, 39.1, 11–16.
- Filipová, K. (2016): *Cross-species* amplifikace mikrosatelitů z řádu tučňáci a konzervovaných ptačích mikrosatelitů u potápky roháče (*Podiceps cristatus*). Bakalářská práce. Depon in: Knihovna biologických oborů PřF UPOL Olomouc.
- Gaisler, J., Zima, J. (2007): Zoologie obratlovců. Academia, 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.

Goldstein, D. B., Schlötterer, C. (1999): *Microsatellites: Evolution and applications*. Oxford University Press, New York.

Gosler, A. (1994): *Atlas ptáků světa*, České vydání 1. Příroda a. s., 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.

Hedges, S. B., Sibley, C. G. (1994): Molecules vs. morphology in avian evolution: the case of the "pelecaniform" birds. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91, 9861–9865.

Chakraborty, R., Kimmel, M., Stivers, D. N., Davison, J., Dekka, R. (1997): Relative station rates at di-, tri-, and tetranucleotide microsatellite loci. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, 94, 1041–1046.

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

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

Jarvis, E. D., Mirarab, S., Aberer, A. J., Li, B., Houde, P., Li, C., Ho, S. Y. W., Faircloth, B. C., Nabholz, B., Howard, J. T., Suh, A., Weber, C. C., da Fonseca, R. R., Li, J., Zhang, F., Li, H., Zhou, L., Narula, N., Liu, L., Ganapathy, G., Boussau, B., Bayzid, S., Zavidovych, V., Subramanian, S., Gabaldón, T., Capella-Gutiérrez, S., Huerta-Cepas, J., Rekepalli, B., Munch, K., Schierup, M., Lindow, B., Warren, W. C., Ray, D., Green, R. E., Bruford, M. W., Zhan, X., Dixon, A., Li, S., Li, N., Huang, Y., Derryberry, E. P., Bertelsen, M. F., Sheldon, F. H., Brumfield, R. T., Mello, C. V., Lovell, P. V., Wirthlin, M., Schneider, M. P. C., Prosdocimi, F., Samaniego, J. A., Velazquez, A. M. V., Alfaro-Núñez, A., Campos, P. F., Petersen, B., Sicheritz-Ponten, T., Pas, A., Bailey, T., Scofield, P., Bunce, M., Lambert, D. M., Zhou, Q., Perelman, P., Driskell, A. C., Shapiro, B., Xiong, Z., Zeng, Y., Liu, S., Li, Z., Liu, B., Wu, K., Xiao, J., Yinqi, X., Zheng, Q., Zhang, Y., Yang, H., Wang, J., Smeds, L., Rheindt, F. E., Braun, M., Fjeldsa, J., Orlando,

L., Barker, F. K., Jönsson, K. A., Johnson, W., Koepfli, K. P., O'Brien, S., Haussler, D., Ryder, O. A., Rahbek, C., Willerslev, E., Graves, G. R., Glenn, T. C., McCormack, J., Burt, D., Ellegren, H., Alström, P., Edwards, S. V., Stamatakis, A., Mindell, D. P., Cracraft, J., Braun, E. L., Warnow, T., Jun, W., Gilbert, M. T. P., Zhang, G. (2014): Whole-genome analyses resolve early branches in the tree of life of modern birds. *Science*, 346, 1320–1331.

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.

Kalinowski, S. T., Taper, M. L., Marshall, T. C. (2007): Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. *Molecular Ecology*, 16, 1099–1106.

Kantartzi, S. K. (2013): *Microsatellites: methods and protocols*. *Methods in molecular biology*, v. 1006. Humana Press; Springer, New York.

Kennedy, M., Taylor, S. A., Nádvorník, P., Spencer, H. (2013): The phylogenetic relationships of the extant pelicans inferred from DNA sequence data. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 66, 215–222.

Klaclová, 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.

Kopečná, K. (2018): *Cross-species* amplifikace mikrosatelitů z řádu trubkonosí u pelikána afrického (*Pelecanus rufescens*). Bakalářská práce. Depon in: Knihovna biologických oborů PřF UPOL Olomouc.

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., Grobler, P., Dalton, D. L. (2013): Isolation and characterization of species-specific microsatellite loci in African penguin (*Spheniscus demersus*). *Conservation Genetics Resources*, 5, 169–171.

- Meglécz, E., Pech, N., Gilles, A., Dubut, V., Hingamp, P., Trilles, A., Martin, J.-F. (2014): QDD version 3.1: a user-friendly computer program for microsatellite selection and primer design revisited: experimental validation of variables determining genotyping success rate. *Molecular Ecology Resources*, 14, 1302–1313.
- Mikulová, V. (2010): Mikrosatelitové lokusy pro determinaci paternity u vybraných druhů pelikánů (*Pelecanus* spp.). Diplomová práce. Depon in: Knihovna biologických oborů PřF UPOL, Olomouc.
- Nicholls, J. A., Double, M. C., Rowell, D. M., 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.
- Perrin, C., Roy, M. S. (2000): Rapid and efficient identification of microsatellite loci from the sea urchin, *Evechinus chloroticus*. *Molecular Ecology*, 9, 2221–2223.
- Primmer, C. R., Møller, A. P., Ellegren, H. (1996): A wide-range survey of cross-species microsatellite amplification in birds. *Molecular Ecology*, 5, 365–378.
- Prum, R. O., Berv, J. S., Dornburg, A., Field, D. J., Townsend, J. P., Lemmon, E. M., Lemmon, A. R. (2015): A comprehensive phylogeny of birds (Aves) using targeted next-generation DNA sequencing. *Nature*, 526, 569–573.
- Ranochová, A. (2008): Analýza mikrosatelitových lokusů pro determinaci paternity u vybraných druhů pelikánů. Diplomová práce. Depon in: Knihovna biologických oborů PřF UPOL, Olomouc.

- Rodrigues, P., Micael, J., Hernandez, C., Verdugo, C. (2017): Characterisation of 11 microsatellite DNA markers from the Neotropic Cormorant (*Phalacrocorax brasilianus*). *Avian Biology Research*, 10, 45–48.
- Roeder, A. D., Marshall, R. K., Mitchelson, A. J., Visagathilagar, T., Ritchie, P. A., Love, D. R., Pakai, T. J., McPartlan, H. C., Murray, N. D., Robinson, N. A., Kerry, K. R. Lambert, D. M. (2001): Gene flow on the ice: genetic differentiation among Adélie penguin colonies around Antarctica. *Molecular Ecology*, 10, 1645–1656.
- Rousset, F. (2008): Genepop'007: a complete re-implementation of the genopop software for Windows and Linux. *Molecular Ecology Resources*, 8, 103–106.
- Rozen, S., Skaletsky, H. (2000): Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: Misener S., Krawetz S. A. (Eds.) *Bioinformatics Methods and Protocols. Methods in Molecular Biology*, Humana Press, Totowa, NJ, 132, 365–386.
- Sibley, C. G., Ahlquist, J. E. Monroe, B. L. (1988): A Classification of the Living Birds of the World Based on DNA-DNA Hybridization Studies. *The Auk*, 105, 409–423.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T. (1989): *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
- Schlosser, J. A., Garner, T. W. J., Dubach, J. M., McElligott, A. G. (2003): Characterization of microsatellite loci in Humboldt penguin (*Spheniscus humboldti*) and cross-amplification in other penguin species. *Molecular Ecology Notes*, 3, 62–64.
- 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.
- 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.
- Tautz, D. (1989): Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucleic Acids Research*, 17, 6463–6471.

Tautz, D., Trick, M., Dover, G. A. (1986): Cryptic simplicity in DNA is a major source of genetic variation. *Nature*, 322, 652–656.

Tenzer, I., degli Ivanissevich, S., Morgante, M., Gessler, C. (1999): Identification of microsatellite markers and their application to population genetics of *Venturia inaequalis*. *Phytopathology*, 89, 748–753.

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.

Weber, J. L., May, P. E. (1989): Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. *American Journal of Human Genetics*, 44, 388–396.

Weber, J. L., Wong, C. (1993): Mutation of human short tandem repeats. *Human Molecular Genetics*, 2, 1123–1128.

Wirtz, S., Böhm, C., Fritz, J., Hankeln, T., Hochkirch, A. (2016): Isolation of Microsatellite Loci by Next-Generation Sequencing of the Critically Endangered Northern Bald Ibis (*Geronticus eremita*), *Journal of Heredity*, 107, 363–366.

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

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