

Univerzita Palackého v Olomouci

Bakalářská práce

Olomouc 2018

Monika Klaclová

Univerzita Palackého v Olomouci

Přírodovědecká fakulta

Katedra botaniky



***Cross-species* amplifikace mikrosatelitů z řádu tučňáci
a konzervovaných ptačích mikrosatelitů
u plameňáka růžového (*Phoenicopterus roseus*)**

Bakalářská práce

Monika Klaclová

Studijní program: Matematika

Studijní obor: Matematika-Biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2018

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

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

V Olomouci dne 27. 07. 2018

podpis:

Monika Klaclová

Srdečně děkuji vedoucímu bakalářské práce RNDr. Petru Nádvořníkovi, Ph.D. za věnovaný čas a odborné rady, které mi poskytl při zpracování této bakalářské práce. Dále děkuji kolektivu Laboratoře populační genetiky na Katedře buněčné biologie a genetiky Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého v Olomouci za zpříjemnění pracovního prostředí.

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení: Monika Klaclová

Název práce: *Cross-species* amplifikace mikrosatelitů z řádu tučňáci a konzervovaných ptačích mikrosatelitů u plameňáka růžového (*Phoenicopterus roseus*)

Typ práce: Bakalářská práce

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

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

Rok obhajoby: 2018

Abstrakt

V této bakalářské práci jsem se zabývala hledáním polymorfních mikrosatelitů u plameňáka růžového (*Phoenicopterus roseus*) pomocí *cross-species* PCR amplifikace mikrosatelitů od zástupců z řádu tučňáci a univerzálních ptačích mikrosatelitů.

V teoretické části jsem se zabývala fylogenezí plameňáků a popisem řádu plameňáci (Phoenicopteriformes) a plameňáka růžového (*Phoenicopterus roseus*). Dále jsem se zabývala problematikou repetitivních sekvencí DNA, kde jsem se nejvíce soustředila na mikrosatelity. V další kapitole jsem se věnovala způsobům, kterými je možné hledat nové mikrosatelity a popsala jsem metodu PCR, která se využívá mimo jiné i při studiu mikrosatelitů. V poslední části rešerše jsem popsala způsob hledání všech mikrosatelitů, které byly doposud optimalizované od zástupců z řádu tučňáci, EST ptačích mikrosatelitů a konzervovaných ptačích mikrosatelitů.

V praktické části jsem testovala *cross-species* PCR amplifikací 173 párů primerů od zástupců z řádu tučňáci a univerzálních ptačích mikrosatelitů na genomické DNA šesti nepříbuzných jedinců plameňáka růžového. Testovaných 173 párů primerů pro amplifikaci 113 párů primerů odvozených od 9 druhů tučňáků, 36 párů primerů vytvořených pro 35 EST ptačích mikrosatelitů a 24 párů primerů pro amplifikaci konzervovaných ptačích mikrosatelitů. Nalezla jsem 24 párů primerů, které u plameňáka růžového amplifikují 25 polymorfních produktů. Z objevených polymorfních mikrosatelitních lokusů bylo 13 mikrosatelitů navržených pro řád tučňáci, 5 EST ptačích mikrosatelitů a 6 konzervovaných ptačích mikrosatelitů.

Klíčová slova: plameňák růžový (*Phoenicopterus roseus*), tučňák, mikrosatelit, *cross-species* PCR amplifikace

Počet stran: 59

Počet příloh: 1

Jazyk: Český

Bibliographic identification

Author's first name and surname: Monika Klaclová

Title of thesis: *Cross-species* amplification of microsatellites from Sphenisciformes and conserved avian microsatellites in Greater Flamingo (*Phoenicopterus roseus*)

Type of thesis: bachelor thesis

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

Supervisor: RNDr. Petr Nádvorník, Ph.D.

The year of presentation: 2018

Abstract

In this bachelor thesis I have been searching for polymorphic microsatellites in the Greater Flamingo (*Phoenicopterus roseus*) using cross-species PCR amplification of microsatellites from penguins and universal avian microsatellites.

In the theoretical part I was dealing with phylogeny of flamingos and a description of the order Flamingos (Phoenicopteriformes) and the Greater Flamingo (*Phoenicopterus roseus*). I also dealt with the issue of repetitive DNA sequences, where I focused mostly on microsatellite. In the next chapter I concentrated on ways to find new microsatellites and described the PCR method, which is used, among other things, for microsatellite studies. In the last part of the experimental part I have described the way of searching for all microsatellites, which have been optimized so far from representatives of the penguins order, EST bird microsatellites and conserved avian microsatellites.

In the practical part, I tested cross-species PCR amplification of 173 primer pairs from penguins and universal avian microsatellite species on the genomic DNA of six unrelated Greater Flamingos. The 173 tested primer pairs consisted of 113 primer pairs derived from 9 penguin species, 36 primer pairs designed for 35 EST avian microsatellite and 24 primer pairs designed for conserved avian microsatellite. I found 24 primer pairs that amplify 25 polymorphic products in the greater flamingo. I found out that 13 microsatellites, of the discovered polymorphic microsatellite loci, were designed for the penguin order, 5 EST avian microsatellites and 6 conserved avian microsatellites.

Keywords: Greater Flamingo (*Phoenicopterus roseus*), penguin, microsatellite, *cross-species* PCR amplification

Number of pages: 59

Number of appendices: 1

Language: Czech

Obsah

1	Úvod	1
2	Cíle práce	2
3	Literární přehled	3
3.1	Fylogeneze plameňáků.....	3
3.2	Řád plameňáci.....	5
3.3	Plameňák růžový.....	6
3.4	Repetitivní sekvence DNA.....	8
3.4.1	Rozptýlené repetice DNA	8
3.4.2	Tandemové repetice DNA.....	9
3.5	Hledání mikrosatelitových lokusů.....	10
3.5.1	Metoda PCR.....	11
3.6	Mikrosatelity pro druhy z řádu tučňáci	12
3.6.1	Mikrosatelity pro tučňáky rodu <i>Eudyptes</i>	13
3.6.2	Mikrosatelity pro tučňáky rodu <i>Eudyptula</i>	15
3.6.3	Mikrosatelity pro tučňáky rodu <i>Megadyptes</i>	16
3.6.4	Mikrosatelity pro tučňáky rodu <i>Pygoscelis</i>	16
3.6.5	Mikrosatelity pro tučňáky rodu <i>Spheniscus</i>	19
3.7	EST ptačí mikrosatelity.....	22
3.8	Konzervované ptačí mikrosatelity.....	23
4	Materiál a metody	24
4.1	Biologický materiál.....	24
4.2	Použité chemikálie	24
4.3	Použité roztoky	25
4.5	Amplifikované mikrosatelitové lokusy u plameňáka růžového	27
4.6	PCR amplifikace mikrosatelitové DNA.....	29
4.7	Elektroforetická separace PCR produktů	30
5	Výsledky	33
6	Diskuze	38
7	Závěr	48
8	Literatura	49
	Seznam symbolů a zkratek	56
	Seznam obrázků	57
	Seznam tabulek	58
	Přílohy	59

1 Úvod

Mikrosatelity jsou krátké tandemové repetice DNA vyskytující se v genomech prokaryotických i eukaryotických organismů. Mikrosatelity podléhají rychlým mutacím, a tedy vykazují vysoký stupeň polymorfismu. Studují se pomocí polymerázové řetězové reakce a využívají se jako genetické markery v genetických studiích, především v populační genetice, genetickém mapování a ve studiích molekulární evoluce.

V rámci Laboratoře populační genetiky Katedry buněčné biologie a genetiky PřF UPOL byly již u plameňáka růžového (*Phoenicopterus roseus*) testovány mikrosatelity od fylogeneticky příbuzných druhů z řádů brodiví, potápky, potáplice, trubkonosí, tučňáci a veslonoží, které jsou řazeny spolu s plameňáky do kladu Aequorlitorornithes, a několik málo mikrosatelitů izolovaných pro zástupce z řádu dlouhokřídlí, pěvci a vrubozobí.

V této bakalářské práci otestuji technikou *cross-species* PCR amplifikace mikrosatelity, které amplifikovaly polymorfní lokusy u zástupců z řádu tučňáci, a univerzální ptačí mikrosatelity. Testováno bude 113 párů primerů z řádu tučňáci (*Sphenisciformes*), 36 párů primerů pro EST ptačí mikrosatelity a 24 konzervovaných ptačích mikrosatelitů na DNA 6 nepříbuzných jedinců plameňáka růžového.

2 Cíle práce

1. Shromáždění dostupných literárních zdrojů.
2. Vypracování rešerše na téma bakalářské práce.
3. PCR amplifikace genomické DNA 6 nepříbuzných jedinců plameňáka růžového (*Phoenicopterus roseus*) pomocí *cross-species* primerů od zástupců z řádu tučňáci a univerzálních ptačích mikrosatelitů.

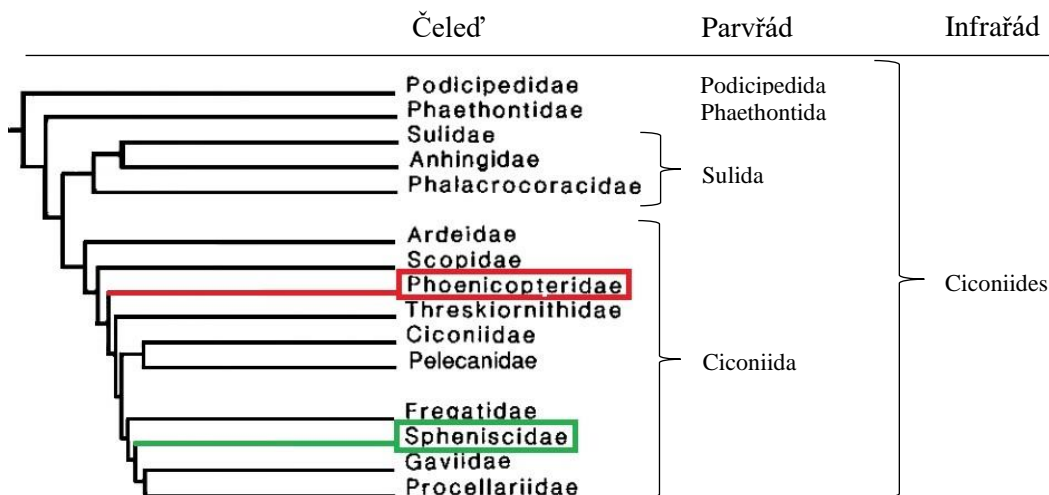
3 Literární přehled

3.1 Fylogeneze plameňáků

Evoluce ptáků a jejich zařazení do systému je už mnoho let vědecky nevyřešenou otázkou. Ptáci byli tradičně rozdělováni do taxonů podle společných morfologických znaků (Gaisler *et Zima*, 2007).

V osmdesátých letech sestavili Sibley *et al.* (1988) na základě DNA-DNA hybridizace fylogenetický strom, ve kterém třídu ptáci (*Aves*) rozdělili na infratřídy Eoaves a Neoaves. Jak je vidět na obrázku č. 1, čeleď plameňákovití (*Phoenicopteridae*), volavkovití (*Ardeidae*), kladivoušovití (*Scopidae*), ibisovití (*Threskiornithidae*), čápoovití (*Ciconiidae*), pelikánovití (*Pelecanidae*), fregatkovití (*Fregatidae*), tučňákovití (*Spheniscidae*), potáplicovití (*Gaviidae*) a buňňákovití (*Procellariidae*), tvoří parvřád Ciconiida. Parvřád Ciconiida společně s čeledmi kormoránovití (*Phalacrocoracidae*), potápkovití (*Podicipedidae*), faetonovití (*Phaethontidae*), terejovití (*Sulidae*) a anhingovití (*Anhingidae*) tvoří infrařád Ciconiides. Sesterským kladem Ciconiides je infrařád Falconides, kam patří např. krahujcovití a sokolovití (Sibley *et al.*, 1988).

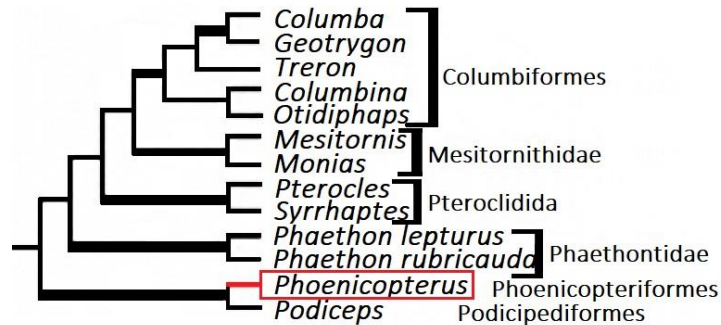
Obrázek č. 1: Infrařád Ciconiides podle Sibley *et al.* (1988) se zvýrazněnými čeledmi plameňákovití (*Phoenicopteridae*) a tučňákovití (*Spheniscidae*).



Hackett *et al.* (2008) přišli s výrazně odlišným systémem třídy ptáků. Třídu ptáci dělí na běžce (*Palaeognathae*) a letce (*Neognathae*). Letce dále rozdělili na klady Galloanserae a Neoaves. Neoaves pak člení na Coronaves, kam patří např. vodní ptáci, a Metaves. Jak lze vidět na obrázku č. 2, plameňáky se sesterským kladem potápky (*Podicipediformes*) řadí do Metaves, kam patří spolu s řády lelkové (*Caprimulgiformes*), krátkokřídlí

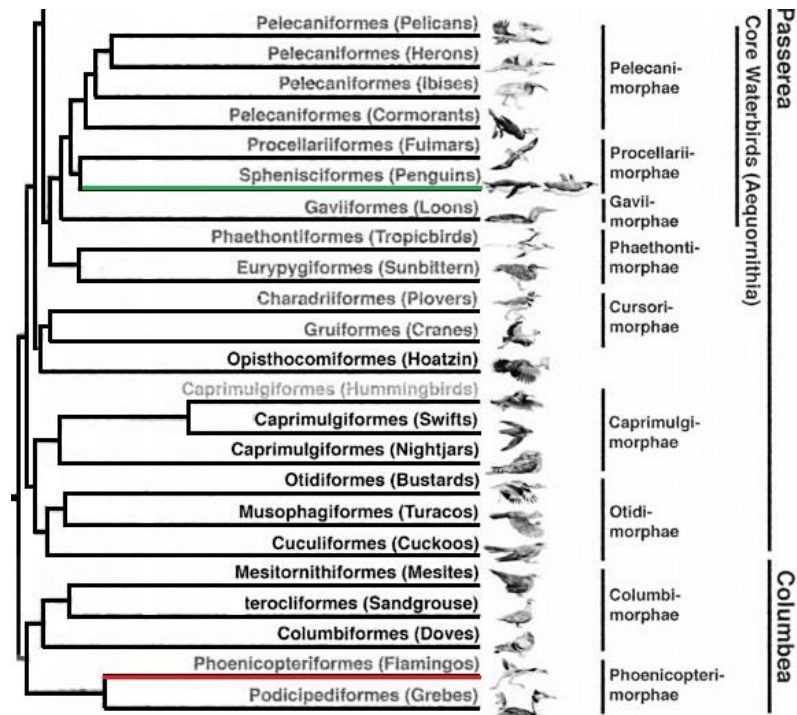
(Gruiformes), měkkozobí (Columbiformes), a čeledmi mesitovití (Mesitornithidae), stepokurovití (Pteroclididae) a faetonovití (Phaethontidae).

Obrázek č. 2: Část kladu Metaves zahrnující plameňáky – výřez kladogramu ptáků (Hackett *et al.*, 2008).



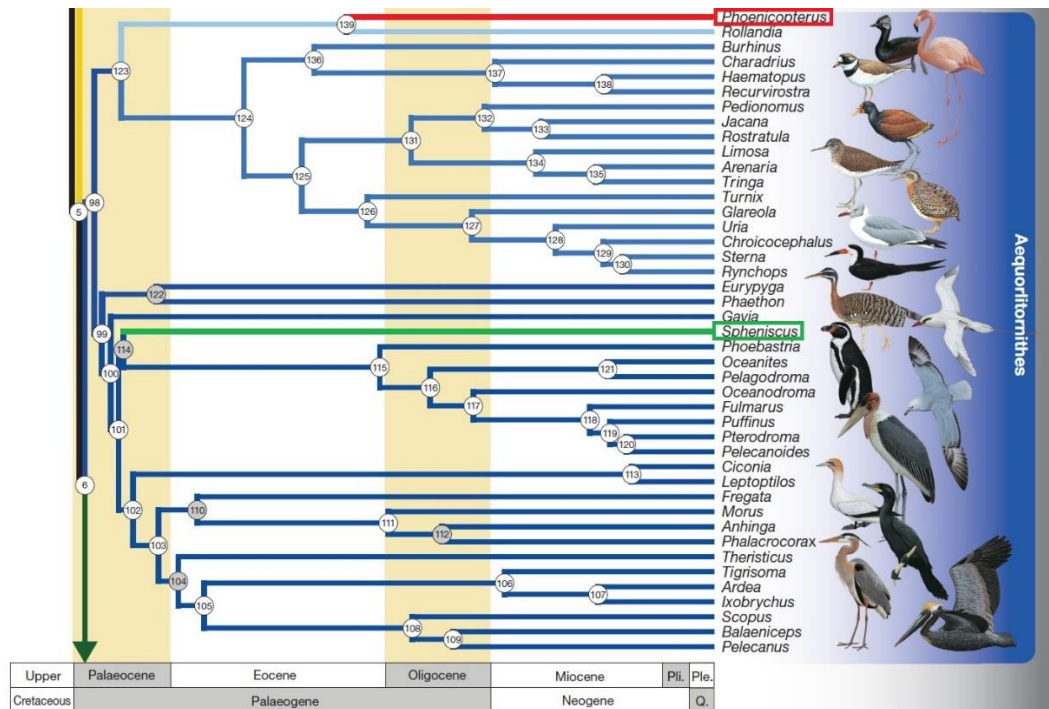
V roce 2014 provedli Jarvis *et al.* (2014) sekvenaci genomů 48 ptačích druhů, které představují všechny řády kladu Neoaves a zveřejnili nový kladogram, který Neoaves dělí na Columbea a Passerea. Plameňáci a jejich sesterský řád potápky, patřící do nadřádu Phoenicopterimorphae, jsou sesterským kladem nadřádu Columbimorphae (viz obrázek č. 3) (Jarvis *et al.*, 2014).

Obrázek č. 3: Zařazení plameňáků do kladu Columbea dle Jarvis *et al.* (2014) se zvýrazněnými řády plameňáci (Phoenicopteriformes) a tučňáci (Sphenisciformes).



O rok později Prum *et al.* (2015) osekvenovali genomy 198 druhů ptáků a sestavili fylogenetický strom, který nepotvrdil rozdělení Neoaves na Columbea a Passerea. Plameňáci a sesterský řád potápky řadí do nové skupiny Aequorlitorornithes (viz obrázek č. 4), kam patří všichni vodní ptáci s výjimkou jeřábů, chřástalů a řádu vrubozubí (Anseriformes).

Obrázek č. 4: Výřez kladogramu se zvýrazněním plameňáků a tučňáků – zařazení plameňáků do kladu Aequorlitorornithes podle Prum *et al.* (2015).



3.2 Řád plameňáci

Monotypický řád plameňáci (Phoenicopteriformes) zahrnuje čeleď plameňákovití (Phoenicopteridae), kterou tvoří 6 recentních druhů. Čeleď plameňákovití se člení na 3 rody – rod *Phoeniconaias*, kam patří plameňák malý (*P. minor*), rod *Phoenicoparrus*, kam spadá plameňák andský (*P. andinus*) a plameňák Jamesův (*P. jamesi*) a rod *Phoenicopterus*, do kterého jsou řazeny druhy plameňák růžový (*P. roseus*), karibský (*P. ruber*) a chilský (*P. chilensis*) (del Hoyo *et al.*, 2018). V devadesátých letech řadili del Hoyo *et al.* (1992) do rodu *Phoenicopterus* pouze plameňáka chilského (*P. chilensis*) a plameňáka růžového (*P. ruber*), kterého členili na poddruhy plameňák růžový (*P. ruber roseus*) a plameňák karibský (*P. ruber ruber*).

Areál plameňáků zahrnuje středoamerický poloostrov Yucatán, sever a jih Jižní Ameriky a Galapážské souostroví. V Evropě jsou plameňáci rozšíření na jihu

Portugalska, Španělska a Francie. Dále se plameňáci vyskytují téměř ve všech pobřežních státech Afriky, na Středním východě a v Indii (del Hoyo *et al.*, 2018). Tito ptáci obývají mělké zálivy, laguny a jezera, které jsou obvykle slané, brakické nebo alkalické (del Hoyo *et al.*, 1992).

Plameňáci jsou vysokonozí vodní ptáci, vysocí 90–155 cm. V poměru k dlouhému krku, který je tvořen sedmnácti krčními obratli, mají malou hlavu. Společným znakem plameňáků je zajímavě utvořený zobák, který je v půli zalomený a směřuje šikmo dopředu dolů. Pomocí rohovitých lamel, které jsou umístěny na vnitřních stranách čelistí a na jazyku, filtrují plameňáci potravu z vody a bahna (del Hoyo *et al.*, 1992). Podle druhu přijímané potravy lze plameňáky rozdělit do dvou skupin – skupina, kam patří rod *Phoenicopterus*, se živí převážně členovci a měkkýši a potravou druhé skupiny, která zahrnuje rody *Phoeniconaias* a *Phoenicoparrus*, je fytoplankton – zelené řasy, sinice a rozsivky (Wyss *et Wenker*, 2014). Odlišný druh potravy plameňáků určuje způsob, jakým potravu loví. Plameňáci, kteří se živí fytoplanktonem, loví potravu u břehu nebo na hladině vody a otáčením hlavy ze strany na stranu filtrují potravu. Naopak rod *Phoenicopterus*, který se živí bezobratlými živočichy, loví v hlubší vodě. Kopáním nohou víří dno a potravu loví v bahně (del Hoyo *et al.*, 1992).

Tito monogamní ptáci hnízdí v koloniích. Hnízdo, které je tvořeno bahnem, kamením a rostlinným materiálem, má tvar komolého kužele. Samice snáší jedno bílé vejce. Inkubace trvá 27 až 31 dní a samice se v sezení střídá se samcem. Svě nidikolní mládě plameňáci rozpoznávají od ostatních v kolonii pomocí hlasu. Mláďata mají bílošedou barvu a jejich typické růžové až červené zbarvení získávají příjmem karotenoidních pigmentů, které jsou obsaženy v jejich potravě (del Hoyo *et al.*, 1992). Pigment kanthaxanthin je zodpovědný nejen za zbarvení peří, ale primárně je silným antioxidantem. Akumuluje se v peří a ve vaječném žloutku (Wyss *et Wenker*, 2014).

3.3 Plameňák růžový

Plameňák růžový (*Phoenicopterus roseus*) je nejznámějším a největším zástupcem řádu plameňáci. Jeho taxonomické zařazení dle Gaisler *et Zima* (2007) je následující:

Říše:	živočichové (Animalia)
Kmen:	strunatci (Chordata)
Podkmen:	obratlovci (Vertebrata)
Třída:	ptáci (Aves)
Podtřída:	letci (Neognathae)

Řád:	plameňáci (Phoenicopteriformes)
Čeleď:	plameňákovití (Phoenicopteridae)
Rod:	plameňák (<i>Phoenicopus</i>)
Druh:	plameňák růžový (<i>Phoenicopus roseus</i>)

Plameňák růžový obývá území na jihu Španělska a Francie, na východě Kazachstánu, v pobřežních státech Afriky, na Blízkém východě, v Indii a na Srí Lance (del Hoyo *et al.*, 1992). Biotopy plameňáka jsou laguny, močály, jezera, stepní solné půdy a rýžová pole, kde vyhledává živočišnou a rostlinnou stravu. U tohoto ptáka je pohlavní dimorfismus. Samec je průměrně o 20 % vyšší a těžší než samice. Dospělý pták je bílý s růžovým odstínem, který je nejintenzivnější na hlavě a krku. Křídla jsou šarlatová s černými letkami, jak lze vidět na obrázku č. 5. Stání na jedné noze je typické pro většinu ptáků, avšak díky dlouhým nohám plameňáka je to nápadnější. Tento postoj slouží k odpočinku, při kterém mají plameňáci dozadu stočený krk a zobák schovaný v peří mezi lopatkami (Johnson *et Cézilly*, 2009).

Obrázek č. 5: Plameňák růžový (*Phoenicopus roseus*) (Foto: Hlásek, 2011).



Plameňáci si vybírají partnera ve skupinách v místě hnízdění. Růžová barva těla a rudo-černé zbarvení peří poukazuje na schopnost obstarat potravu a na dobrý imunitní systém. Důležitou roli při námluvách má také hlas. Páření předchází ritualizované

postoje. Nejprve chodí plameňáci s natáhnutým krkem, hlavou kývají ze strany na stranu a vydávají hlasité zvuky. Následuje pozdrav, který trvá 2–10 sekund, nebo pochod pěti set i více ptáků. Při pozdravu plameňáci roztáhnou křídla, aby vynikla jejich karmínová a černá barva. Poté ptáci opakovaně otáčejí hlavou a krkem, aby předvedli upravování peří za křídlem. Následuje převrácený pozdrav, při kterém se ptáci předkloní, aby byl ocas výše než hrud' a rozevřením křídel předvádějí zbarvení svého peří. Dále plameňáci předvádějí falešné krmení ponořením hlavy do vody a rychlým vynořením, po kterém následuje škrabání nohou na krku těsně pod dolní čelistí v předkloněné poloze. Dalším pohybem je protáhnutí křídla a nohy na jedné straně po dobu 1–2 sekund. Tento pohyb předvádějí jednotlivci, kteří nepochodují ve skupině. Posledním sexuálním chováním je předvádění let 4 až 15 ptáků obou pohlaví, kteří v těsné blízkosti krouží po dobu 30 minut okolo místa, kde hnízdí. Hromadné pohyby jsou prováděny v tomto pořadí, ale ne vždy jsou uskutečněny všechny (Johnson *et* Cézilly, 2009).

3.4 Repetitivní sekvence DNA

V DNA jsou přítomné jedinečné a repetitivní sekvence. Jedinečné sekvence jsou například strukturní geny nebo pseudogeny, které se v genomu vyskytují pouze v jedné nebo v několika málo kopiích (tzv. genové rodiny) (Otová *et* Mihalová, 2012). U eukaryotních organismů je velké množství repetitivní DNA, která způsobuje nižší genovou hustotu (Campbell *et* Reece, 2006). Repetitivní sekvence jsou různě dlouhé úseky vyskytující se v genomu obvykle ve velkém počtu kopií, které mohou být rozptýlené v celém genomu, anebo uspořádané v blocích, v řadě za sebou. Mezi repetitivní sekvence DNA patří rozptýlené repetice a tandemové repetitivní sekvence (Otová *et* Mihalová, 2012).

3.4.1 Rozptýlené repetice DNA

Rozptýlené repetice, které vznikají procesem transpozice, se chovají jako mobilní genetické elementy. Tyto repetice jsou rozptýlené v genomu (Brookfield, 2001). Většina rozptýlených repetití jsou retrotranspozony, které přispívají k variabilitě v genomu. Retrotranspozony mohou vést k nehomologním rekombinacím, k tvorbě delecí, inzercí a tedy ke genetickým poruchám (Trent, 2012). Podle délky se rozptýlené repetice dělí na krátké a dlouhé. Krátké rozptýlené repetice, SINEs (Short Interspersed Nuclear Repeats), mají jednotku repetice kratší než 500 bp. LINEs (Long Interspersed Nuclear Repeats), dlouhé rozptýlené repetice, mají jednotku repetice delší než 500 párů bází (Carter, 2000).

3.4.2 Tandemové repetice DNA

Tandemové repetitivní sekvence se skládají z jediné několikrát se opakující sekvence umístěné bezprostředně za sebou (Campbell *et* Reece, 2006). Tandemové repetitivní sekvence mají různou délku v rozmezí od několika nukleotidů až po celé skupiny genů a jsou lokalizovány v blízkosti centromer metafázních chromozomů a v chromocentrech jader (Lovett, 2001; Limborska *et al.*, 2012). Tyto sekvence vznikají chybami při rekombinaci a sklouznutím DNA polymerázy (DNA polymerase slippage) (Wong, 2001). Tandemové repetitivní sekvence se dělí podle délky základní jednotky opakování na makrosatelity, minisatelity a mikrosatelity. Vysoká variabilita těchto tandemových repetitivních sekvencí se využívá jako marker při některých metodách DNA diagnostiky (Otová *et* Mihalová, 2012).

3.4.2.1 Makrosatelity

Makrosatelity mají nejdelší jednotku opakování z tandemových repetice DNA, která je umístěná na jednom nebo více chromozomech. Délka repetice makrosatelitů je 100 bp až několik kbp. Díky složitosti a délce sekvencí mají makrosatelity důležitou roli ve stavbě, v organizaci a regulaci genomu (Dumbovic *et al.*, 2017).

3.4.2.2 Minisatelity

Minisatelity jsou oblasti genomu s nekódujícími sekvencemi o délce jednotky repetice 10 až 100 bp. Hypervariabilní minisatelitová DNA je též známá jako VNTRs (Variable Number Of Tandem Repeats). Mutační změny minisatelitů nejsou náhodně rozloženy, ale vyskytují se převážně na jednom konci lokusu (Ramel, 1997). Minisatelity mohou projít změnami během meiózy, a díky tomu jsou tyto vysoce polymorfní molekulární markery vhodné pro fingerprinting, studium populací a pro určování paternity (Ramel, 1997; Dumbovic *et al.*, 2017).

3.4.2.3 Mikrosatelity

Mikrosatelity, též označované jako SSRs (Simple Sequence Repeats) nebo STRs (Short Tandem Repeats), jsou krátké tandemové repetice, které obsahují nukleotidové sekvence o délce jednotky repetice přibližně 1 až 6 párů bází, a jsou rovnoměrně rozloženy v celém genomu (Ravishanker *et* Bommisetty, 2013). SSRs se vyskytují v eukaryotních i prokaryotních organismech v protein kódujících i nekódujících částech genomu. Tyto genetické markery jsou náchylné k rychlým mutacím, a proto vykazují vysokou úroveň délkového polymorfismu. Mutace mikrosatelitů jsou způsobeny

sklouznutím DNA polymerázy nebo nerovnoměrným crossing-overem (Oliveira *et al.*, 2006). Tyto genetické markery vykazují vysokou alelickou variabilitu, reprodukovatelnost a jsou snadno genotypizovány, a proto jsou používány ve vývojových a genetických studiích, především v populační genetice, genetickém mapování, ve studiu genomické nestability rakoviny a ve studiu evoluce člověka (Flores-Renteria *et Krohn*, 2013; Gonzalez *et Zardoya*, 2013). STRs markery jsou molekulární markery na bázi polymerázové řetězové reakce (PCR) (Ravishanker *et Bommisetty*, 2013)

Podle délky jednotky repetice se mikrosatelity dělí na mono-, di-, tri-, tetra-, pentanukleotidy atd. Mononukleotidové a dinukleotidové repetice se v genomech organismů nacházejí nejčastěji. Mononukleotidové repetice jsou mikrosatelity, které jsou tvořeny jednou opakující se bází. Taková repetice lze zapsat např. obecně pro adenin takto: (A)_n, kde písmeno v závorce značí bázi a index „n“ označuje počet opakování dané báze. Dinukleotidové repetice, které jsou tvořeny dvěma různými nukleotidy, lze zapsat např. obecně pro cytozin a adenin takto: (CA)_n (Tóth *et al.*, 2000).

Mikrosatelity můžeme rozdělit dle struktury sekvence na dokonalé, nedokonalé, přerušené a složené. Mikrosatelity, jejichž sekvence nejsou přerušeny bází, která nepatří do opakujícího se motivu, se nazývají dokonalé (např.: CACACACACACA). Naopak mikrosatelity, které v repetici obsahují bázi, která do sekvence nepatří, se nazývají nedokonalé (např.: CACACATCACACA). Přerušené mikrosatelity jsou takové, které jsou přerušené sekvencí dvou a více bází (např.: CACACATGCACACA). Mikrosatelity, které obsahují na sebe navazující odlišné repetitivní sekvence, se nazývají složené (např.: CACACATGTGTG) (Bhargava *et Fuentes*, 2010).

3.5 Hledání mikrosatelitových lokusů

Mikrosatelity jsou genetické markery vhodné pro spoustu genetických studií, díky rychlému a snadnému testování, vysoké přesnosti a malému množství požadované DNA (Yang *et al.*, 2015). Tyto markery lze hledat *de novo*, pomocí *cross-species* PCR a *in silico*.

Hledání vhodných mikrosatelitových lokusů principem *de novo* bývá využíváno u taxonů, u kterých nejsou doposud známy primery pro mikrosatelitové lokusy nebo nejsou osekvenovány DNA či cDNA knihovny. Metoda *de novo* spočívá v rozštěpení izolované DNA zkoumaného druhu pomocí restriktáz. Restriční fragmenty jsou separovány elektroforézou a fragmenty o délce přibližně 300–700 bp jsou hybridizovány se značenou sondou, která obsahuje repetitivní sekvenci, poté jsou vloženy do

plazmidového vektoru a transformované do bakterií. Ty klony, které mají inzert s repeticí, jsou sekvenovány. Na základě oblastí sekvencí, které ohraničují repetice, jsou navrženy páry primerů pro PCR (Zane *et al.*, 2002).

Cross-species PCR amplifikací jsou hledány polymorfní mikrosatelity u zkoumaného druhu testováním primerů, které byly navrženy pro zdrojový druh. Úspěšnost této metody souvisí s evoluční příbuzností zdrojového a zkoumaného druhu. Čím jsou druhy fylogeneticky bližší, tím se zvyšuje pravděpodobnost, že bude produkt PCR polymorfní (Primmer *et al.*, 2005).

In silico je nejnovější metoda hledání mikrosatelitových lokusů, která souvisí s rozšířením výkonných sekvenátorů a databází genomické DNA nebo cDNA organismů. Pomocí *in silico* jsou vybrány sekvence z DNA knihovny. Pomocí nástroje BLAST jsou vyhledávány repetitivní sekvence požadovaných vlastností (délka jednotky repetice a minimální počet jejího opakování), pro jejichž amplifikaci jsou dále navrženy páry primerů. Nakonec je provedena PCR amplifikace, pro zjištění, zda mikrosatelity vykazují polymorfismus (Dawson *et al.*, 2010).

3.5.1 Metoda PCR

Polymerázová řetězová reakce, též PCR (Polymerase Chain Reaction) je metoda založená na amplifikaci úseku DNA, kdy z malého množství DNA vzniká velké množství kopií, tohoto párem primerů vymezeného úseku. Složení reakční směsi pro PCR tvoří tyto komponenty: malé množství genomické DNA, dva primery, směs nukleotidů a termostabilní enzym DNA polymeráza, například *Taq* DNA polymeráza, která se získává z termofilních bakterií *Thermus aquaticus*. Součástí reakční směsi pro PCR je též deionizovaná voda jako rozpouštědlo jednotlivých komponent a obvykle 10x koncentrovaný pufr (obsahující např. Tris, KCl a detergent). Tak je zajištěna správná koncentrace a iontová síla jednotlivých komponent reakční směsi a také optimální pH.

PCR amplifikace probíhá v termocykleru ve třech krocích. Prvním krokem je denaturace, při které dochází oddělením vodíkových vazeb k rozpadu dvouvlákna DNA na dvě jednotlivá vlákna, při teplotě 92–95 °C. Další proces, který probíhá obvykle v rozmezí 50–65 °C, je annealing, při kterém nasedá dvojice primerů na templátovou DNA, díky komplementaritě bází. Posledním krokem je elongace, neboli prodlužování primerů, kdy při teplotě 72 °C dochází k syntéze komplementárních vláken DNA, činností enzymu DNA polymerázy. Tento cyklus PCR se opakuje přibližně 35krát (Clark *et Pazdernik*, 2013).

3.6 Mikrosatelity pro druhy z řádu tučňáci

Tučňáci (Sphenisciformes) jsou vodní ptáci, které Prum *et al.* (2015) řadí stejně jako řád plameňáci (Phoenicopteriformes) do kladu Aequorlitorinithes (viz Obrázek 5). Řád tučňáci obsahuje jedinou čeleď tučňákovití (Spheniscidae), která je členěna do 6 rodů, které zahrnují celkem 18 druhů. Rozdělení řádu je popsáno v tabulce č. 1. Tučňáci jsou rozšířeni na jižní polokouli, především v Antarktidě, dále v Australasijské, Afrotropické a Neotropické oblasti, a většina druhů hnízdí na subantarktických ostrovech (Martínez *et Bonan*, 2018).

Mikrosatelity pro tučňáky byly popsány v 11 studiích pro 10 druhů z 5 rodů (*E. chrysolophus*, *E. minor*, *M. antipodes*, *P. adeliae*, *P. antarcticus*, *P. papua*, *S. demersus*, *S. humboldti*, *S. mendiculus* a *S. magellanicus*) a bylo nalezeno celkem 147 polymorfních mikrosatelitů (viz tabulka č. 1). Roeder *et al.* (2001) navíc testovali *cross-species* mikrosatelit HrU2 izolovaný od vlaštovky obecné, který byl polymorfní u tučňáka kroužkového.

Tabulka č. 1: Rozdělení řádu tučňáci (Sphenisciformes) na jednotlivé rody a druhy podle del Hoyo *et al.* (2018) s údaji o počtu mikrosatelitů (MS) popsáných u jednotlivých druhů.

Rod	Druh	Počet MS	Literární zdroj
<i>Aptenodytes</i>	tučňák císařský (<i>A. forsteri</i>)	–	–
	tučňák patagonský (<i>A. patagonicus</i>)	–	–
<i>Eudyptes</i>	tučňák jižní skalní (<i>E. chrysocome</i>)	–	–
	tučňák žltorohý (<i>E. chrysolophus</i>)	25	Ahmed <i>et al.</i> , 2009
	tučňák severní skalní (<i>E. moseleyi</i>)	–	–
	tučňák novozélandský (<i>E. pachyrhynchus</i>)	–	–
	tučňák snárský (<i>E. robustus</i>)	–	–
	tučňák chocholatý (<i>E. sclateri</i>)	–	–
	tučňák královský (<i>E. schlegeli</i>)	–	–
<i>Eudyptula</i>	tučňák nejmenší (<i>E. minor</i>)	8	Billing <i>et al.</i> , 2007
		20	Grosser <i>et Waters.</i> , 2014

Tabulka č. 1: Pokračování.

Rod	Druh	Počet MS	Literární zdroj
<i>Megadyptes</i>	tučňák žlutooký (<i>M. antipodes</i>)	12	Boessenkool <i>et al.</i> , 2008
<i>Pygoscelis</i>	tučňák kroužkový (<i>P. adeliae</i>)	6	Roeder <i>et al.</i> , 2001
	tučňák oslí (<i>P. papua</i>)	11	Vianna <i>et al.</i> , 2017
	tučňák uzdičkový (<i>P. antarcticus</i>)	9	Kang <i>et al.</i> , 2015
		16	
<i>Spheniscus</i>	tučňák Humboldtův (<i>S. humboldti</i>)	7	Schlosser <i>et al.</i> , 2003
		5	Schlosser <i>et al.</i> , 2008
		1	Akst <i>et al.</i> , 2002
	tučňák magellanský (<i>S. magellanicus</i>)	1	
	tučňák galapážský (<i>S. mendiculus</i>)	3	
	tučňák brýlový (<i>S. demersus</i>)	1	Labuschagne <i>et al.</i> , 2013
	8		

3.6.1 Mikrosatelity pro tučňáky rodu *Eudyptes*

Tučňák žltorohý - 25 mikrosatelitů

Ahmed *et al.* (2009) charakterizovali 25 mikrosatelitových lokusů pro tučňáka žltorohého (*Eudyptes chrysolophus*). Dospělým tučňákům žltorohým byly odebrány vzorky krve během hnízdění na Ptačím ostrově v Jižní Georgii, na místě zvaném Macaroni Cwm. Pomocí octanu amonného byla extrahována genomická DNA (Nicholls *et al.*, 2000). Genomová knihovna byla obohacena o dinukleotidové mikrosatelitové motivy: (GT)_n a (CT)_n, a tetranukleotidové mikrosatelitové motivy: (GTAA)_n, (CTAA)_n, (TTTC)_n a (GATA)_n. Přímo sekvenovali 288 klonů z genomové knihovny a celkem 132 z nich obsahovalo mikrosatelitové motivy. Ahmed *et al.* (2009) našli 47 sekvencí, z nichž každá obsahovala alespoň osm repetit. Pro 32 mikrosatelitních sekvencí byly navrženy sady primerů pomocí PRIMER3 softwaru (Rozen *et Skaletsky*, 2000), které byly testované na DNA 28 jedinců, 7 mikrosatelitů bylo vyřazeno kvůli neúspěšné PCR amplifikaci nebo chybějícímu polymorfismu. Celkem 25 polymorfních lokusů mělo nejčastěji 8 alel (Ech009, Ech010, Ech011, Ech020, Ech050 a Ech051), nejmenší počet alel byl 4 (Ech003, Ech008 a Ech060) a největší počet alel byl 33 (Ech005).

Všech 25 mikrosatelitů autoři testovali metodou *cross-species* PCR amplifikace u všech tří druhů tučňáků z rodu *Pygoscelis* (tučňák kroužkový, uzdičkový a oslí)

a u tučňáka patagonského z rodu *Aptenodytes*. Všechny lokusy testovali vždy u tří jedinců každého druhu. Jak lze vidět v tabulce č. 2, sedmáct lokusů bylo polymorfních alespoň u jednoho ze 4 testovaných druhů tučňáků. Tři lokusy byly u všech testovaných druhů monomorfní a dva lokusy se nepovedlo amplifikovat ani u jednoho druhu tučňáka. U tučňáka patagonského byly polymorfní produkty 10 lokusů, u tučňáka oslího byly polymorfní produkty 8 lokusů, u tučňáka uzdičkového byly produkty 9 lokusů polymorfní a produkty 12 lokusů byly polymorfní u tučňáka kroužkového. Počet jednotlivých alel je vyznačen v tabulce č. 2.

Tabulka č. 2: *Cross-species* PCR amplifikace se všemi 25 páry primerů navrženými pro tučňáka žltorohého. Každý lokus byl testován u 3 jedinců tučňáka patagonského, oslího, uzdičkového a kroužkového. V tabulce je vyznačen počet alel v případě, kdy byl produkt polymorfní, a čísla v závorkách označují počet testovaných jedinců (Ahmed *et al.*, 2009).

Lokus	Počet alel daného lokusu u tučňáka				
	žltorohého	patagonského (3)	oslího (3)	uzdičkového (3)	kroužkového (3)
Ech007	18 (28)	M	M	M	3
Ech008	4 (28)	2	M	2	2
Ech009	8 (28)	M	M	2	4
Ech010	8 (7)	M	M	2	2
Ech011	8 (27)	5	M	M	2
Ech012	22 (25)	X	6	6	4
Ech024	5 (28)	M	M	X	3
Ech030	11 (28)	3	5	5	M
Ech036	16 (28)	3	M	M	M
Ech051	8 (27)	4	2	3	M
Ech060	4 (25)	2	2	M	2
Ech063	9 (25)	4	2	M	M
Ech065	14 (28)	M	M	M	3
Ech071	11 (27)	4	3	4	4
Ech081	7 (27)	3	3	2	2
Ech091	10 (26)	M	2	2	2
Ech130	12 (13)	2	M	M	X
Ech003	4 (26)	M	M	M	M
Ech029	10 (27)	M	M	M	M
Ech050	8 (27)	M	M	M	M
Ech005	33 (27)	NM	NM	NM	NM
Ech020	8 (13 ♀) 3 (4 ♂)	NM	NM	NM	NM
Ech039	25 (22)	NM	NM	NM	NM
Ech014	6 (28)	X	X	X	X
Ech113	7 (24)	X	X	X	X

M – produkt byl monomorfní, NM – produkt nebyl mikrosatelit, X – mikrosatelit se nepodařilo amplifikovat

3.6.2 Mikrosatelity pro tučňáky rodu *Eudyptula*

Tučňák nejmenší - 8 mikrosatelitů

Billing *et al.* (2007) charakterizovali pro tučňáka nejmenšího (*Eudyptula minor*) osm mikrosatelitových lokusů. Genomová knihovna byla obohacena o (GA)_n a (GAAA)_n repetice. Krev byla odebrána tučňákům nejmenším z kolonií z Filipova a Troubridgeova ostrova u Austrálie. DNA fragmenty byly separovány v agarózovém gelu elektroforézou. Fragmenty o délce 400–900 párů bází byly purifikovány. Denaturované fragmenty DNA byly hybridizovány, amplifikovány metodou PCR za použití specifických primerů a klonovány ve vektoru pGEM (Promega). Klony byly testovány pomocí colony PCR a pozitivní klony byly amplifikovány standardní PCR. Produkty byly purifikovány QIAquick purifikačním kitem (Qiagen) a komerčně sekvenovány. Ze 192 klonů, které byly v genomové knihovně obohacené o (GA)_n dinukleotidy, bylo sekvenováno 18 klonů, a pro amplifikaci devíti klonů, které obsahovaly 7 a více repetit, byly vytvořeny primery. Ze 179 klonů, které byly v genomové knihovně obohacené o (GAAA)_n tetranukleotidy, bylo sekvenováno 10 klonů, a pouze pro jeden z nich byl navržen pár primerů. Autoři analyzovali polymorfismus u 21–51 jedinců z Filipova ostrova a u 5 až 15 jedinců z Troubridgeova ostrova. Pro tučňáky nejmenší z Filipova ostrova bylo sedm lokusů polymorfních (Emm1, Emm2, Emm3, Emm5, Emm6, Emm7 a Emm8), lokusy Emm6 a Emm8 měly nízkou variabilitu a lokus Emm4 byl monomorfní. Pro tučňáky nejmenší z Troubridgeova ostrova bylo polymorfních 7 lokusů (Emm1 až Emm7) lokus Emm8 byl monomorfní. Mikrosatelity Emm2 a Emm8 byly mimo Hardy-Weinbergovu rovnováhu. Lokusy vykazovaly až 14 alel.

Autoři provedli *cross-species* PCR amplifikaci lokusu B3-2 od tučňáka brýlového (Akst *et al.*, 2002) u 47 jedinců tučňáka nejmenšího z Filipova ostrova. Lokus vykazoval 8 alel.

Tučňák nejmenší - 20 mikrosatelitů

Grosser *et Waters* (2014) popsali 20 mikrosatelitových lokusů pro tučňáka nejmenšího (*Eudyptula minor*). Genomová DNA byla extrahována fenol-chloroformovou metodou z krve tučňáků nejmenších z kolonií na Novém Zélandu. Autoři hledali mikrosatelity s di-, tri- a tetranukleotidy, které obsahovaly alespoň 5 opakujících se jednotek, a navrhli páry primerů pro amplifikaci 346 sekvencí. Pro PCR amplifikaci bylo vybráno 30 lokusů, z nichž se 10 nepovedlo amplifikovat nebo byly jejich produkty

monomorfní. Počet alel u dvaceti lokusů byl v rozmezí od 2 (Em21 a Em29.2) do 26 (Em13).

3.6.3 Mikrosatelity pro tučňáky rodu *Megadyptes*

Tučňák žlutooký - 12 mikrosatelitů

Boessenkool *et al.* (2008) popsali 12 mikrosatelitových lokusů pro tučňáka žlutookého (*Megadyptes antipodes*). Sestavili tři genomické knihovny podle protokolů Perrin *et Roy* (2000) a Glenn *et Schable* (2005). Genomická DNA byla izolována pomocí DNeasy Kit (Qiagen) a štěpena restrikním enzymem *MboI* (Promega). DNA fragmenty byly ligovány do klonovacího vektoru a amplifikovány. Fragmenty obsahující mikrosatelity byly izolovány pomocí magnetických částic se streptavidinem. Následně byly ligovány do klonovacího vektoru a transformovány do kompetentních buněk One Shot Top 10 (Invitrogen). Bakteriální klony byly přeneseny na nylonové membrány a následně amplifikovány a sekvenovány. Celkem autoři navrhli 58 párů primerů. Dvanáct mikrosatelitů bylo polymorfních a genotypovány byly u 43 tučňáků žlutookých z Campbellova ostrova. Lokusy obsahovaly 2–8 alel, kde 2 alely na lokus byly nejčastěji (Man03, Man27, Man50, Man54 a Man55) a 8 alel vykazoval lokus Man51.

3.6.4 Mikrosatelity pro tučňáky rodu *Pygoscelis*

Tučňák kroužkový - 6 mikrosatelitů

Roeder *et al.* (2001) popsali 6 mikrosatelitových lokusů pro tučňáka kroužkového (*Pygoscelis adeliae*). Vzorokry krve z intertarsální nebo jugulární žíly byly odebrány 442 dospělým tučňákům kroužkovým ze 13 kolonií v Antarktidě. Genomická DNA byla extrahována fenol-chloroformovou metodou (Sambrook *et al.*, 1989) nebo pomocí kitu Progenome II (Progen Industries). Byly vytvořeny dvě genomové knihovny. Pro sestavení jedné genomové knihovny byly fragmenty DNA o délce 250 až 900 bp ligovány do plazmidu pUC18, transformovány do kompetentních buněk DH5 α a ty poté pěstovány na Luria-Bertani agarovém médiu s ampicilinem. Plazmidy byly purifikovány, DNA fragmenty sekvenovány a rozděleny v polyakrylamidovém gelu. Pomocí softwaru PRIMER3 (Rozen *et Skaletsky*, 1998) byly navrženy primery. Pro druhou genomovou knihovnu byly fragmenty DNA o délce 300 až 600 bp ligovány na SAULA linkery a se SAULA primery byla provedena polymerázová řetězová reakce. DNA fragmenty byly ligovány do pUC18 plazmidu, přeneseny do buněk MAX Efficiency (GIBCO BRL) a inkubovány na médiu s ampicilinem. Pomocí hybridizace byly vybrány klony s CA

repeticemi, které byly sekvenovány (Sambrook *et al.*, 1989) a byly pro ně vytvořeny primery.

Pro genotypizaci jedinců tučňáka kroužkového Roeder *et al.* (2001) použili celkem sedm mikrosatelitů – šest izolovaných polymorfních mikrosatelitových lokusů pro tučňáka kroužkového a jeden lokus HrU2, který byl izolovaný od vlaštovy obecné (*Hirundo rustica*) (Ellegren, 1992; Primmer *et al.*, 1996). Lokusy RM6, RM3, AM13, AM3 a AM12 byly použity pro genotypizaci všech 442 jedinců tučňáka kroužkového ze 13 kolonií z oblasti Antarktidy. Lokus TP500 byl použit pro genotypování populace ze západní Antarktidy a mikrosatelit HrU2 byl použit pro genotypování populace z oblasti východní Antarktidy. Počet alel se pohyboval v rozmezí od 4 (AM3) do 20 (AM13).

Tučňák uzdičkový - 16 mikrosatelitů

Kang *et al.* (2015) popsali 16 polymorfních mikrosatelitových lokusů pro tučňáka uzdičkového (*Pygoscelis antarcticus*). Krev byla odebrána sedmi jedincům žijícím v chráněné antarktické oblasti Narębski Point. Genomická DNA byla extrahována pomocí DNeasy blood a tissue kit (Qiagen). Pomocí QDD3 softwaru (Maglécz *et al.*, 2014) bylo vybráno 30 mikrosatelitních oblastí. Primery pro PCR byly navrženy za použití softwaru PRIMER3 (Rozen *et Skaletsky*, 2000). Variabilita lokusů byla testována u 23 jedinců žijících ve stejné oblasti. Ze 30 navržených párů primerů se podařilo amplifikovat 29 mikrosatelitních lokusů, z nichž bylo 16 polymorfních. Počet alel na lokus byl v rozmezí od 2 (Pygantarc02, Pygantarc22, Pygantarc06 a Pygantarc07) do 9 (Pygantarc16). Nejčastěji vykazovaly lokusy tři alely (Pygantarc24, Pygantarc03, Pygantarc26, Pygantarc28, Pygantarc25 a Pygantarc29). Lokusy Pygantarc11 a Pygantarc18 vykazovaly odchylku od Hardy-Weinbergovy rovnováhy.

Autoři provedli *cross-species* PCR amplifikaci se všemi 16 páry primerů vždy u dvou jedinců tučňáka oslího, kroužkového a žltorohého. U tučňáka oslího se podařilo amplifikovat 14 lokusů ze 16, u tučňáka kroužkového se podařilo amplifikovat 15 lokusů a u tučňáka žltorohého se podařilo amplifikovat 11 lokusů. Deset lokusů se podařilo amplifikovat u všech tří testovaných druhů tučňáků a 5 lokusů se podařilo amplifikovat u 2 ze 3 druhů. Lokus Pygantarc 27, který u zdrojového druhu vykazoval 3 alely, se nepodařilo amplifikovat u žádného ze tří testovaných druhů. Autoři se nezmiňují o počtu alel.

Tučňák kroužkový - 14 mikrosatelitů, tučňák oslí - 11 mikrosatelitů a tučňák uzdičkový - 9 mikrosatelitů

Vianna *et al.* (2017) popsali 34 mikrosatelitových lokusů pro všechny tři druhy tučňáků z rodu *Pygoscelis* (tučňák oslí, kroužkový a uzdičkový), z nichž bylo 14 navrženo pro tučňáka kroužkového, 11 pro tučňáka oslího a 9 pro tučňáka uzdičkového. Genomická DNA byla izolována vysolovací metodou (Aljanabi *et* Martinez, 1997) ze vzorků krve šesti jedinců každého ze tří druhů tučňáků. Bylo provedeno sekvenování DNA a fragmenty byly purifikovány. Pomocí MISA softwaru bylo identifikováno 11 999 mikrosatelitů s di-, tri- a tetranukleotidy. Pro studii byly použity tetranukleotidové mikrosatelity, kterých bylo celkem 11 849. Za použití PRIMER3 softwaru (Rozen *et* Skaletsky, 2000) byly navrženy páry primerů, z nichž bylo vybráno 34 mikrosatelitních lokusů, které amplifikovaly polymorfní produkt alespoň u 1 ze 3 druhů tučňáků rodu *Pygoscelis*. Ze 14 párů primerů navržených pro tučňáka kroužkového (lokusy značené písmeny AP) amplifikovalo 12 lokusů polymorfní produkt u zdrojového druhu. Z 11 párů primerů navržených pro tučňáka oslího (lokusy značené písmeny GP) amplifikovalo 9 lokusů polymorfní produkt u tohoto druhu. Z 9 párů primerů navržených pro tučňáka uzdičkového (lokusy značené písmeny CP) amplifikovalo polymorfní produkt u tohoto druhu 5 lokusů.

Autoři provedli *cross-species* PCR amplifikaci se všemi 34 páry primerů u všech tří druhů tučňáků z rodu *Pygoscelis*, pro které nebyly navrženy (6–8 tučňáků kroužkových, 8–9 tučňáků oslích a 6–9 tučňáků uzdičkových). Jak lze vidět v tabulce č. 6, produkty 15 lokusů byly polymorfní u všech tří druhů a vykazovaly od dvou do osmi alel. Produkty 13 lokusů byly polymorfní u dvou druhů tučňáků a produkty šesti lokusů byly polymorfní u jednoho z druhů tučňáka. U tučňáka kroužkového byly produkty třiceti lokusů polymorfní, u tučňáka oslího byly polymorfní produkty 25 lokusů a u tučňáka uzdičkového byly polymorfní produkty 22 mikrosatelitů. Počet jednotlivých alel lze vidět v tabulce č. 3.

Tabulka č. 3: *Cross-species* PCR amplifikace s primery navrženými pro tučňáka kroužkového (AP), uzdičkového (CP) a oslího (GP). V tabulce jsou vyznačeny počty alel v případě, kdy byl produkt polymorfní, monomorfní produkt je značen písmenem M. Čísla v závorkách značí počet testovaných jedinců (Vianna *et al.*, 2017).

Lokus	Počet alel daného lokusu u tučňáka			Lokus	Počet alel daného lokusu u tučňáka		
	kroužkového	oslího	uzdičkového		kroužkového	oslího	uzdičkového
AP-26	8 (6)	6 (9)	5 (9)	AP-14	2 (8)	M (9)	2 (9)
AP-61	4 (8)	2 (9)	6 (9)	AP-19	3 (8)	M (9)	4 (7)
AP-78	4 (8)	5 (9)	3 (9)	AP-87	9 (8)	M (9)	2 (9)
AP-85	6 (8)	4 (9)	4 (9)	CP-5	2 (7)	M (9)	3 (9)
AP-90	5 (8)	3 (9)	7 (9)	AP-3	3 (8)	2 (9)	M (9)
CP-6	5 (8)	2 (9)	6 (9)	AP-29	2 (8)	2 (9)	M (9)
CP-25	4 (7)	5 (9)	7 (8)	AP-79	4 (8)	2 (9)	M (9)
CP-29	5 (7)	2 (9)	2 (8)	CP-17	4 (8)	3 (9)	M (9)
GP-4	6 (8)	3 (9)	5 (9)	CP-22	2 (7)	3 (9)	M (9)
GP-6	4 (8)	3 (9)	2 (9)	GP-2	3 (7)	2 (9)	M (9)
GP-13	4 (7)	3 (9)	3 (6)	GP-30	4 (7)	4 (9)	M (9)
GP15	7 (8)	5 (9)	4 (9)	AP-57	M (8)	M (8)	4 (9)
GP-18	4 (8)	3 (9)	2 (9)	AP-52	M (8)	3 (9)	M (9)
GP-19	4 (7)	3 (9)	3 (9)	CP-4	M (8)	2 (9)	M (9)
GP-36	3 (8)	5 (8)	4 (6)	CP-21	7 (7)	M (9)	M (9)
CP-27	M (8)	2 (9)	2 (9)	GP-1	2 (8)	M (9)	M (9)
AP-12	2 (8)	M (9)	2 (9)	GP-24	2 (8)	M (9)	M (9)

3.6.5 Mikrosatelity pro tučňáky rodu *Spheniscus*

Tučňák brýlový - 1 mikrosatelit, tučňák Humboldtův - 1 mikrosatelit, tučňák magellanský - 1 mikrosatelit a tučňák galapážský - 3 mikrosatelity

Akst *et al.* (2002) optimalizovali celkem šest mikrosatelitů pro všechny čtyři druhy z rodu *Spheniscus* (tučňák brýlový, Humboldtův, galapážský a magellanský) a porovnali jejich variabilitu u tučňáka galapážského a magellanského. Krev byla tučňákům galapážským odebrána na ostrovech Isabela a Fernandina a byla uložena v lyzačním pufru. Tučňákům magellanským byla krev odebrána v Argentině, v oblasti Punta Tombo. Vzorky krve od tučňáka Humboldtova poskytl M. Schwartz a ZOO Baltimore poskytla vzorky krve tučňáka brýlového. Genomická DNA byla extrahována pomocí DNeasy blood a tissue kit (Qiagen). Bylo optimalizováno šest dinukleotidových lokusů, z nichž byl jeden (B3-2) odvozen od tučňáka brýlového, jeden (H2-6) od tučňáka Humboldtova, jeden (M1-11) od tučňáka magellanského a tři byly odvozeny od tučňáka galapážského (G2-2, G3-6 a G3-11).

Autoři testovali pět lokusů (B3-2, G2-2, G3-6, G3-11 a H2-6) u 46 jedinců tučňáka galapážského a u 46 jedinců tučňáka magellanského. V tabulce č. 4 lze vidět, že všech pět mikrosatelitních lokusů bylo polymorfních minimálně u jednoho z testovaných druhů. Mimo G3-6 byly lokusy v Hardy-Weinbergově rovnováze. Heterozygotnost byla vyšší u polymorfních lokusů tučňáka magellanského než u galapážského.

Tabulka č. 4: *Cross-species* PCR amplifikace s páry primerů navrženými pro tučňáka brýlového (B3-2), galapážského (G2-2, G3-11 a G3-6) a Humboldtova (H2-6). V tabulce je vyznačen počet alel v případě, kdy byl produkt polymorfní, monomorfní produkt je značen písmenem M. Čísla v závorkách označuje počet testovaných jedinců (Akst *et al.*, 2002).

Lokus	Počet alel daného lokusu u tučňáka	
	galapážského (46)	magellanského (46)
B3-2	M	8
G2-2	M	8
G3-11	2	M
G3-6	3	19
H2-6	3	6

Tučňák Humboldtův - 7 mikrosatelitů

Schlosser *et al.* (2003) charakterizovali sedm mikrosatelitních lokusů pro tučňáka Humboldtova (*Spheniscus humboldti*). Vzorky krve byly odebrány 24 volně žijícím jedincům. Extrahovaná DNA štěpená na fragmenty o velikosti 500–1000 bp byla izolována a ligována. Produkty PCR byly hybridizovány, klonovány a umístěny na selektivní agarové medium (X-gal). Pomocí PRIMER3 softwaru (Rozen *et Skaletsky*, 1998) byly navrženy primery. Celkem sedm mikrosatelitních lokusů bylo polymorfních, a kromě lokusu Sh2Ca22 byly v Hardy-Weinbergově rovnováze. Mikrosatelity měly 5 (Sha1Ca9) až 11 alel (Sh1Ca1), nejčastěji vykazovaly lokusy 9 alel (Sh1Ca16, Sh1Ca17 a Sh2Ca22).

Všech sedm lokusů bylo testováno metodou *cross-species* PCR amplifikace u osmi druhů tučňáků z pěti rodů, kteří pocházeli ze zoologických zahrad v Severní Americe. Jedná se o druhy z rodu *Spheniscus*: po 20 jedincích tučňáka magellanského a brýlového, z rodu *Pygoscelis*: 5 tučňáků oslích a 2 tučňáci uzdičkoví, z rodu *Eudyptes*: po 5 jedincích tučňáka jižního skalního a žltorohého, z rodu *Eudyptula*: 5 tučňáků nejmenších a z rodu *Aptenodyptes*: 5 tučňáků patagonských. Jak lze vidět v tabulce č. 4, každý lokus byl polymorfní alespoň u pěti z osmi druhů tučňáků. Lokus Sh2Ca22 byl polymorfní u všech

osmi druhů tučňáků. U tučňáka magellanského, brýlového, oslího, jižního skalního a nejmenšího vykazovalo polymorfismus všech 7 lokusů. O počtu alel se autoři nezmiňují.

Tabulka č. 5: *Cross-species* PCR amplifikace s primery navrženými pro tučňáka Humboldtova u jedinců tučňáka brýlového, jižního skalního, magellanského, nejmenšího, oslího, uzdičkového, patagonského a žltorohého. Čísla v závorkách značí počet testovaných jedinců. V tabulce je vyznačeno, zdali byl produkt polymorfní (P), monomorfní (M) anebo se nepodařilo mikrosatelit amplifikovat (X) (Schlosser *et al.*, 2003).

Tučňák	Lokus						
	Sh1Ca9	Sh1Ca12	Sh1Ca16	Sh1Ca17	Sh2Ca12	Sh2Ca21	Sh2Ca22
Humboldtův (24)	5	11	9	9	6	6	9
brýlový (20)	P	P	P	P	P	P	P
jižní skalní (5)	P	P	P	P	P	P	P
magellanský (20)	P	P	P	P	P	P	P
nejmenší (5)	P	P	P	P	P	P	P
oslí (5)	P	P	P	P	P	P	P
uzdičkový (2)	M	M	M	M	X	M	P
patagonský (5)	P	P	P	M	M	P	P
žltorohý (5)	P	M	P	M	P	P	P

Tučňák Humboldtův - 5 mikrosatelitů

Schlosser *et al.* (2008) popsali pět lokusů od tučňáka Humboldtova (*Spheniscus humboldti*). Vzorky krve byly odebrány z jugulární nebo metatarzální žíly od 336 jedinců, kteří pocházeli ze čtyř různých lokalit. Genomická DNA byla extrahována podle Sambrook *et al.* (1989). Dvacet osm párů primerů bylo navrženo podle Garner *et al.* (2000) a Schlosser *et al.* (2003). Bylo popsáno pět nových lokusů: Sh2Ca31, Sh2Ca40, Sh2Ca49, Sh2Ca55 a Sh2Ca58, které vykazovaly po řadě 11; 16; 9; 14 a 4 alely. Analýza odhalila možné nulové alely u tří mikrosatelitů (Sh1Ca12, Sh2Ca22 a Sh2Ca55).

Tučňák brýlový - 8 mikrosatelitů

Labuschagne *et al.* (2013) charakterizovali 8 mikrosatelitů pro tučňáka brýlového (*Spheniscus demersus*). Dvaceti pěti dospělým jedincům tučňáka brýlového z jedné kolonie v provincii KwaZulu Natal v Jižní Africe byly odebrány vzorky krve. Genomická DNA byla extrahována pomocí DNeasy blood a tissue kitu (Qiagen). Byla vytvořena genomická knihovna, která byla osekvenována a pomocí programu MSATCOMMANDER 0.8.1 (Faircloth, 2008) byly vyhledány mikrosatelitové motivy s nejméně osmi repeticemi 2 až 6 bp dlouhými. Pomocí softwaru PRIMER3 (Rozen *et Skaletsky*, 1997) byly navrženy primery pro 12 lokusů. Autoři provedli PCR

amplifikaci a genotypizaci. Z 12 mikrosatelitních lokusů bylo 8 polymorfních a nejčastěji vykazovaly 4 alely (PNN01, PNN03, PNN06 a PNN08) u PNN05 a PNN07 byly pouze dvě alely a po šesti alelách měly lokusy PNN09 a PNN12.

3.7 EST ptačí mikrosatelity

Dawson *et al.* (2010) byli první, kdo aplikovali metodu *in silico* u ptáků a snažili se najít univerzální ptačí mikrosatelity. Pomocí *in silico* získali sady mikrosatelitních primerů, které mají široké využití u spousty různých ptačích druhů. Jimi popsané mikrosatelity mohou pomoci např. při studiu paternity nebo mapování ptačích genomů. Pro nalezení konzervovaných ptačích mikrosatelitů byly srovnány homologní sekvence cDNA u druhů zebříčka pestrá (*Taeniopygia guttata*) a kur bankivský (*Gallus gallus*), které jsou fylogeneticky velmi vzdálené. Použili EST (Expressed Sequence Tag) mikrosatelity zebříčky pestré, protože EST sekvence (kódující sekvence) jsou konzervovanější než ostatní typy sekvencí, s kurem bankivským mají na rozdíl od jiných sekvencí větší homologii a bylo k dispozici velké množství EST mikrosatelitů.

Autoři identifikovali 687 EST mikrosatelitních sekvencí u zebříčky pestré. Pomocí nástroje BLAST přiřadili EST sekvence zebříčky pestré k sekvencím kura bankivského a vybrali 135 homologních sekvencí. Za pomoci PRIMER3 softwaru (Rozen *et Skaletsky*, 2000) bylo navrženo 36 párů primerů pro 35 EST mikrosatelitů (byly vytvořeny dvě sady primerů pro lokus TG08-024). K amplifikaci byly použity lokusy, které měly u zebříčky i kura stejné nukleotidové sekvence. Degenerované báze byly vyloučeny pro maximální úspěšnost při multiplexní PCR amplifikaci u jednotlivých druhů. Páry primerů byly navrženy tak, aby měly podobnou teplotu *annealingu* (v rozmezí od 54 do 61 °C). Primer F z každého páru byl značen fluorescenčním barvivem HEX nebo 6-FAM. Lokusy pojmenovali podle zdrojového druhu písmeny TG, což jsou počáteční písmena *Taeniopygia* a *Gallus*, a číslice označují polohu lokusu v genomu kura bankivského.

Mimo jeden lokus (TG01-086) z 35 EST mikrosatelitů u zebříčky pestré a kura bankivského byly mikrosatelity polymorfní. Produkty u zebříčky pestré vykazovaly 2–6 alel na lokus a u kura bankivského byl počet alel na lokus v rozmezí od 2 do 5.

Vytvořené páry primerů byly použity ke genotypizaci ptáků 52 různých druhů patřících do patnácti řádů (klasifikace dle Sibley *et Monroe* (1990)). Mezi testovanými druhy bylo 22 druhů z řádu pěvci a 30 druhů z ostatních ptačích řádů. Z 35 testovaných lokusů bylo 33 polymorfních. Jeden lokus (TG09-14) byl monomorfní u všech

testovaných druhů a lokus TG01-086 se nepodařilo amplifikovat. 33 párů primerů amplifikovalo 100 % lokusů u 17 druhů pěvců a 99 % lokusů u 5 ostatních druhů ptáků. Většina mikrosatelitů byla polymorfní u 8 a více druhů. Alespoň u 8 ze 17 testovaných druhů pěvců bylo 17 lokusů polymorfních. Dále byla provedena amplifikace devíti mikrosatelitních lokusů u 13 druhů z řádu dlouhokřídlí (Charadriiformes) a sedm z nich bylo polymorfních.

3.8 Konzervované ptačí mikrosatelity

Dawson *et al.* (2013) navázali na předešlou práci a popsali vysoce konzervované sekvence s velkým počtem repetit. Opět izolovali mikrosatelity od zebřičky pestré (*Taeniopygia guttata*) a kura bankivského (*Gallus gallus*), ale použili celogenomová data. Identifikovali sekvence s dinukleotidovými repetitivy, které měly více než 10 opakování. Nalezené mikrosatelity zebřičky pestré přiřadili k homologním sekvencím kura bankivského a pomocí nástroje BLAST vybrali nejvíce homologní oblasti. Pomocí softwaru MEGA3 (Kumar *et al.*, 2004) byly tyto homologní sekvence dále zpracovány. Sady primerů, navržené pomocí softwaru PRIMER3 (Rozen *et Skaletsky*, 2000), měly teplotu *annealingu* v rozmezí od 57 do 63 °C. F primer každého páru byl značen fluorescenčním barvivem HEX nebo 6-FAM. Celkem bylo navrženo 24 párů primerů z homologních sekvencí, které obsahovaly alespoň osm repetitivních jednotek u obou druhů. Sekvence primerů byly shodné se sekvencemi zebřičky a v 86 % byly homologní se sekvencemi kura. Osmnáct sad primerů zahrnovalo degenerované báze (nejvýše 2 degenerované báze na 1 primer nebo maximálně 3 degenerované báze na pár primerů). Pojmenování lokusů zkratkou CAM vychází z anglického „Conserved Avian Microsatellite“.

Autoři provedli genotypizaci vždy 4 jedinců z 8 druhů pěvců a vždy jednoho jedince ze čtyř druhů „nepěvců“. Většina CAM markerů byla úspěšně amplifikována u všech 12 testovaných druhů. U pěvců bylo amplifikováno průměrně 94 % mikrosatelitů, z nichž 68 % bylo polymorfních. U ostatních druhů ptáků bylo úspěšně amplifikováno 95 % mikrosatelitů a z nich 42 % vykazovalo polymorfismus. Z 24 testovaných CAM mikrosatelitů u osmi druhů pěvců bylo 19 lokusů polymorfních alespoň u poloviny druhů. Mikrosatelity CAM-13 a CAM-19 byly polymorfní u všech 8 testovaných druhů pěvců.

4 Materiál a metody

4.1 Biologický materiál

Biologickým materiálem pro analýzu byla krev šesti nepříbuzných jedinců plameňáka růžového (*Phoenicopterus roseus*) ze ZOO Dvůr Králové. Genomickou DNA izoloval vedoucí bakalářské práce fenol-chloroformovou metodou. Výsledná koncentrace DNA pro PCR amplifikaci byla od 10 do 50 µg/ml.

4.2 Použité chemikálie

Akrylamid (Sigma)

aTaq DNA polymeráza (5U/µl), M1241 (Promega)

Bromfenolová modř (Serva)

dNTPs (100 mmol/l, 400 µl každého), U1240 (Promega)

Deionizovaná voda

Dusičnan stříbrný (Sigma)

Ethanol – 96 % roztok (Lihovar Vrbátky)

Ethylendiaminotetraoctan sodný (Na₂EDTA) (Lachner)

Formaldehyd (Lachner)

Formamid (Lachner)

Hydroxid sodný (Lachner)

Chlorid sodný (Lachema)

Kyselina boritá (Lachner)

Kyselina dusičná – 65 % roztok (Lachner)

Kyselina octová (Lachner)

3-methakryloxypropyltrimethoxysilan (Serva)

Močovina (Lachner)

N, N'-metylenbisakrylamid (AppliChem)

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

Peroxodisíran amonný (Lachner)

Rain off – tekuté stěrače (Sheran)

Thiosíran sodný (Lachema)

Trishydroxymethylaminomethan (Tris) (AppliChem)

Uhličitan sodný (Lachner)

Xylenová modř (Xylencyanol FF) (AppliChem)

4.3 Použité roztoky

Dusičnan stříbrný, 0,1% roztok

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

Fix/stop roztok

800 ml deionizované vody
88 ml ledové kyseliny octové

Hydroxid sodný, 1 mol/l roztok

40 g hydroxidu sodného
doplnit deionizovanou vodou na 1 l

Kyselina dusičná, 1% roztok

12 ml 65% kyseliny dusičné
800 ml deionizované vody

Molekulární lepidlo

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

Nanášecí pufr

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

Peroxodisíran amonný, 10% roztok

1 g peroxodisíranu amonného
rozpustit v 10 ml deionizované vody
roztok uchovávat v ledničce

Polyakrylamidový gel, 6% roztok

60 ml 6% zásobního roztoku akrylamidu
400 μ l 10% roztoku peroxodisíranu amonného $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$
40 μ l N, N, N', N'-tetramethylethylendiaminu

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 deionizovanou vodou na 1 l

Vývojka

24 g uhličitanu sodného
800 ml deionizované vody
vychladit na teplotu nižší než 10 °C
před použitím přidat 1,2 ml formaldehydu a 160 µl 1% roztoku thiosíranu sodného

4.4 Použité laboratorní přístroje

Elektroforetický zdroj EV232 (Consort)
Hybridizační pec HB-2D (Techne)
Chladnička kombinovaná (Whirlpool)
Laboratorní váhy Mark S622 (BEL Engineering)
Magnetická míchačka MR Hei-Combi (Heidolph)
Mikropipety Finnpiquette 0,5 až 10 µl (osmikanálová) a 0,3 µl až 1 ml (Thermo Labsystems)
Mikropipety Nichipet EX 0,5 µl až 1 ml (Nichiryo)
Minicentrifuga CLE CSQSP (Clever Scientific)
Minicentrifuga Prism mini (Labnet International)
Negatoskop NEGA1 (Maneko)
Sekvenační elektroforetická komůrka S2 (Whatman Biometra)
Spektrofotometr NanoDrop ND-1000 (Thermo Scientific)
Sušárna CAT 8050 (Contherm)
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 02 (AquaOsmotic)

Výrobník ledu Icematic F100 Compact (Castel Mac)

4.5 Amplifikované mikrosatelitové lokusy u plameňáka růžového

Pro detekování polymorfních mikrosatelitových lokusů u 6 nepříbuzných jedinců plameňáka růžového jsem použila 173 párů primerů. Z celkového množství bylo 113 párů primerů odvozeno od druhů z řádu tučňáci (tabulka č. 6) a 60 párů primerů pro amplifikaci univerzálních ptačích mikrosatelitů (tabulka č. 7).

Tabulka č. 6: Seznam mikrosatelitů z řádu tučňáci testovaných na polymorfismus u plameňáka růžového.

Zdrojový druh	Mikrosatelit	Literární zdroj
tučňák žltorohý (<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	Billing <i>et al.</i> , 2007
	Em1, Em2, Em4, Em5, Em6.2, Em8, Em9, Em12.2, Em13, Em14, Em15, Em21, Em22, Em23, Em24, Em26, Em27, Em28, Em29.2, Em30	Grosser <i>et Waters</i> , 2015
tučňák žlutooký (<i>Megadyptes antipodes</i>)	Man03, Man08, Man13, Man21, Man22, Man27, Man39, Man47, Man50, Man51, Man54, Man55	Boessenkool <i>et al.</i> , 2008
tučňák kroužkový (<i>Pygoscelis adeliae</i>)	AM3, AM12, AM13, TP500, RM3, RM6	Roeder <i>et al.</i> , 2001
tučňák uzdičkový (<i>P. antarcticus</i>)	Pygantarc02, Pygantarc03, Pygantarc06, Pygantarc07, Pygantarc11, Pygantarc15, Pygantarc16, Pygantarc18, Pygantarc19, Pygantarc22, Pygantarc24, Pygantarc25, Pygantarc26, Pygantarc27, Pygantarc28, Pygantarc29	Kang <i>et al.</i> , 2015

Tabulka č. 6: Pokračování.

Zdrojový druh	Mikrosatelit	Literární zdroj
tučňák brýlový (<i>Spheniscus demersus</i>)	PNN01, PNN03, PNN05, PNN06, PNN07, PNN08, PNN09, PNN12	Labuschagne <i>et al.</i> , 2013
	B3-2	Akst <i>et al.</i> , 2002
tučňák Humboldtův (<i>S. humboldti</i>)	Sh1Ca9, Sh1Ca12, Sh1Ca16, Sh1Ca17, Sh2Ca12, Sh2Ca21, Sh2Ca22	Schlosser <i>et al.</i> , 2003
	Sh2Ca31, Sh2Ca40, Sh2Ca49, Sh2Ca55, Sh2Ca58	Schlosser <i>et al.</i> , 2009
	H2-6	Akst <i>et al.</i> , 2002
tučňák galapážský (<i>S. mendiculus</i>)	G2-2, G3-6, G3-11	
tučňák magellanský (<i>S. magellanicus</i>)	M1-11	

Tabulka č. 7: Seznam univerzálních ptačích mikrosatelitů testovaných na polymorfismus u plameňáka růžového.

Zdroj	Mikrosatelit	Literární zdroj
EST ptačí mikrosatelity	TG01-000, TG01-040, TG01-077, TG01-086, TG01-092, TG01-114, TG01-124, TG01-147, TG01-148, TG02-078, TG02-088, TG02-120, TG03-002, TG03-031, TG03-034, TG03-035, TG03-098, TG04-004, TG04-012, TG04-012A, TG04-041, TG04-061, TG05-030, 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 PCR amplifikace mikrosatelitové DNA

Metodou PCR byla genomická DNA šesti nepříbuzných jedinců plameňáka růžového amplifikována vždy jedním párem z celkových 173 párů primerů.

1. Jednotlivé složky PCR mixu (viz tabulka č. 8) byly po zvortexování a zcentrifugování napipetované do 1,5ml mikrozkušavky.

Tabulka č. 8: Složení PCR mixu pro 6 jedinců.

Složka PCR mixu	Pipetovaný objem [μl]
Deionizovaná voda	44,4
Reakční pufr pro PCR 10x	6,7
Roztok MgCl ₂ (25 mmol/l)	4,0
Roztok dNTPs (20 mmol/l)	0,7
Primer R (10 μmol/l)	3,3
Primer F (10 μmol/l)	3,3
<i>aTaq</i> DNA polymeráza (5U/μl)	1,0

2. Po napipetování všech složek byla mikrozkušavka s PCR mixem opět zvortexována a zcentrifugována.
3. Do šesti 0,2ml mikrozkušavek byl napipetovaný 1 μl genomické DNA 6 nepříbuzných jedinců plameňáka růžového, a ke každému vzorku bylo přidáno 9 μl PCR reakční směsi.
4. Mikrozkušavky byly vloženy do termocykleru, kde proběhla PCR reakce. Časový a teplotní profil PCR reakce byl následující:

94 °C: 5 min
94 °C: 30 s
*50 °C: 30 s
72 °C: 30 s
72 °C: 7 min

} 35 x

*Všechny mikrosatelitové lokusy byly nejprve testované při základní teplotě annealingu 50 °C. Ta byla snižována nebo zvyšována, dokud nebyl produkt hodnotitelný.

4.7 Elektroforetická separace PCR produktů

Postup práce byl optimalizován pro tloušťku gelu 0,4 mm a použití sekvenační elektroforetické komůrky S2 Whatman Biometra, s rozměry skel 330 x 390 mm a 330 x 420 mm.

1. Velké a malé sklo bylo důkladně omyto saponátem a opláchnuto deionizovanou vodou. Po osušení byla skla opláchnuta 96% ethanolem a opět osušena papírovou utěrkou.
2. Plocha velkého skla, která se později dotýkala gelu, byla ošetřena přípravkem pro odpuzování vody (Rain-off). Po zaschnutí přípravku bylo sklo dvakrát omyto deionizovanou vodou a osušeno papírovou utěrkou.
3. Malé sklo bylo umístěno do digestoře a na plochu, která se později dotýkala gelu, byl rozetřen 1 ml molekulárního lepidla. Po jeho zaschnutí bylo sklo čtyřikrát omyto 96% ethanolem a osušeno papírovou utěrkou.
4. Velké sklo bylo umístěno ošetřenou plochou nahoru na polystyrenovou podložku do digestoře. Po stranách velkého skla byly umístěny očištěné spacery (0,4 mm silné). Očištěnou plochou bylo malé sklo položeno na velké. Spacery byly srovnány podél okrajů skel a gumičky spacerů byly přitisknuty k malému sklu. V takovém stavu byla skla v místě spacerů sepnuta dvěma klipsy z každé strany.
5. Do kádinky byl připraven 6% polyakrylamidový gel, který byl po promíchání rovnoměrně nalit mezi skla tak, aby vyplnil celý prostor mezi skly.
6. V místě, kde byl naléván gel, byl mezi skla zasunut hřebínek stranou bez zoubků asi 0,5 cm hluboko. V místě hřebínku byla skla sepnuta čtyřmi klipsy.
7. Po hodině, kdy gel polymerizoval a ztuhl, byly odstraněny všechny klipsy. Kartáčem a vodou bylo sklo omyto od zbytků polyakrylamidu a malé sklo poté osušeno papírovou utěrkou.
8. Malým sklem k hliníkové desce elektroforetické komůrky a hřebínkem nahoru, byl umístěn gel se skly do komůrky a upevněn. Katodový a anodový prostor byl zalit 0,5x TBE pufrem. Po vytáhnutí hřebínku byl pomocí injekční stříkačky s pufrem vyčištěn vzniklý prostor mezi skly.
9. Po uzavření katodového a anodového prostoru byly zapojeny elektrody a na zdroji stejnosměrného elektrického proudu byly nastaveny jako limitní faktory hodnota výkonu 90 W a hodnoty elektrického napětí a proudu na 3000 V a 150 mA. Za těchto podmínek byl gel nahříván 30 minut.

10. PCR produkty byly smíchány s 5 μ l nanášecího pufru a pět minut před nanášením byly tyto vzorky vloženy do termocykléru (94 °C). Po 3 minutách byly vytaženy a hned vloženy do ledové tříště, aby bylo zabráněno renaturaci denaturovaných vláken DNA.
11. Během denaturace byl zdroj stejnosměrného elektrického proudu vypnut. Po odpojení elektrod byl otevřen katodový prostor a opět vyčištěn prostor vzniklý mezi skly, kam byl následně vsunut hřebínek zoubky 1 mm hluboko do gelu.
12. Osmikanálovou pipetou bylo nanášeno po 1,5 μ l jednotlivých vzorků do mezer mezi zoubky hřebínku. Po nanesení všech vzorků byl uzavřen katodový prostor a elektrody byly opět připojeny ke zdroji stejnosměrného elektrického proudu. Jako limitní faktor byla nastavena hodnota výkonu 70 W (hodnoty elektrického napětí a proudu byly stále nastaveny na 3000 V a 150 mA).
13. Doba separace vzorků závisí na jejich relativních molekulových hmotnostech (délkách) rozdělovaných PCR produktů. Obvyklá doba elektroforetické separace vzorků je 1,5 hodiny.
14. Během elektroforetické separace byly připraveny tyto roztoky: fix/stop roztok, 800 ml roztoku 1% kyseliny dusičné, 800 ml 0,1% roztoku AgNO_3 a vývojka, která byla umístěna do chladničky, aby byla vychlazená na teplotu nižší než 10 °C.
15. Po uplynutí doby elektroforetické separace vzorků byl vypnut zdroj stejnosměrného elektrického proudu. Po odpojení elektrod byl otevřen kanálek, aby pufr z katodového prostoru otekl do sběrného prostoru. Skla s gelem byla přemístěna na vodorovnou podložku, malým sklem nahoru. Spacery a hřebínek byly vytáhnuty a čepelí nože byla skla od sebe odpáčena.
16. Malé sklo s přilepeným gelem bylo vloženo do fotomisky gelem nahoru a umístěno na třepačku. Gel byl zalit fix/stop roztokem. Po 20 minutách působení byl roztok slit zpět do baňky a sklo s gelem bylo omyto přibližně v 1 až 1,5 litru deionizované vody třikrát po dvou minutách.
17. Sklo s gelem ve fotomisce bylo umístěno na třepačku a zalito 1% roztokem kyseliny dusičné. Po 5 minutách byl roztok vylit do odpadu a gel byl třikrát po dvou minutách promýván v 1 až 1,5 l deionizované vody.
18. Sklo s gelem bylo vloženo do fotomisky, umístěno na třepačku a zalito 0,1% roztokem AgNO_3 , do kterého bylo těsně před použitím přidáno 1200 μ l formaldehydu.

19. Po uplynutí nejméně 30 minut byl roztok AgNO_3 slit do zásobní lahve a sklo s gelem bylo vloženo na pět vteřin do předem připravené fotomisky s deionizovanou vodou. Po vytažení a okapání bylo sklo s gelem vloženo do fotomisky na třepače a zalito vychlazenou vývojkou, kam bylo těsně před použitím přidáno 1200 μl formaldehydu a 160 μl 1 % roztoku $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$.
20. Docházelo k vyvíjení hnědočerných, stříbrem obarvených proužků PCR produktů. Po dostatečném zabarvení proužků bylo vyvíjení přilítím fix/stop roztoku (uchovaný z kroku č. 17) ukončeno. Jakmile přestaly unikat bublinky oxidu uhličitého, bylo sklo s gelem přemístěno na 2 minuty do fotomisky s deionizovanou vodou.
21. Podepsané sklo fixem v místě spaceru, kde nebyl gel, bylo umístěno na hodinu do sušárny nastavené na 60 °C. Usušený gel byl vyhodnocen na negatoskopu a poté naskenován.
22. Sklo s již nepotřebným gelem bylo ponořeno do roztoku hydroxidu sodného, ve kterém se za několik hodin gel od skla odlepil. Sklo omyté vodou a saponátem a opláchnuté deionizovanou vodou bylo připraveno k dalšímu použití.

5 Výsledky

V mé bakalářské práci jsem hledala polymorfní mikrosatelity u plameňáka růžového otestováním 173 párů primerů navržených pro druhy z řádu tučňáci a univerzální ptačí mikrosatelity. Analýzu jsem prováděla pomocí *cross-species* PCR amplifikace u 6 nepříbuzných jedinců plameňáka růžového (*Phoenicopterus roseus*). Z doposud popsáných 147 mikrosatelitů pro druhy z řádu tučňáci (*Sphenesciformes*) jsem testovala 113 párů primerů. Dále jsem testovala 60 univerzálních ptačích mikrosatelitů odvozených z homologních mikrosatelitních sekvencí genomické DNA zebřičky pestré (*Taeniopygia guttata*) a kura bankivského (*Gallus gallus*), konkrétně 24 konzervovaných ptačích mikrosatelitů a 35 EST ptačích mikrosatelitů, pro které bylo navrženo 36 párů primerů.

Všech 173 párů primerů jsem testovala pomocí *cross-species* PCR amplifikace při základní teplotě *annealingu* 50 °C. Její produkty byly separovány v 6% polyakrylamidovém gelu při denaturujících podmínkách po dobu 90 min. V případě, že nebyl produkt hodnotitelný, jsem optimalizovala teplotu *annealingu*. Jestliže nebyl produkt viditelný, nebo byl slabý, snižovala jsem teplotu *annealingu* až na 44 °C. V opačném případě, kdy byl produkt příliš silný, jsem teplotu *annealingu* zvyšovala až na 66 °C. U pěti mikrosatelitních lokusů jsem optimalizovala podmínky PCR snížením koncentrace hořčnatých iontů, tedy roztoku MgCl₂ v PCR mixu, ze 1,42 mmol/l na tříčtvrtinovou koncentraci 1,07 mmol/l. Produkty pěti mikrosatelitů měly vyšší relativní molekulovou hmotnost, a pro rozlišení počtu alel jsem prodloužila dobu elektroforetické separace z 90 min na 120 min a v jednom případě až na 150 min.

Z celkového počtu testovaných mikrosatelitů jsem našla 24 polymorfních lokusů, jejichž amplifikací jsem získala 25 polymorfních produktů (lokus PNN08 vykazoval dvě místa polymorfismu). Dalších 148 párů primerů amplifikovalo monomorfní produkt a v jednom případě se nepodařilo lokus amplifikovat (M1-11). Polymorfní mikrosatelity a jejich charakteristiky jsou uvedeny v tabulce č. 9. U všech polymorfních produktů jsem provedla genotypizaci na 6 nepříbuzných jedincích plameňáka růžového a pozorovala jsem od 2 do 6 alel (viz tabulka č. 10). Z objevených polymorfních mikrosatelitních lokusů bylo původně 13 lokusů navržených pro řád tučňáci a 11 univerzálních ptačích mikrosatelitů – 5 EST ptačích mikrosatelitů a 6 konzervovaných ptačích mikrosatelitů.

Tabulka č. 9: Charakteristika 24 párů primerů (respektive 25 amplifikovaných polymorfních mikrosatelitů) u 6 nepříbuzných jedinců plameňáka růžového. V tabulce je uveden zdroj, název lokusu s Accession number z GenBank, sekvence primerů, jednotka repetice, T_a – teplota *annealingu*, ELFO – doba elektroforetické separace a počet alel.

Zdroj	Lokus (Accession number)	Sekvence primerů (5' → 3')	Jednotka repetice	T_a [°C]	ELFO [min]	Počet alel
tučňák žltorohý	Ech011 (FM878342)	F: CACAGCACTGTGACAGAAGCA R: TTAAGTGGTTTCGATTTGTCAGTCTTT	GT	44*	90	3
	Ech024 (FM878355)	F: TGTTTCTTGCTTGCTACTTCCACAG R: CCAAATATGTTGTGGTCGACAGTG	CT	62	90	2
	Ech030 (FM878361)	F: TGACGCCGCAGGGACTTC R: GCTCAGCTCTTGCTCACAGTTTCAG	CTAT	53	90	3
tučňák nejmenší	Em2 (KM272222)	F: GGCAGTGGGATCTTTCTTCC R: GACCATGCTGCAGGTTCTTG	AGAT	54	90	2
	Em8 (KM272226)	F: GGTGCTGGGAGATGGCTTC R: ACGAAATGGTTTGGCTGGTG	AGAT	50	90	4
	Em23 (KM272234)	F: GATGCATGTGGAGGAAGTGC R: GGCAACATGGTAGCTGACAC	CA	55*	120	4
	Emm5 (DQ83772933)	F: ATTAAGTGGCCTTGGGTTC R: TTTATGCTCCCTCATTCCAC	CTTT	55	90	4
tučňák žltooký	Man27 (EU267114)	F: GATCCTGAGAAGAGAGACAG R: GGCTGTTCAATTTGTCAC	GA/GT/CA/GCA	52*	90	3
	Man47 (EU267116)	F: ATACCTCCAGAATGGCTG R: CACTAAGGGTGACCAAGG	TGA	51	90	2
	Man55 (EU267120)	F: TTGAAGTAGCAAGCAGTGTAG R: AAGGGCATTTCATTCT	TTG	55	90	2
tučňák kroužkový	RM6 (AF289547)	F: CAGGAGGCTTTGAGACAA R: CTGTTTACATCCGATGCA	CA	56*	120	3

Tabulka č. 9: Pokračování.

Zdroj	Lokus (Accession number)	Sekvence primerů (5' → 3')	Jednotka repetice	T _a [°C]	ELFO [min]	Počet alel
tučňák brylový	PNN08 (JX494408)	F: GGAAATGCCACTGAAAACCTAA R: GATAGATGGGGAACTGGAAACA	ATAG	53	90	2+4
tučňák Humboldtův	Sh1Ca12 (AF540007)	F: GCACACTGTGAGCTTGCAC R: CTTGGGCTCTCAAATACCC	T/AC	52	90	2
EST ptačí mikrosatelity	TG01-148 (CK301512)	F: TTGCAACACATTCTAATATTGC R: TTTAAAGTACATCAAACAACAAAATC	AT/AC	44	90	2
	TG02-120 (DV945440)	F: TTGGCAAAGATGATATGAATG R: AGCCAGGTCCAGTTTCTAAGC	AT	55	120	2
	TG03-035 (DV578303)	F: TGATGGCCAAATGCATACTC R: TATTTACAATATCTGCAGAAACAATCC	GT	58	90	2
	TG04-041 (CK316380)	F: CTGAATTGTTGACCTTTGCTTAC R: GTCCTTTTAGAAAGCAGCACAG	CT/AG	48	120	2
	TG05-030 (CK308028)	F: CTTCCATCACATCTGTAAC R: GTAAACATTAATATGcAcTTTCTTAG	AT	62	90	2
konzervované ptačí mikrosatelity	CAM-03 (nevedeno)	F: TTAGCATAGCTCAGCATTGCC R: CGAGCATTCAAMCCTGTCATC	TG	61	90	2
	CAM-07 (nevedeno)	F: AAATGATGAGRTCTGGGTGAG R: CCATTTCCAAGWGATTTGC	CT	58	90	3
	CAM-11 (nevedeno)	F: TGGTACAGGGACAGCAAACC R: AGATGCTGAGAGCGGATG	GT	54	90	2
	CAM-19 (nevedeno)	F: TCTTGGAGGCAGATARGAAGTG R: GAGCAAGCAAAGATCACAAGC	GT	66	90	2
	CAM-20 (nevedeno)	F: TAACAGGCAGGAATGCAGG R: TCAGCCAGTGTGGAGGTC	AT	44*	150	3
	CAM-24 (nevedeno)	F: CCCACTTCAGTCTTCAGAGC R: TGGAGTATTTGGGATTGGAG	CA	50	90	6

* – snížená koncentrace MgCl₂ v PCR mixu z 1,42 mmol/l na 1,07 mmol/l.

Tabulka č. 10: Genotypy 25 polymorfních mikrosatelitů amplifikovaných u 6 nepříbuzných jedinců plameňáka růžového 24 páry primerů.

Zdroj	Lokus	Počet alel	Genotypy
tučňák žlutorohý	Ech011	3	1/3 2/3 1/2 2/3 1/3 2/3
	Ech024	2	2/2 1/2 2/2 2/2 2/2 2/2
	Ech030	3	3/3 3/3 2/3 3/3 1/3 3/3
tučňák nejmenší	Em2	2	2/2 2/2 1/2 2/2 2/2 2/2
	Em8	4	2/4 2/2 2/3 2/3 1/3 3/4
	Em23	4	4/4 3/3 3/3 1/1 1/2 2/2
	Emm5	4	2/2 1/2 2/2 1/2 3/4 2/3
tučňák žlutooký	Man27	3	1/2 3/3 2/3 2/2 3/3 2/2
	Man47	2	1/2 1/1 1/1 1/1 1/1 1/1
	Man55	2	2/2 1/2 2/2 2/2 1/2 1/2
tučňák kroužkový	RM6	3	2/2 1/3 1/3 2/3 1/3 1/3
tučňák brýlový	PNN08	2	2/2 1/2 1/1 2/2 2/2 2/2
		4	2/3 3/3 3/4 1/1 3/3 2/3
tučňák Humboldtův	Sh1Ca12	2	2/2 1/1 1/2 1/1 2/2 1/2
EST ptačí mikrosatelity	TG01-148	2	2/2 2/2 2/2 2/2 1/2 2/2
	TG02-120	2	2/2 2/2 2/2 1/2 1/2 2/2
	TG03-035	2	1/1 1/2 1/1 1/1 1/1 1/1
	TG04-041	2	1/1 1/1 1/2 1/2 1/1 1/1
	TG05-030	2	1/2 2/2 2/2 2/2 2/2 2/2
konzervované ptačí mikrosatelity	CAM-03	2	2/2 1/2 2/2 2/2 2/2 2/2
	CAM-07	3	2/3 1/3 1/2 2/3 2/3 2/3
	CAM-11	2	2/2 2/2 1/2 1/1 1/2 1/1
	CAM-19	2	2/2 2/2 2/2 1/1 2/2 1/1
	CAM-20	3	1/1 2/3 3/3 2/3 1/3 2/2
	CAM-24	6	1/2 3/3 2/5 3/3 2/6 4/4

Na základě analýzy genotypů je možné, že lokusy Ech030, Man27, Man47 a TG05-030 jsou vázané na pohlaví (na chromozom Z), protože všechny čtyři testované samice byly homozygotní. Potvrdit to může analýza většího počtu jedinců.

Amplifikací 173 párů primerů u plameňáka růžového jsem získala 24 párů primerů amplifikujících polymorfní mikrosatelitový lokusy, tedy úspěšnost amplifikace polymorfního mikrosatelitu byla 13,9 %.

Testovala jsem celkem 113 párů primerů, které byly navrženy pro devět druhů z řádu tučňáci a získala jsem 13 polymorfních mikrosatelitových lokusů, čili úspěšnost byla 11,5 %. Polymorfní mikrosatelitový lokus jsem získala od 6 druhů tučňáka, konkrétně 4 polymorfní lokusy pro tučňáka nejmenšího, 3 polymorfní lokusy pro tučňáka žlutorohého a žlutookého a po jednom polymorfním lokusu pro tučňáka kroužkového a Humboldtova. Primery markeru PNN08 od tučňáka brýlového nasedaly na dvě různá místa v genomu,

tedy na dva různé lokusy, a získala jsem produkt se dvěma oblastmi polymorfismu. Produkty všech polymorfních lokusů vykazovaly od 2 do 4 alel.

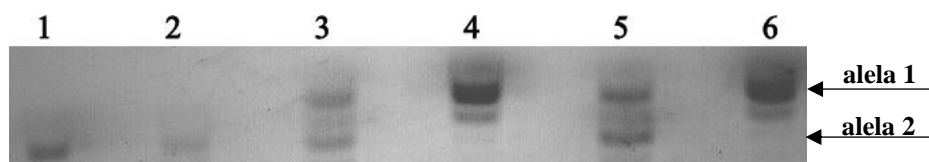
Z 60 testovaných univerzálních ptačích mikrosatelitů jsem získala dohromady 11 polymorfních produktů. Úspěšnost amplifikace těchto polymorfních lokusů byla 18,3 %. Těchto 60 univerzálních ptačích mikrosatelitů zahrnuje 36 párů primerů navržených pro 35 EST ptačích mikrosatelitů a 24 konzervovaných ptačích mikrosatelitů

Z 35 testovaných EST ptačích mikrosatelitů jsem získala 5 polymorfních lokusů, čili úspěšnost byla 13,8 %. Všechny polymorfní produkty vykazovaly po 2 alelách.

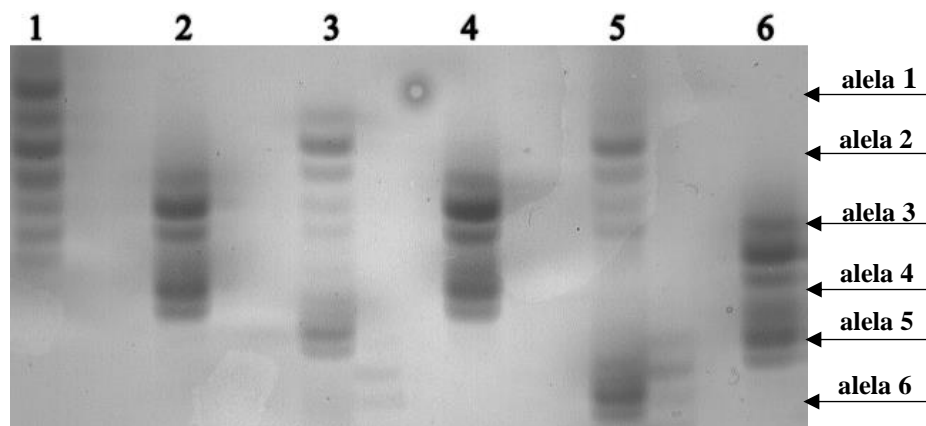
Z 24 testovaných konzervovaných ptačích mikrosatelitů bylo 6 lokusů polymorfních. Úspěšnost nalezení polymorfních lokusů byla 25 %. Produkty pěti polymorfních lokusů vykazovaly 2 nebo 3 alely a lokus CAM-24 vykazoval 6 alel.

Na následujících obrázcích jsou elektroforetogramy vybraných polymorfních mikrosatelitních lokusů, které jsem našla u plameňáka růžového. Na obrázku č. 6 je dvoualelový lokus CAM-11 a na obrázku č. 7 je šestialelový lokus CAM-24.

Obrázek č. 6: Elektroforetogram mikrosatelitního lokusu CAM-11. Na obrázku jsou vyznačeny dvě alely, které jsem získala amplifikací tohoto lokusu u 6 nepříbuzných jedinců plameňáka růžového při teplotě *annealingu* 54 °C a doba separace byla 90 minut.



Obrázek č. 7: Elektroforetogram mikrosatelitního lokusu CAM-24. Na obrázku je vyznačeno šest alel, které jsem získala amplifikací tohoto lokusu u 6 nepříbuzných jedinců plameňáka růžového při teplotě *annealingu* 50 °C a doba separace byla 90 minut.



Dle požadavků Katedry botaniky PřF UPOL jsem zpracovala didaktickou část na téma bakalářské práce a je součástí přílohy.

6 Diskuze

V praktické části své bakalářské práce jsem pomocí *cross-species* PCR amplifikace testovala celkem 173 párů primerů (113 mikrosatelitů izolovaných od zástupců z řádu tučňáci a 60 párů primerů amplifikujících univerzální ptačí mikrosatelity) na DNA šesti nepříbuzných jedinců plameňáka růžového. Celkem 24 párů primerů amplifikovalo 25 polymorfních produktů se 2 až 6 alelami.

Dosud bylo popsáno 147 polymorfních mikrosatelitů pro 10 druhů z řádu tučňáci. Já testovala 113 mikrosatelitních lokusů, odvozených od zástupců devíti druhů tučňáků (tučňák brýlový, galapážský, Humboldtův, kroužkový, magellanský, nejmenší, uzdičkový, žlutooký a žlutorohý). Polymorfní produkty poskytly pouze mikrosatelity izolované od tučňáka brýlového, Humboldtova, kroužkového, nejmenšího, žlutookého a žlutorohého.

Testováním 25 mikrosatelitů od tučňáka žlutorohého jsem našla tři polymorfní lokusy (viz tabulka č. 9) u 6 nepříbuzných jedinců plameňáka růžového. Ahmed *et al.* (2009) testovali tyto tři lokusy u tučňáka žlutorohého při teplotě *annealingu* T_a 60 °C. Autoři testovali lokus Ech011 na DNA 27 jedinců a našli 8 alel. Já jsem testovala lokus Ech011 při T_a 44 °C a našla jsem 3 alely. Druhý lokus Ech024 autoři testovali u 28 jedinců tučňáka žlutorohého a našli 5 alel, zatímco já jsem u plameňáka růžového našla 2 alely při T_a 62 °C. Třetí polymorfní lokus Ech030 autoři testovali u 28 jedinců tučňáka žlutorohého a našli 11 alel a já jsem našla 3 alely u plameňáka růžového při T_a 53 °C. Autoři provedli *cross-species* PCR amplifikaci se všemi 25 páry primerů navržených pro tučňáka žlutorohého vždy u třech jedinců tučňáka patagonského, oslího, uzdičkového a kroužkového při T_a 60 °C (viz tabulka č. 2). Lokus Ech011 vykazoval 5 alel u tučňáka patagonského, 2 alely u tučňáka kroužkového, a u tučňáka oslího i uzdičkového byl produkt monomorfní. Lokus Ech024 vykazoval polymorfní produkt pouze u tučňáka kroužkového a vykazoval 3 alely. U tučňáka patagonského a oslího vykazoval lokus Ech024 monomorfní produkt a u tučňáka uzdičkového se tento lokus nepodařilo amplifikovat. Lokus Ech030 vykazoval polymorfní produkt u tučňáka patagonského, oslího a uzdičkového a vykazoval po řadě 3, 5 a 5 alel. U tučňáka kroužkového vykazoval tento lokus monomorfní produkt.

Ve dvou pracích bylo pro tučňáka nejmenšího popsáno celkem 28 polymorfních mikrosatelitních lokusů. V první práci popsali Billing *et al.* (2007) 8 mikrosatelitů pro

tučňáka nejmenšího, které testovali při T_a 58 °C u jedinců z Filipova a Troubridgeova ostrova. Ve druhé práci popsali Grosser *et Waters* (2015) 20 mikrosatelitů pro tučňáka nejmenšího, které testovali při T_a 60 °C, ale o počtu testovaných jedinců se nezmiňují. Testováním 28 mikrosatelitů navržených pro tučňáka nejmenšího jsem našla u šesti nepříbuzných jedinců plameňáka růžového 4 polymorfni lokusy (viz tabulka č. 9). Amplifikací lokusu Em2 jsem našla u plameňáka růžového 2 alely při T_a 54 °C, zatímco Grosser *et Waters* (2015) našli u tučňáka nejmenšího 17 alel. Grosser *et Waters* (2015) našli amplifikací lokusu Em8 u tučňáka nejmenšího 10 alel a já jsem našla u plameňáka růžového 4 alely při T_a 50 °C. Testováním lokusu Em23 u tučňáka nejmenšího našli Grosser *et Waters* (2015) 9 alel, zatímco já jsem našla u plameňáka růžového 4 alely při T_a 55 °C. Billing *et al.* (2007) testovali lokus Emm5 u 28 jedinců tučňáka nejmenšího z Filipova ostrova a našli 11 alel a testováním lokusu u 15 jedinců tučňáka nejmenšího z Troubridgeova ostrova našli 8 alel. Já jsem amplifikací lokusu Emm5 u plameňáka růžového našla 4 alely při T_a 55 °C.

Od tučňáka žlutookého jsem testovala 12 mikrosatelitů u 6 nepříbuzných jedinců plameňáka růžového a našla jsem 3 polymorfni lokusy (viz tabulka č. 9). Bossenkool *et al.* (2008) testovali tyto mikrosatelitní lokusy na DNA 43 jedinců tučňáka žlutookého při T_a 48 °C. Autoři našli u tučňáka žlutookého amplifikací lokusu Man27 2 alely, zatímco já jsem u plameňáka růžového našla 3 alely při T_a 52 °C. Druhý mikrosatelitní lokus Man47 jsem testovala u plameňáka růžového při T_a 51 °C a našla jsem 2 alely, zatímco autoři našli u tučňáka žlutookého 4 alely. Na třetím polymorfni lokusu Man55 jsme našli shodně po 2 alelách, ale zatímco autoři testovali lokus u tučňáka žlutookého při T_a 48 °C, já jsem použila u plameňáka růžového T_a 55 °C.

Ze šesti mikrosatelitů od tučňáka kroužkového, které jsem testovala u 6 nepříbuzných jedinců plameňáka růžového, jsem našla jeden polymorfni lokus RM6 (viz tabulka č. 9). Roeder *et al.* (2001) testovali tento lokus u 432 jedinců tučňáka kroužkového a při T_a 57 °C našli 6 alel. Já jsem amplifikací lokusu RM6 u plameňáka růžového při T_a 56 °C našla 3 alely

Testováním 9 mikrosatelitů od tučňáka brýlového na šesti jedincích plameňáka růžového jsem našla polymorfni lokus PNN08 (viz tabulka č. 9). Labuschagne *et al.* (2013) našli u tučňáka brýlového 4 alely při teplotě *annealingu* v rozmezí od 50 do 60 °C. Já jsem našla amplifikací PNN08 u plameňáka růžového dvě místa polymorfismu se 2 a 4 alelami při T_a 53 °C.

Od tučňáka Humboldtova jsem testovala 13 mikrosatelitů u 6 nepříbuzných jedinců plameňáka růžového a našla jsem jeden polymorfni lokus Sh1Ca12 (viz tabulka č. 9). Při T_a 52 °C jsem našla 2 alely. Schlosser *et al.* (2003) testovali lokus Sh1Ca12 u 24 jedinců tučňáka Humboldtova a při T_a 60 °C našli 11 alel. Autoři navíc testovali všechny mikrosatelitní lokusy *cross-species* PCR amplifikací u dalších 8 druhů tučňáků. Lokus Sh1Ca12 amplifikoval polymorfni produkt vždy u 20 jedinců tučňáka brýlového a magellanského, vždy u 5 jedinců tučňáka jižního skalního, nejmenšího, oslího a patagonského. U pěti jedinců tučňáka žltorohého a u 2 jedinců tučňáka uzdičkového amplifikoval lokus Sh1Ca12 monomorfni lokus (viz tabulka č. 5). Konkrétní počty alel autoři nezmiňují.

Mezi 60 univerzálními ptačími mikrosatelity, které jsem testovala u 6 nepříbuzných jedinců plameňáka růžového, bylo 35 EST ptačích mikrosatelitů, pro které bylo navrženo 36 párů primerů, a 24 konzervovaných ptačích mikrosatelitů.

Pro plameňáka růžového jsem našla testováním 36 párů primerů pro EST ptačí mikrosatelity 5 polymorfni lokusů (viz tabulka č. 9). Dawson *et al.* (2010) testovali mikrosatelitní lokusy u 4 jedinců zebřičky pestré. Testováním lokusu TG01-148 jsme našli shodně po 2 alelách. Autoři použili T_a 56 °C u zebřičky pestré, zatímco já jsem amplifikovala lokus při T_a 44 °C u plameňáka růžového. Druhý lokus TG02-120 jsem amplifikovala u plameňáka růžového při T_a 55 °C a našla jsem 2 alely, zatímco autoři amplifikovali lokus u zebřičky pestré při teplotě 60 °C a určili ho jako monomorfni. Třetí lokus TG03-035 amplifikovali autoři u zebřičky pestré při T_a 59 °C a vyhodnotili lokus jako monomorfni, zatímco já jsem u plameňáka růžového našla 2 alely při T_a 55 °C. Na dalším testovaném lokusu TG04-041 jsme našli shodně po 2 alelách. Autoři amplifikovali tento lokus u zebřičky pestré při T_a 58 °C a já jsem u plameňáka růžového použila T_a 48 °C. Poslední lokus TG05-030 vyhodnotili autoři u zebřičky pestré jako monomorfni při T_a 53 °C, zatímco já jsem u plameňáka růžového našla 2 alely při T_a 62 °C.

Autoři testovali těchto 5 polymorfni lokusů *cross-species* PCR amplifikací u dalších druhů ptáků. V následující tabulce č. 11 je vyznačen počet alel u plameňáka růžového, zdrojových druhů (zebřička pestrá a kur bankivský) a dalších 20 druhů ptáků. U zvonka zeleného amplifikovalo polymorfni lokus všech 5 testovaných párů primerů. Naopak u druhů linduška kanárská, sýkora modřinka, kulík mořský a agapornis růžohrdlý amplifikovalo těchto 5 mikrosatelitních lokusů monomorfni produkt.

Tabulka č. 11: EST ptačí mikrosatelity polymorfní u plameňáka růžového (tato práce) a jejich testy u dalších 22 druhů ptáků (Dawson *et al.*, 2010). V tabulce je zvýrazněn počet alel v případě, kdy byl produkt polymorfní, monomorfní produkt je značen písmenem M. Čísla v závorkách značí počet testovaných jedinců.

Druh	Lokus				
	TG01-148	TG02-120	TG03-035	TG04-041	TG05-030
plameňák růžový	2 (6)	2 (6)	2 (6)	2 (6)	2 (6)
zebrička pestrá	2 (4)	M (4)	M (4)	2 (4)	M (4)
kur bankivský	M (4)	3 (4)	M (4)	2 (4)	M (4)
amada Gouldové	M (4)	M (5)	M (4)	M (4)	2 (4)
linduška kanárská	M (4)	M (4)	M (4)	M (4)	M (4)
vrabec domácí	3 (4)	2 (4)	M (4)	M (4)	M (4)
zvonek zelený	5 (21)	2 (21)	6 (16)	2 (19)	3 (20)
křivka obecná	7 (16)	4 (16)	2 (14)	M (17)	2 (16)
pěnkava obecná	4 (19)	2 (20)	M (20)	2 (20)	2 (20)
hýl obecný	4 (21)	4 (22)	M (20)	M (20)	2 (23)
vlaštovka australská	4 (4)	3 (4)	M (4)	3 (4)	M (4)
sýkora modřinka	M (4)	M (4)	M (4)	M (4)	M (4)
sýkora koňadra	M (4)	M (4)	M (4)	2 (4)	M (4)
rákosník velký	M (4)	M (4)	M (4)	2 (4)	2 (4)
sýkořice vínoprsá	3 (4)	M (4)	M (4)	2 (4)	M (4)
kos černý	M (4)	2 (4)	M (4)	M (4)	M (4)
timálievec pruhokřídli	M (4)	M (4)	M (4)	M (4)	3 (4)
straka americká	2 (4)	M (4)	2 (4)	M (4)	M (4)
popeláč šedý	M (4)	M (4)	M (4)	2 (4)	M (4)
kulík mořský	M (4)	M (4)	M (4)	M (4)	M (4)
kolibřík rezavolesklý	2 (6–8)	M (4)	4 (4)	M (4)	M (4)
sova pálená	M (4)	M (4)	M (4)	M (4)	M (4)
agapornis růžohrdlý	M (4)	M (4)	M (4)	M (4)	M (4)

Testováním 24 konzervovaných ptačích mikrosatelitů u šesti nepříbuzných jedinců plameňáka růžového jsem našla 6 polymorfních lokusů (viz tabulka č. 9). Dawson *et al.* (2013) testovali mikrosatelity při T_a 56 °C u jedinců zebričky pestré a kura bankivského. Autoři testovali lokus CAM-03 u 12 jedinců zebričky pestré a našli 11 alel a testováním lokusu u 4 jedinců kura bankivského našli 2 alely. Já jsem též našla 2 alely amplifikací lokusu CAM-03 u plameňáka růžového, ale použila jsem T_a 61 °C. Autoři testovali druhý lokus CAM-07 u 12 jedinců zebričky pestré a našli 6 alel, a u 3 jedinců kura bankivského, kde byl lokus monomorfní. Já jsem testovala CAM-07 u plameňáka růžového při T_a 58 °C a našla jsem 3 alely. Třetí lokus CAM-11 testovali autoři u 12 jedinců zebričky pestré a našli 6 alel a u 4 jedinců kura bankivského vyhodnotili lokus jako monomorfní. Já jsem amplifikací lokusu CAM-11 u plameňáka růžového našla 2 alely při T_a 54 °C. Amplifikací čtvrtého lokusu CAM-19 našli autoři

u 12 jedinců zebřičky pestré 6 alel a u 4 jedinců kura bankivského vyhodnotili lokus jako monomorfní. Já jsem testováním lokusu CAM-19 našla u plameňáka růžového 2 alely při T_a 66 °C. Další lokus CAM-20 jsem testovala u plameňáka růžového při T_a 44 °C a našla jsem 3 alely. Autoři testovali lokus CAM-20 u 12 jedinců zebřičky pestré a našli 6 alel a u 2 testovaných jedinců kura bankivského byl lokus monomorfní. Poslední polymorfní lokus CAM-24 jsem testovala u plameňáka růžového při T_a 50 °C a našla jsem 6 alel. Autoři testovali lokus CAM-24 u 12 jedinců zebřičky pestré a našli také 6 alel a testováním lokusu u 4 jedinců kura bankivského vyhodnotili lokus jako monomorfní.

Autoři testovali těchto 6 polymorfních mikrosatelitních lokusů *cross-species* PCR amplifikací u dalších 8 druhů ptáků z řádu pěvci a u 3 druhů „nepěvců“ (viz tabulka č. 12). U zdrojového druhu zebřičky pestré amplifikovalo všech 6 párů primerů polymorfní produkt.

Tabulka č. 12: Konzervované ptačí mikrosatelity polymorfní u plameňáka růžového (tato práce) a jejich testy u dalších 12 druhů ptáků (Dawson *et al.*, 2013). V tabulce je zvýrazněn počet alel v případě, kdy byl produkt polymorfní, monomorfní produkt je značen písmenem M. Čísla v závorkách značí počet testovaných jedinců.

Druh	Lokus					
	CAM-03	CAM-07	CAM-11	CAM-19	CAM-20	CAM-24
plameňák růžový	2 (6)	3 (6)	2 (6)	2 (6)	3 (6)	6 (6)
zebřička pestrá	11 (12)	6 (12)	6 (12)	6 (12)	6 (12)	6 (12)
kur bankivský	2 (4)	M (3)	M (4)	M (4)	M (2)	M (4)
linduška kanárská	4 (4)	M (4)	3 (4)	2 (4)	M (4)	M (4)
vrabec domácí	9 (12)	6 (12)	4 (12)	5 (12)	4 (12)	M (12)
pěnkava obecná	M (4)	3 (4)	2 (3)	2 (2)	4 (3)	M (4)
hýl obecný	M (4)	3 (4)	3 (4)	2 (2)	4 (3)	M (4)
sýkora koňadra	3 (4)	M (3)	M (4)	3 (4)	3 (3)	M (4)
kos černý	6 (4)	M (3)	M (4)	3 (4)	3 (3)	M (4)
sova pálená	M (4)	M (3)	2 (3)	2 (4)	M (3)	M (4)
pokřovník zelený	M (4)	3 (4)	3 (4)	2 (4)	2 (4)	2 (4)
buňáček dlouhokřídlí	M (6)	M (6)	4 (6)	4 (6)	4 (6)	6 (6)
mandelík hajní	M (4)	M (4)	2 (4)	M (4)	M (4)	4 (4)

V Laboratoři populační genetiky Katedry buněčné biologie a genetiky PřF UPOL byly mikrosatelity od tučňáků a univerzální ptačí mikrosatelity již testovány. Metodou

cross-species PCR amplifikace byly tyto mikrosatelitní lokusy testovány u nesyta indomalajského (Pechová, 2014), potápky roháče (Filipová, 2016), pelikána skvrnozobého (Šuláková, 2017), plameňáka karibského (Zlochová, 2017) a plameňáka růžového (tato práce).

Pechová (2014) testovala u 6 nepříbuzných jedinců nesyta indomalajského 135 párů primerů navržených pro mikrosatelity z řádu tučňáci a univerzální ptačí mikrosatelity (na rozdíl ode mě netestovala mikrosatelity popsané pro tučňáka nejmenšího, které popsali Grosser *et* Waters (2015), mikrosatelity pro tučňáka uzdičkového (Kang *et al.*, 2015) a lokusy TG01-086 a TG09-014 amplifikující EST ptačí mikrosatelity (Dawson *et al.*, 2010)) a získala 14 polymorfních lokusů. Amplifikací 77 párů primerů odvozených od 7 druhů z řádu tučňáci získala 10 polymorfních lokusů u nesyta indomalajského, z nichž jeden (Man27) jsem u plameňáka růžového vyhodnotila také jako polymorfní. Testováním 34 párů primerů EST ptačích mikrosatelitů našla u nesyta indomalajského jeden polymorfní mikrosatelit. Z 24 konzervovaných ptačích mikrosatelitů získala u nesyta indomalajského 3 polymorfní lokusy, z nichž 2 (CAM-03 a CAM-11) jsem u plameňáka růžového vyhodnotila také jako polymorfní. Lokusy, které byly polymorfní u 6 nepříbuzných jedinců plameňáka růžového a nesyta indomalajského, jsou vyznačené v tabulce č. 13.

Filipová (2016) testovala u 6 nepříbuzných jedinců potápky roháče celkem 171 párů primerů navržených pro mikrosatelity z řádu tučňáci a univerzální ptačí mikrosatelity (na rozdíl ode mě netestovala lokusy TG01-086 a TG09-014) a našla 19 polymorfních mikrosatelitních lokusů. Ze 113 mikrosatelitů od zástupců z řádu tučňáci vyhodnotila u potápky roháče 6 mikrosatelitů jako polymorfních, z nichž jeden (Emm5) jsem u plameňáka růžového vyhodnotila též jako polymorfní. Amplifikací 34 párů primerů pro EST ptačí mikrosatelity získala u potápky roháče 8 polymorfních lokusů, z nichž jeden (TG02-120) jsem u plameňáka růžového vyhodnotila také jako polymorfní. Testováním 24 konzervovaných ptačích mikrosatelitů získala u potápky roháče 5 polymorfních produktů a 3 z nich (CAM-11, CAM-19 a CAM-24) jsem u plameňáka růžového vyhodnotila také jako polymorfní. Lokusy, které byly polymorfní u 6 nepříbuzných jedinců plameňáka růžového a potápky roháče, jsou vyznačené v tabulce č. 13.

Šuláková (2017) testovala u 6 nepříbuzných jedinců pelikána skvrnozobého celkem 173 párů primerů navržených pro mikrosatelity z řádu tučňáci a univerzální ptačí mikrosatelity, a získala 14 polymorfních lokusů. Ze 113 mikrosatelitů od zástupců z řádu tučňáci našla u pelikána skvrnozobého 8 polymorfních lokusů, z nichž dva (Em8

a Emm5) jsem u plameňáka růžového označila také jako polymorfní. Testováním 36 párů primerů pro EST ptačí mikrosatelity získala u pelikána skvrnozobého jeden polymorfní produkt. Amplifikací 24 konzervovaných ptačích mikrosatelitů získala u pelikána skvrnozobého 5 polymorfních lokusů a dva z nich (CAM-11 a CAM24) jsem u plameňáka růžového vyhodnotila také jako polymorfní. Lokusy, které byly polymorfní u 6 nepříbuzných jedinců plameňáka růžového a pelikána skvrnozobého, jsou vyznačené v tabulce č. 13.

Zlochová (2017) testovala u 6 nepříbuzných jedinců plameňáka karibského celkem 171 párů primerů navržených pro mikrosatelity z řádu tučňáci a univerzální ptačí mikrosatelity (stejně jako Pechová (2014) a Filipová (2016) netestovala lokusy TG01-086 a TG09-14), a získala 23 polymorfních mikrosatelitů. Ze 113 mikrosatelitů navržených pro zástupce řádu tučňáci vyhodnotila u plameňáka karibského 16 polymorfních lokusů, z nichž jsem devět (Ech011, Ech024, Ech030, Em2, Em23, Man27, Man47, Man55 a PNN08) označila také jako polymorfní u plameňáka růžového. Testováním 34 párů primerů EST ptačích mikrosatelitů získala u plameňáka karibského polymorfní produkt u 3 lokusů. Amplifikací 24 konzervovaných ptačích mikrosatelitů u plameňáka karibského získala 4 polymorfní lokusy, z nichž 3 (CAM-11, CAM-20 a CAM-24) amplifikovaly polymorfní produkt také u plameňáka růžového. Lokusy, které byly polymorfní u 6 nepříbuzných jedinců plameňáka růžového a plameňáka karibského, jsou vyznačené v tabulce č. 13.

Lokus CAM-11 amplifikoval polymorfní produkt u všech pěti testovaných druhů z kladu *Aequorlornithes*, lokus CAM-24 byl polymorfní u 4 z 5 testovaných druhů, lokusy Man27 a Emm5 amplifikovaly polymorfní produkt u 3 z 5 testovaných druhů a ostatní lokusy byly polymorfní maximálně u dvou z testovaných druhů.

Úspěšnost *cross-species* PCR amplifikace polymorfního lokusu z řádu tučňáci a univerzálních ptačích mikrosatelitů byla největší u zástupců z řádu plameňáci, konkrétně u plameňáka růžového činila 13,9 % (tato práce) a u plameňáka karibského činila 13,5 % (Zlochová, 2017).

Tabulka č. 13: Porovnání polymorfních mikrosatelitů z řádů tučňáci a univerzálních ptačích mikrosatelitů, které byly pomocí *cross-species* PCR amplifikovány u plameňáka růžového (tato práce) s výsledky amplifikace u nesyta indomalajského (Pechová, 2014), potápky roháče (Filipová, 2016), pelikána skvrnozobého (Šuláková, 2017) a plameňáka karibského (Zlochová, 2017). V tabulce jsou vyznačeny počty alel v případě, kdy byl produkt polymorfní, monomorfní produkt je značen písmenem M. Čísla v závorkách označují počet testovaných jedinců.

Zdroj	Lokus	Počet alel daného lokusu u				
		PLR (6)	NI (6)	PR (6)	PS (6)	PLK (6)
tučňák žlutorohý	Ech011	3	M	M	M	3
	Ech024	2	M	M	M	2
	Ech030	3	M	M	M	3
tučňák nejmenší	Em2	2	NA	M	M	3
	Em8	4	NA	M	3	M
	Em23	4	NA	M	M	3
	Emm5	4	M	2	2	M
tučňák žlutooký	Man27	3	2	M	M	2
	Man47	2	M	M	M	2
	Man55	2	M	M	M	2
tučňák kroužkový	RM6	3	M	M	M	M
tučňák brýlový	PNN08	2+4	M	M	M	4
tučňák Humboldtův	Sh1Ca12	2	M	M	M	M
EST ptačí mikrosatelity	TG01-148	2	M	M	M	M
	TG02-120	2	M	2	M	M
	TG03-035	2	M	M	M	M
	TG04-041	2	M	M	M	M
	TG05-030	2	M	M	M	M
konzervované ptačí mikrosatelity	CAM-03	2	4	M	M	M
	CAM-07	3	M	M	M	M
	CAM-11	2	5	5	2	2
	CAM-19	2	M	4	M	M
	CAM-20	3	M	M	M	3
CAM-24	6	M	4	2	4	

PLR – plameňák růžový, NI – nesyt indomalajský, PR – potápka roháč, PS – pelikán skvrnozobý a PLK – plameňák karibský

V rámci Laboratoře populační genetiky Katedry buněčné biologie a genetiky PřF UPOL bylo pro plameňáka růžového testováno celkem 735 párů primerů (včetně mé bakalářské práce) pomocí *cross-species* PCR amplifikace. Jednalo se o mikrosatelity izolované pro zástupce z řádů brodiví, pěvci, potápky, potáplice, trubkonosí, tučňáci, veslonozí, několik málo pro dlouhokřídlé a vrubozobé a univerzální ptačí mikrosatelity. Těchto 735 párů primerů amplifikovalo u plameňáka růžového celkem 112 polymorfních mikrosatelitních lokusů a jsou vyjádřeny v obrázku č. 8.

Drobek (2008) testoval u 6 nepříbuzných jedinců plameňáka růžového 70 párů primerů navržených pro zástupce z řádu brodiví, potápky a veslonozí. Analýzu prováděl pomocí *cross-species* PCR amplifikace a testováním všech 70 párů primerů našel 7 polymorfních lokusů (3 polymorfní lokusy izolované od zástupců z řádu brodiví a 4 polymorfní lokusy izolované od zástupců z řádu veslonozí). Ve své diplomové práci navázal na svou bakalářskou práci a testoval dalších 214 párů primerů navržených pro zástupce z řádu brodiví, dlouhokřídli, potápky, potáplice, tučňáci, veslonozí a vrubozobí u 6 nepříbuzných jedinců plameňáka růžového (Drobek, 2013). Testováním těchto 214 párů primerů našel 22 polymorfních lokusů, konkrétně 1 polymorfní lokus izolovaný od zástupce z řádu dlouhokřídli, 9 polymorfních lokusů navržených pro zástupce z řádu brodiví a 12 polymorfních lokusů od zástupců z řádu veslonozí.

Manišová (2011) testovala u 6 nepříbuzných jedinců plameňáka růžového *cross-species* PCR amplifikací 47 mikrosatelitů odvozených od zástupců z řádu veslonozí a brodiví, které Drobek (2010) netestoval. Konkrétně se jednalo o druhy kormorán ušatý a chocholatý, faeton žlutozobý a volavka červenavá. Amplifikací u 6 nepříbuzných jedinců plameňáka růžového našla 5 polymorfních mikrosatelitních lokusů.

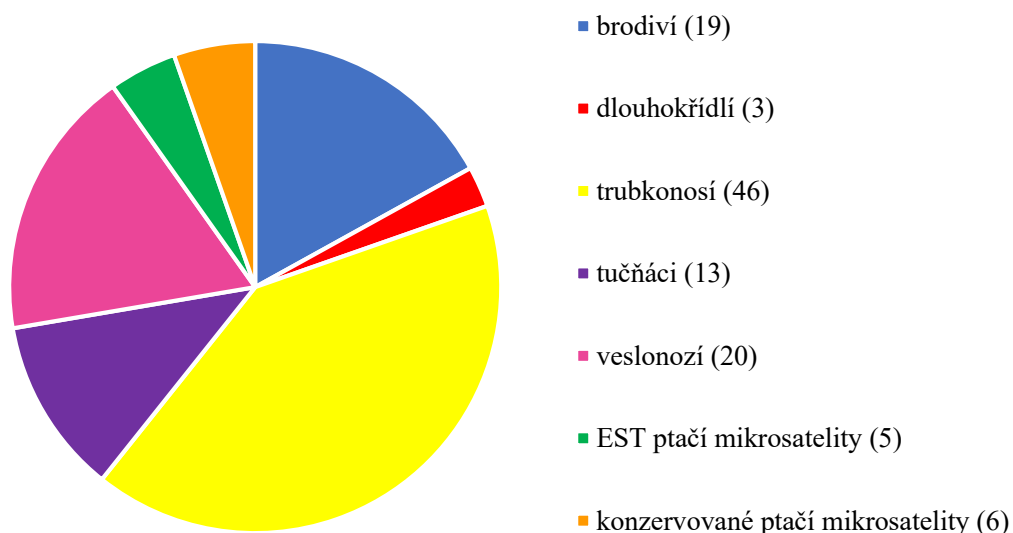
Málková (2013) testovala *cross-species* PCR amplifikací 19 nově popsáných mikrosatelitních lokusů od zástupců z řádu brodiví a našla 2 polymorfní lokusy u plameňáka růžového. Navíc retestovala 9 mikrosatelitních lokusů izolovaných od zástupců z řádů brodiví, veslonozí a potáplice u 22 jedinců plameňáka růžového, které již dříve Drobek (2010) označil u plameňáka růžového za monomorfní, a našla 4 polymorfní mikrosatelitní lokusy.

Kůrová (2017) testovala u 6 nepříbuzných jedinců plameňáka růžového 213 párů primerů, z nichž bylo 207 odvozeno od zástupců z řádu trubkonosí, dalších 5 mikrosatelitů bylo odvozeno od dlouhokřídliých a jeden lokus byl odvozen od zástupce z řádu pěvci. Z těchto 213 testovaných mikrosatelitních lokusů získala 48 polymorfních, z nichž 46 bylo popsáno pro zástupce z řádu trubkonosí a 2 popsané pro zástupce z řádu dlouhokřídli.

Já jsem testovala u 6 nepříbuzných jedinců plameňáka růžového pomocí *cross-species* PCR amplifikace celkem 173 párů primerů, které byly izolované pro zástupce z řádu tučňáci (113 mikrosatelitních lokusů) a univerzální ptačí mikrosatelity (36 párů primerů pro EST ptačí mikrosatelity a 24 konzervovaných ptačích mikrosatelitů). Amplifikací 173 párů primerů jsem u plameňáka našla 13 polymorfních lokusů z řádu

tučňáci, 5 polymorfních lokusů navržených pro EST ptačí mikrosatelity a 6 polymorfních lokusů izolovaných pro konzervované ptačí mikrosatelity.

Obrázek č. 8: Grafické rozdělení polymorfních mikrosatelitních lokusů u plameňáka růžového, které byly získány *cross-species* PCR amplifikací v Laboratoři populační genetiky Katedry buněčné biologie a genetiky PřF UPOL. Čísla v závorkách označují počet polymorfních lokusů izolovaných od zástupců jednotlivých skupin.



Jak bylo uvedeno výše, v rámci Laboratoře populační genetiky Katedry buněčné biologie a genetiky PřF UPOL, bylo u plameňáka růžového otestováno celkem 735 mikrosatelitních lokusů, z nichž 112 bylo polymorfních. To odpovídá úspěšnosti 15,2 %. Z celkového počtu otestovaných mikrosatelitních lokusů bylo 660 izolovaných od zástupců z kladu Aequorlitorornithes. Z 660 mikrosatelitů jich 101 amplifikovalo polymorfní mikrosatelitní lokus u plameňáka růžového, čili úspěšnost byla 15,3 %.

Na základě úspěšnosti amplifikace polymorfních mikrosatelitních lokusů, které byly původně izolované pro zástupce z kladu Aequorlitorornithes, doporučuji dotestovat nově publikované mikrosatelity, které zatím nebyly testovány, a dále mikrosatelity od zástupců z řádů slunatci a dlouhokřídlí, které Prum *et al.* (2015) řadí také do kladu Aequorlitorornithes. Dále navrhuji provést u polymorfních mikrosatelitních lokusů, které byly nalezené v mé bakalářské práci, genotypizaci na větším počtu jedinců plameňáka růžového, aby byly zjištěny charakteristiky mikrosatelitů, případné vazby mezi lokusy a následně mohly být tyto lokusy využity například k determinaci paternity nebo ke studiu populací plameňáků růžových.

7 Závěr

V této bakalářské práci jsem hledala polymorfní mikrosatelity u plameňáka růžového (*Phoenicopterus roseus*). Pomocí *cross-species* PCR amplifikace jsem testovala mikrosatelitní lokusy odvozené od zástupců z řádu tučňáci (Sphenisciformes) a univerzální ptačí mikrosatelity.

Celkem jsem testovala 173 párů primerů *cross-species* PCR amplifikací u 6 nepříbuzných jedinců plameňáka růžového. Z doposud známých 147 mikrosatelitů navržených pro zástupce z řádu tučňáci jsem testovala 113 mikrosatelitů odvozených od 9 druhů tučňáků (tučňák brýlový, galapážský, Humboldtův, kroužkový, magellanský, nejmenší, uzdičkový žlutooký a žlutorohý). V rámci univerzálních ptačích mikrosatelitů jsem testovala 35 EST ptačích mikrosatelitů, pro které bylo navrženo 36 párů primerů, a 24 konzervovaných ptačích mikrosatelitů.

Ze 173 testovaných párů primerů jsem našla 24 polymorfních lokusů, jejichž amplifikací jsem získala 25 polymorfních produktů (lokus PNN08 vykazoval dvě místa polymorfismu). Další 148 párů primerů amplifikovalo monomorfní produkt a jeden mikrosatelitní lokus se amplifikovat nepodařilo. Celková úspěšnost *cross-species* PCR amplifikace od zástupců z řádu tučňáci a univerzálních ptačích mikrosatelitů u plameňáka růžového činila 14,5 %. Ze 113 mikrosatelitů od zástupců z řádu tučňáci jsem našla 14 polymorfních lokusů, tedy úspěšnost amplifikace činila 12,4 %. Z 36 párů primerů pro EST ptačí mikrosatelity amplifikovalo polymorfní produkt 5 lokusů, tedy úspěšnost amplifikace byla 13,8 %. Amplifikací 24 konzervovaných ptačích mikrosatelitů jsem získala 6 polymorfních lokusů. Úspěšnost amplifikace konzervovaných ptačích mikrosatelitů byla největší a činila 25 %. Optimalizací podmínek PCR amplifikace a doby elektroforetické separace jsem u polymorfních lokusů vyhodnotila od 2 do 6 alel u plameňáka růžového.

Nakonec jsem porovnála výsledky předchozích prací, které vznikly v rámci Laboratoře populační genetiky na Katedře buněčné biologie a genetiky PřF UPOL, kde již testovali *cross-species* PCR amplifikací mikrosatelity izolované pro zástupce z kladu *Aequorlitorornithes* u plameňáka růžového. Včetně této bakalářské práce bylo doposud u plameňáka růžového testováno 735 párů primerů a bylo nalezeno 112 polymorfních mikrosatelitních lokusů.

Na základě požadavku Katedry botaniky PřF UPOL jsem zpracovala didaktickou část, ve které jsem navrhla zařazení tématu této bakalářské práce do výuky (viz příloha).

8 Literatura

- Ahmed, S., Hart, T., Dawson, D.A., Horsburgh, G.J., Trathan, P.N., Rogers, A.D. (2009): Isolation and characterization of macaroni penguin (*Eudyptes chrysolophus*) microsatellite loci and their utility in other penguin species (Spheniscidae, AVES). *Molecular Ecology Resources*, 9, 1530–1535.
- Akst, E., Boersma, P., Fleischer, R. (2002): A comparison of genetic diversity between the Galapagos Penguin and the Magellanic Penguin. *Conservation Genetics*, 3, 375–383.
- Aljanabi, S.M, Martinez, I. (1997): Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. *Nucleic Acids Research*, 25, 4692–4693.
- Bhargava, A., Fuentes, F.F. (2010): Mutational dynamics of microsatellites. *Molecular Biotechnology*, 44, 250–266.
- 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.
- Brookfield, J. (2001): Molecular drive. In: Brenner, S., Miller, J. (eds.): *Encyclopedia of genetics*. Academic Press, Barkeley, Los Angeles, 1233–1234.
- Campbell, N.A., Reece, J.B. (2006): *Biologie*. Computer Press, Brno.
- Carter, R.E. (2000): DNA fingerprinting using minisatellite probes. In: Baker A.J. (ed.): *Molecular Methods in Ecology*. Blackwell Science, Toronto, 113–135.
- Clark, D.P., Pazdernik, N.J. (2013): Polymerase chain reaction. *Molecular biology*. Academic Press, Amsterdam, Boston, Heidelberg, London, New York, Oxford, Paris, San Diego, San Francisco, Singapore, Sydney, Tokyo, 163–193.
- Dawson, D.A., Ball, A.D., Spurgin, L.G., Martín-Gálvez, D., Stewart, I.R.K., 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. (2018): Flamingos (Phoenicopteridae). In: del Hoyo, J., Elliott, A., Sargatal, J., Christie, D.A., de Juana, E. (eds.): *Handbook of the Birds of the world alive*. Lynx Edicions, Barcelona. Navštíveno 19. 3. 2018 na: <https://www.hbw.com/node/52208>.
- del Hoyo, J., Elliott, A., Sargatal, J., Imboden, C. (1992): *Handbook of the birds of the world*. Volume 1, Ostrich to ducks. Lynx Edicions, Barcelona.
- Drobek, A. (2008): Studium paternity u plameňáků (*Phoenicopterus* sp.) pomocí analýzy mikrosatelitové DNA. Bakalářská práce. Depon in: Knihovna biologických oborů PřF UPOL, Olomouc.
- Drobek, A. (2010): Analýza mikrosatelitových lokusů pro determinaci paternity u plameňáka karibského (*Phoenicopterus ruber*) a plameňáka růžového (*P. roseus*). Diplomová práce. Depon in: Knihovna biologických oborů PřF UPOL, Olomouc.
- Dumbovic, G., Forcales, S., Perucho, M. (2017): Emerging roles of macrosatellite repeats in genome organization and disease development. *Epigenetics*, 12, 515–526.
- 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.
- 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.
- Flores-Renteria, L., Krohn, A. (2013): Scoring microsatellite loci. In: Kantartzi, S.K. (ed.): *Microsatellites. Methods and Protocols*. Human Press, New York, Heidelberg, Dordrecht, London, 319–336.
- Gaisler, J., Zima, J. (2007): *Zoologie obratlovců*. Academia – nakladatelství Akademie věd České republiky, Praha.

- Garner, T.W.J., Gautschi, B., Röthlisberger, S., Reyer, H.U. (2000): A set of CA repeat microsatellite markers derived from the pool frog, *Rana lessonae*. *Molecular Ecology*, 9, 2173–2174.
- Glenn, T.C., Schable, N.A. (2005): Isolating microsatellite DNA loci. *Methods in Enzymology*, 395, 202–222.
- Gonzalez, E.G., Zardoya, R. (2013): Microsatellite DNA capture from Enriched Libraries. In: Kantartzi, S.K. (ed.): *Microsatellites. Methods and Protocols*. Human Press, New York, Heidelberg, Dordrecht, London, 67–87.
- Grosser, S., Waters, J.M. (2015): Development and characterisation of 20 novel microsatellite markers for the little blue penguin (*Eudyptula minor*) using nextgeneration sequencing. *Conservation Genetics Resources*, 7, 143–145.
- Hackett, S.J., Kimball, R.T., Reddy, S., Bowie, R.C., Braun, E.L., Braun, M.J., Chojnowski, J.L., Cox, W.A., Han, K.L., Harshman, J., Huddleston, C.J., Marks, B.D., Miglia, K.J., Moore, W.S., Sheldon, F.H., Steadman, D.W., Witt, C.C., Yuri, T. (2008): A phylogenomic study of birds reveals their evolutionary history. *Science*, 320, 1763–1767.
- Hlásek, J.L., (2011): *Phoenicopterus roseus* fe6102. Publikováno on-line na: http://www.hlasek.com/phoenicopterus_roseus_fe6102.html, navštíveno dne 20. 4. 2018.
- Jarvis, E.D., Mirarab, S., Aberer, A.J., Li, B., Houde, P., Li, C., Ho, S.Y.W., Faircloth, B.C., Nabholz, B., Howard, J.T., Suh, A., Weber, C.C., da Fonseca, R.R., Li, J., Zhang, F., Li, H., Zhou, L., Narula, N., Liu, L., Ganapathy, G., Boussau, B., Bayzid, S., Zavidovych, V., Subramanian, S., Gabaldón, T., Capella-Gutiérrez, S., Huerta-Cepas, J., Rekepalli, B., Munch, K., Schierup, M., Lindow, B., Warren, W.C., Ray, D., Green, R.E., Bruford, M.W., Zhan, X., Dixon, A., Li, S., Li, N., Huang, Y., Derryberry, E.P., Bertelsen, M.F., Sheldon, F.H., Brumfield, R.T., Mello, C.V., Lovell, P.V., Wirthlin, M., Schneider, M.P.C., Prosdocimi, F., Samaniego, J.A., Velazquez, A.M.V., Alfaro-Núñez, A., Campos, P.F., Petersen, B., Sicheritz-Ponten, T., Pas, A., Bailey, T., Scofield, P., Bunce, M., Lambert, D.M., Zhou, Q., Perelman, P., Driskell, A.C., Shapiro, B., Xiong, Z., Zeng, Y., Liu, S., Li, Z., Liu, B., Wu, K., Xiao, J., Yinqi, X., Zheng, Q., Zhang, Y., Yang, H., Wang, J., Smeds, L., Rheindt, F.E., Braun, M., Fjeldsa, J., Orlando, L., Barker, F.K., Jønsson, K.A., Johnson, W., Koepfli, K.P., O'Brien, S., Haussler, D., Ryder, O.A.,

- Rahbek, C., Willerslev, E., Graves, G.R., Glenn, T.C., McCormack, J., Burt, D., Ellegren, H., Alström, P., Edwards, S.V., Stamatakis, A., Mindell, D.P., Cracraft, J., Braun, E.L., Warnow, T., Jun, W., Gilbert, M.T.P., Zhang, G. (2014): Whole-genome analyses resolve early branches in the tree of life of modern birds. *Science*, 346, 1320–1331.
- Johnson, A., Cézilly, F. (2009): *The Greater flamingo*. T&AD Poyser, Londýn.
- 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.
- Kumar, S., Tamura, K., Nei, M. (2004): MEGA3: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. *Briefings in Bioinformatics*, 5, 150–163.
- Kůrová, V. (2017): *Cross-species* amplifikace mikrosatelitů z řádu trubkonosí u plameňáka růžového (*Phoenicopterus roseus*). Bakalářská práce. Depon in: Knihovna biologických oborů PřF UPOL, Olomouc.
- 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.
- Limborska, S., Khrunin, A., Verbenko, D. (2012): Minisatellite DNA markers in population studies. In: Fusté, M.C. (ed.): *Studies in population genetics*. InTech, Rijeka 55–84.
- Lovett, S.T. (2001): Tandem repeats. In: Brenner, S., Miller, J. (eds.): *Encyclopedia of genetics*. Academic Press, 932–1933.
- Martínez, I., Bonan, A.: (2018): Penguins (Spheniscidae). In: del Hoyo, J., Elliott, A., Sargatal, J., Christie, D.A., de Juana, E. (eds.): *Handbook of the Birds of the world alive*. Lynx Edicions, Barcelona. Navštíveno 12. 4. 2018 na: <https://www.hbw.com/node/52190>
- Málková, B. (2013): Analýza a charakteristika polymorfních *cross-species* mikrosatelitů u plameňáka růžového (*Phoenicopterus roseus*). Diplomová práce. Depon in: Knihovna biologických oborů PřF UPOL, Olomouc.

- Manišová, B. (2011): Analýza vybraných polymorfních *cross-species* mikrosatelitů pro determinaci paternity u plameňáka růžového (*Phoenicopterus roseus*). Bakalářská práce. Depon in: Knihovna biologických oborů PřF UPOL, Olomouc.
- Megléc, E., Pech, N., Gilles, A., Dubut, V., Hingamp, P., Trilles, A., Grenier, R., 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.
- Nicholls, J.A., Double, M.C., Rowell, D.M., Magrath, R.D. (2003): 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, L.C. (2006): Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. *Genetics and Molecular Biology*, 29, 294–307.
- Otová, B., Mihalová, R. (2012): *Základy biologie a genetiky člověka*. Karolinum Press, Praha.
- 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.
- Primmer, C.R., Painter, J.N., Koskinen, M.T., Palo, J.U., Merilä, J. (2005): Factors affecting avian cross-species microsatellite amplification. *Journal of Avian Biology*, 36, 348–360.
- Prum, R.O., Berv, J.S., Dornburg, A., Field, D.J., Townsend, J.P., Lemmon, E.M., Lemmon, A.R. (2015): A comprehensive phylogeny of birds (Aves) using targeted nextgeneration DNA sequencing. *Nature*, 526, 569–573.

- Ravishankar, K.V., Bommisetty, P. (2013): Simple sequence repeats amplification. In: Kantartzi, S.K. (ed.): *Microsatellites. Methods and Protocols*. Human Press, New York, Heidelberg, Dordrecht, London, 133–138.
- Roeder, A.D., Marshall, R.K., Mitchelson, A.J., Visagathilagar, T., Ritchie, P.A., Love, D.R., Pakal, 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.
- Rozen, S., Skaletsky, H. (2000): Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods in Molecular Biology*, 136, 365–386.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. (1989): *Molecular cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
- Schlosser, J.A., Dubach, J.M., Garner, T.W.J., Aray, B., Bernal, M., Simeone, A., Smith, K.A., Wallace, R.S. (2008): Evidence for gene flow differs from observed dispersal patterns in the Humboldt penguin, *Spheniscus humboldti*. *Conservation Genetics*, 10, 839–849.
- 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.
- 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.
- Sibley, C.G., Monroe, B.L. (1991): *Distribution and taxonomy of birds of the world*. Yale University Press, New Haven.
- Šuláková, M. (2017): *Cross-species amplifikace mikrosatelitů z řádu tučňáci a konzervovaných ptačích mikrosatelitů u pelikána skvrnozobého (Pelecanus philippensis)*. Bakalářská práce. Depon in: Knihovna biologických oborů PřF UPOL, Olomouc.
- Tóth, G., Gáspári, Z., Jurka, J. (2000): Microsatellites in different eukaryotic genomes: Survey and analysis. *Genome Research*, 10, 967–981.
- Trent, R.J. (2012): *Molecular medicine Genomics to personalized healthcare*. (Fourth edition). Academic Press, London, Waltham, San Diego.

- Vianna, J.A., Noll, D., Mura-Jornet, I., Valenzuela-Guerra, P., 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.
- Wong, H.Y. (2001): Selfish DNA. In: Brenner, S., Miller, J. (eds.): *Encyclopedia of genetics*. Academic Press, 1805–1808.
- Wyss, F.S., Wenker, C.J. (2014): Phoenicopteriformes. In: Miller, R.E., Fowler, M. (eds.): *Fowler's ZOO and wild animal medicine*. Vol. 8. Elsevier Health Science, Londýn. 105–112.
- Yang, H., Kang, W., Nahm, S., Kang, B. (2015): Methods for developing molecular markers. In: Koh, H., Kwon, S., Thomson, M. (eds.): *Current technologies in plant molecular breeding: A guide book of plant molecular breeding for researchers*. Springer, 15–50.
- Zane, L., Bargelloni, L., Patarnelo, T. (2002): Strategies for microsatellite isolation. *Molecular Ecology*, 11, 1–16.
- Zlochová, A. (2017): *Cross-species* amplifikace mikrosatelitů z řádu tučňáci a konzervovaných ptačích mikrosatelitů u plameňáka karibského (*Phoenicopus ruber*). Bakalářská práce. Depon in: Knihovna biologických oborů PřF UPOL, Olomouc.

Seznam symbolů a zkratk

A	adenin
Bp	páry bází
C	cytozin
CAM	konzervované ptačí mikrosatelity (<i>Conserved Avian Microsatellite</i>)
cDNA	komplementární deoxyribonukleová kyselina
DNA	deoxyribonukleová kyselina
dNTPs	deoxyribonukleosid trifosfáty
EST	exprimované sekvenční úseky (<i>Expressed Sequence Tag</i>)
G	guanin
LINEs	dlouhé rozptýlené jaderné repetice (<i>Long Interspersed Nuclear Elements</i>)
PCR	polymerázová řetězová reakce (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
SINEs	krátké rozptýlené jaderné repetice (<i>Short Interspersed Nuclear Elements</i>)
SSRs	opakování jednoduchých sekvencí (<i>Simple Sequence Repeats</i>)
STRs	krátké tandemové repetice (<i>Short Tandem Repeats</i>)
T	thymin
T _a	teplota <i>annealingu</i>
VNTRs	variabilní počet tandemových repeticet (<i>Variable Number Of Tandem Repeats</i>)

Seznam obrázků

Obrázek č. 1: Infrařád Ciconiides podle Sibley <i>et al.</i> (1988) se zvýrazněnými čeledmi plameňákovití (Phoenicopteridae) a tučňákovití (Spheniscidae).	3
Obrázek č. 2: Část kladu Metaves zahrnující plameňáky – výřez kladogramu ptáků. ...	4
Obrázek č. 3: Zařazení plameňáků do kladu Columbea dle Jarvis <i>et al.</i> (2014) se zvýrazněnými řády plameňáci (Phoenicopteriformes) a tučňáci (Sphenisciformes).	4
Obrázek č. 4: Výřez kladogramu se zvýrazněním plameňáků a tučňáků – zařazení plameňáků do kladu Aequirornithes podle Prum <i>et al.</i> (2015).	5
Obrázek č. 5: Plameňák růžový (<i>Phoenicopus roseus</i>).	7
Obrázek č. 6: Elektroforetogram mikrosatelitního lokusu CAM-11.	37
Obrázek č. 7: Elektroforetogram mikrosatelitního lokusu CAM-24.	37
Obrázek č. 8: Grafické rozdělení polymorfních mikrosatelitních lokusů u plameňáka růžového, které byly získány <i>cross-species</i> PCR amplifikací v Laboratoři populační genetiky Katedry buněčné biologie a genetiky PřF UPOL.	47

Seznam tabulek

Tabulka č. 1: Rozdělení řádu tučňáci (Sphenisciformes) na jednotlivé rody a druhy podle del Hoyo <i>et al.</i> (2018) s údaji o počtu mikrosatelitů (MS) popsanych u jednotlivých druhů.	12
Tabulka č. 2: <i>Cross-species</i> PCR amplifikace se všemi 25 páry primerů navrženými pro tučňáka žltorohého.	14
Tabulka č. 3: <i>Cross-species</i> PCR amplifikace s primery navrženými pro tučňáka kroužkového (AP), uzdičkového (CP) a oslího (GP).	19
Tabulka č. 4: <i>Cross-species</i> PCR amplifikace s primery navrženými pro tučňáka brýlového (B3-2), galapážského (G2-2, G3-11 a G3-6) a Humboldtova (H2-6).	20
Tabulka č. 5: <i>Cross-species</i> PCR amplifikace s primery navrženými pro tučňáka Humboldtova u jedinců tučňáka brýlového, jižního skalního, magellanského, nejmenšího, oslího, uzdičkového, patagonského a žltorohého.	21
Tabulka č. 6: Seznam mikrosatelitů z řádu tučňáci testovaných na polymorfismus u plameňáka růžového.	27
Tabulka č. 7: Seznam univerzálních ptačích mikrosatelitů testovaných na polymorfismus u plameňáka růžového.	28
Tabulka č. 8: Složení PCR mixu pro 6 jedinců.	29
Tabulka č. 9: Charakteristika 24 párů primerů (respektive 25 amplifikovaných polymorfních mikrosatelitů) u 6 nepříbuzných jedinců plameňáka růžového.	34
Tabulka č. 10: Genotypy 25 polymorfních mikrosatelitů amplifikovaných u 6 nepříbuzných jedinců plameňáka růžového 24 páry primerů.	36
Tabulka č. 11: EST ptačí mikrosatelity polymorfni u plameňáka růžového (tato práce) a jejich testy u dalších 22 druhů ptáků (Dawson <i>et al.</i> , 2010).	41
Tabulka č. 12: Konzervované ptačí mikrosatelity polymorfni u plameňáka růžového (tato práce) a jejich testy u dalších 12 druhů ptáků (Dawson <i>et al.</i> , 2013).	42
Tabulka č. 13: Porovnání polymorfismu mikrosatelitů z řádu tučňáci a univerzálních ptačích mikrosatelitů u 5 zástupců kladu Aequorlitorornithes.	45

Přílohy

Příloha obsahuje didaktickou část, která je povinnou součástí bakalářské práce studentů učitelského studia biologie na Katedře botaniky PřF UPOL.

Didaktická část

1) Zařazení tématu do výuky

Téma mé bakalářské práce je nad rámec RVP, proto bych se zaměřila na téma biologie plameňáků, které je také součástí této práce. V rámcovém vzdělávacím programu spadá toto téma pod biologii živočichů. Biologie plameňáků je vhodné téma pro výuku na střední škole a gymnáziu.

2) Plán výuky

Pro téma biologie plameňáků bych vyhradila jednu vyučovací hodinu. V první polovině hodiny bych seznámila žáky s tématem vyučovací hodiny a zeptala se, zdali viděli plameňáka například v ZOO a jestli tuší, o jaký druh se jednalo. Dále bych zařadila řád plameňáci do systému, na mapě ukázala areál plameňáků a seznámila žáky s charakteristickými anatomickými a morfologickými znaky těchto ptáků. Ve druhé polovině vyučovací hodiny bych žákům zadala samostatné cvičení v rámci opakování předešlé hodiny biologie, ve kterém by měli za úkol popsat kostru ptáka a napsat anatomické znaky, kterými se liší kostra plameňáků od kostry z obrázku. Žáci, kteří by zadanou práci úspěšně zvládli, bych ohodnotila známkou 1. Na závěr hodiny bych nechala prostor pro dotazy a s žáky se rozloučila.

3) Vyučovací text

Taxonomické zařazení plameňáků:

Říše:	živočichové (Animalia)
Kmen:	strunatci (Chordata)
Podkmen:	obratlovci (Vertebrata)
Třída:	ptáci (Aves)
Podtřída:	letci (Neognathae)
Řád:	plameňáci (Phoenicopteriformes)

Řád plameňáci zahrnuje jedinou čeleď plameňákovití, kterou tvoří 3 rody. Do těchto rodů patří 6 druhů plameňáků: plameňák malý, andský, Jamesův, karibský, chilský a nejznámější plameňák růžový.

Areál plameňáků zahrnuje středoamerický poloostrov Yucatán, sever a jih Jižní Ameriky a Galapážské souostroví. V Evropě jsou plameňáci rozšíření na jihu Portugalska, Španělska a Francie. Dále se plameňáci vyskytují téměř ve všech pobřežních

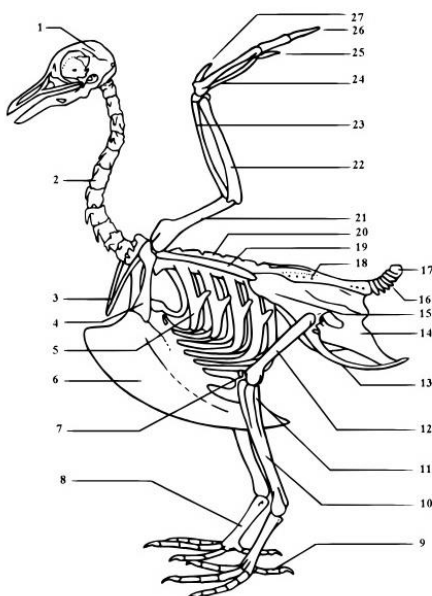
státech Afriky, na Středním východě a v Indii. Plameňáci obývají mělké zálivy, laguny a jezera.

Plameňáci jsou vysokonozí vodní ptáci, vysocí 90–155 cm. Mají dlouhý krk, který je tvořen sedmnácti krčními obratli. Plameňáci mají zajímavě utvořený zobák, který je v půli zalomený a směřuje šikmo dopředu dolů. Pomocí rohovitých lamel, které jsou umístěny na vnitřních stranách čelistí a na jazyku, filtrují plameňáci potravu z vody a bahna. Jejich potravu tvoří členovci, měkkýši a fytoplankton. Tito monogamní ptáci hnízdí v koloniích. Hnízdo, které je tvořeno bahnem, kamením a rostlinným materiálem, má tvar komolého kužele. Samice snáší jedno bílé vejce. Mláďata jsou krmivá, mají bílošedou barvu a typické růžové zbarvení získávají příjmem karotenoidních pigmentů, které jsou obsažené v jejich potravě.

4) Pracovní list

Úkol č. 1: Popište kostru ptáka.

Obrázek: Kostra ptáka. (Svtiste, 2007, publikováno on-line na: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Bird_skeleton.svg, navštíveno dne 25. 7. 2018. Tento obrázek je licencován za podmínky: <http://www.gnu.org/copyleft/fdl.html>).



Úkol č. 2: Napište 3 anatomické znaky, kterými se liší kostra plameňáků od kostry ptáka z úkolu č. 1.