

Univerzita Palackého v Olomouci

Bakalářská práce

Olomouc 2017

Alžběta Zlochová

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



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

Bakalářská práce

Alžběta Zlochová

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma: Prezenční

Olomouc 2017

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

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

V Olomouci dne 31. 7. 2017

.....

Chtěla bych poděkovat vedoucímu mé bakalářské práce RNDr. Petru Nádvořníkovvi, Ph.D. za jeho čas, ochotu a trpělivost, kterou mi věnoval po celou dobu zpracovávání teoretické i experimentální části mé bakalářské práce, a také za rady a materiály, které mi poskytl.

Souhrn

V této bakalářské práci jsem hledala pomocí *cross-species* PCR amplifikace polymorfnní mikrosatelity, které se vyskytují u plameňáka karibského (*Phoenicopterus ruber*). Byly amplifikovány mikrosatelity z řádu tučňáci a také univerzální ptačí mikrosatelity – EST mikrosatelity a konzervované ptačí mikrosatelity.

V teoretické části jsem se zabývala obecnou charakteristikou plameňáků, řešila jsem problematiku zařazení plameňáků do systému ptáků a charakterizovala jsem plameňáka karibského. Dále jsem se zaměřila na obecnou charakteristiku mikrosatelitů a popsala jsem mikrosatelity odvozené z řádu tučňáci a univerzální ptačí mikrosatelity.

V experimentální části jsem řešila *cross-species* PCR amplifikaci 171 párů primerů pro amplifikaci polymorfnních mikrosatelitů u 6 nepříbuzných jedinců plameňáka karibského. Z nich bylo 113 párů primerů navrženo pro mikrosatelity odvozené od 9 druhů z řádu tučňáci a 58 párů primerů bylo pro univerzální ptačí mikrosatelity. Nalezla jsem 23 párů primerů, které amplifikovaly polymorfnní produkt, z nichž bylo 16 párů primerů pro mikrosatelity popsané u 6 druhů z řádu tučňáci, 4 páry primerů byly pro konzervované ptačí mikrosatelity a 3 páry primerů byly navrženy pro EST mikrosatelity. U polymorfnních mikrosatelitů jsem detekovala od 2 do 7 alel.

Summary

The aim of my bachelor thesis was to find polymorphic microsatellites using the *cross-species* PCR amplification method. In Caribbean flamingo (*Phoenicopterus ruber*) tested polymorphic microsatellites from the order Sphenisciformes, conserved avian microsatellites and EST microsatellites.

In the theoretical part I focused on general characterisation of flamingos, their phylogenetical position in the avian system and detailed characterisation of the Caribbean flamingo. I also described general characteristics of microsatellites and those which are derived from the order Sphenisciformes and universal avian microsatellites.

Experimental part consisted the *cross-species* PCR amplification of 171 primer pairs which were used to amplify polymorphic microsatellites in 6 unrelated Caribbean flamingo individuals. Out of these 171, 113 primer pairs were designed for the microsatellites derived from 9 species of the order Sphenisciformes and the other 58 primer pairs were designed for the universal avian microsatellites. I found 23 primer pairs in total which amplified a polymorphic product, out of which 16 primer pairs were for the microsatellites of the order Sphenisciformes, 4 primer pairs were for the conserved avian microsatellites and 3 primer pairs were for the EST microsatellites. I detected from 2 to 7 alleles per locus.

Obsah

1	Úvod	7
2	Cíle práce	8
3	Literární přehled	9
3.1	Plameňáci.....	9
3.2	Zařazení plameňáků do systému ptáků.....	11
3.3	Plameňák karibský.....	12
3.3.1	Taxonomické zařazení plameňáka karibského	13
3.4	Mikrosatelity.....	14
3.4.1	Mikrosatelity z řádu tučňáci	15
3.4.2	Univerzální ptačí mikrosatelity	25
4	Materiál a metody	29
4.1	Biologický materiál	29
4.2	Chemikálie.....	29
4.3	Roztoky.....	30
4.4	Laboratorní přístroje	31
4.5	PCR amplifikace.....	32
4.6	Elektroforetická separace	35
5	Výsledky	38
6	Diskuze	45
7	Závěr	52
8	Seznam použitých zkratk	53
9	Použitá literatura.....	54

1 Úvod

Mikrosatelity jsou krátké úseky DNA, ve kterých se vyskytuje tandemové uspořádání repetitivních jednotek, které jsou dlouhé v řádu jednotek bází. Vyskytují se v kódujících i nekódujících oblastech genomu prokaryotních a eukaryotních organismů. Jsou vysoce polymorfní a mají vyšší mutační rychlost než zbytek genomu. Mají velké využití, jako molekulární markery, ve velkém množství genetických studií, jako je populační genetika, studium paternity anebo taxonomie.

V rámci této bakalářské práce bude u 6 nepříbuzných jedinců plameňáka karibského (*Phoenicopterus ruber*) pomocí *cross-species* PCR amplifikace testováno 171 párů primerů pro amplifikaci mikrosatelitů. Z testovaných párů primerů bude 113 odvozeno od mikrosatelitů z řádu tučňáci a 58 bude pro univerzální ptačí mikrosatelity, z nichž 34 párů primerů bude pro EST mikrosatelity a 24 pro konzervované ptačí mikrosatelity.

2 Cíle práce

1. Vypracování rešerše na téma bakalářské práce.
2. Shromáždění dostupných literárních zdrojů.
3. PCR amplifikace DNA plameňáka karibského (*Phoenicopterus ruber*) s využitím *cross-species* primerů pro mikrosatelity, které jsou známé u ptáků z řádu tučňáci a pro konzervované ptačí mikrosatelity.

3 Literární přehled

3.1 Plameňáci

Řád plameňáci (Phoenicopteriformes) je podle del Hoyo *et al.* (1992) jeden z nejstarších ptačích řádů, což dokazují fosílie, které pocházejí z období oligocénu, asi 30 miliónů let nazpět. Některé fosílie byly nalezeny i v Evropě či Austrálii, kde se již plameňáci přirozeně nevyskytují. To je důkazem zmenšujícího se počtu a přirozeného výskytu plameňáků na Zemi (del Hoyo *et al.*, 1992).

Do řádu plameňáci patří podle všech autorů pouze jedna čeleď, plameňákovití (Phoenicopteridae). V dalším zařazení jsou ale rozpory mezi autory. Podle del Hoyo *et al.* (1992) tato čeleď obsahuje tři rody – *Phoeniconaias*, *Phoenicoparrus*, *Phoenicopterus*. Rozřazení do těchto rodů vzniklo na základě morfologických rozdílů nohou a zobáku. Charakteristickým znakem pro rod *Phoeniconaias* je absence zadního prstu na nohou, zatímco u rodu *Phoenicoparrus* na nohou zadní prst je. Naopak stavba zobáku je u těchto dvou rodů stejná, ale odlišná od stavby zobáku rodu *Phoenicopterus*. Do rodu *Phoeniconaias* patří druh plameňák malý (*P. minor*), do rodu *Phoenicoparrus* se řadí druhy plameňák andský (*P. andinus*) a Jamesův (*P. jamesi*). Do třetího rodu *Phoenicopterus* řadí del Hoyo *et al.* (1992) 2 druhy – plameňáka chilského (*P. chilensis*) a velkého (*P. ruber*), do kterého autoři řadí jako poddruhy plameňáka karibského (*P. ruber ruber*) a růžového (*P. ruber roseus*). Podle Torres *et al.* (2014) však existují pouze 2 rody – *Phoenicoparrus*, kam řadí druhy plameňák malý, andský a Jamesův, a *Phoenicopterus*, kam zařazuje druhy plameňák chilský, karibský a růžový. Tito autoři neberou plameňáka karibského a růžového, jako poddruhy, ale jako 2 samostatné druhy, stejně jako já v rámci této bakalářské práce.

Plameňáci jsou velcí vodní brodiví ptáci nepřehlédnutelní díky jejich charakteristickému růžovému zbarvení peří, dlouhým nohám a krku. Jsou vysocí 80–155 cm, přičemž samice jsou menší než samci. Jejich tělo je oválné s dlouhým krkem a poměrně malou hlavou, která je zakončena mohutným zobákem, který je v polovině zahnutý dolů (del Hoyo *et al.*, 1992).

Oproti jiným vodním ptákům mají plameňáci v poměru k tělu dlouhé nohy a krk. Je tomu tak kvůli přizpůsobení se způsobu shánění potravy. Dlouhé nohy jim umožňují se krmit ve velkých hloubkách a kvůli tomu se i opeření na holeních redukovalo až takřka

k břichu. Nohy mají ukončeny čtyřmi prsty. Tři prsty směřují dopředu a jsou opatřeny plovací blánou, která jim poskytuje oporu při chůzi v bahně a usnadňuje jim krmení ve velkých hloubkách během plavání (del Hoyo *et al.*, 1992). Dlouhý krk jim napomáhá při krmení v mělkých vodách svou ohebností a možností širšího a rychlejšího pohybu. Skládá se ze 17 krčních obratlů, které jsou protažené a vytvářejí tak charakteristické postupné ohnutí krku.

Příjem potravy je unikátní ve filtrační schopnosti zobáku, která je podobná jako u velryb. Horní čelist je menší než spodní a hrany čelistí jsou pokryty velkým množstvím v řadách uspořádaných rohovitých lamel, které mají na povrchu jemné vlásky. Při krmení mají plameňáci zobák ponořený ve vodě a pootevřený. Mezi čelistmi je mezera po celé délce téměř stejná, díky charakteristickému zahnutí zobáku. Jazyk využívají jako píst, kterým nasávají vodu a vytlačují ji ze zobáku. Při nasátí vody s bahnem a organickými částmi do zobáku se vnitřní lamely stlačí a projdou jen části velké jako štěrbinu mezi čelistmi. Poté během vytlačení vody se lamely narovnají a začnou plnit funkci filtru. V zobáku zůstane pouze potrava, která je následně posunuta do hltanu masivním jazykem s trny (Cramp *et Simmons*, 1977, del Hoyo *et al.*, 1992). Potrava plameňáka malého se skládá především ze zelených řas a rozsivek, zatímco plameňák karibský se živí nejen řasami, rozsivkami a organickými částmi z bahna, ale především bezobratlými živočichy, jako jsou malí měkkýši, korýši a larvy pakomárů (Cramp *et Simmons*, 1977). Jednotlivé druhy plameňáků mají různé tvary, počty, uspořádání a rozměry rohovitých lamel a vlásků v zobáku. Díky tomu nevzniká kompetice mezi jednotlivými druhy, i kdyby žily ve stejném prostředí, jelikož přijímají různou potravu (del Hoyo *et al.*, 1992).

Peří mládřat je šedé s hnědým a růžovým nádechem, zatímco u dospělých plameňáků je růžové až karmínové s černými letkami. Růžové zbarvení pochází z karotenoidních pigmentů, které se vyskytují v potravě – v řasách či bezobratlých. Tyto pigmenty jsou pomocí jaterních enzymů zpracovány a využity pro zbarvení těla, které je nedílnou součástí namlouvacího rituálu. Neopeřené části těla jsou růžové, červené nebo dokonce oranžové (Cramp *et Simmons*, 1977, del Hoyo *et al.*, 1992).

Plameňáci se vyskytují na všech kontinentech, kromě Austrálie a Antarktidy (del Hoyo *et al.*, 1992). Obývají mělká jezera a laguny, které jsou poloslané, slané či alkalické (Cramp *et Simmons*, 1977). Hodnota pH v alkalických vodách dosahuje někdy až 10,5 a salinita slaných jezer dosahuje až dvojnásobku salinity moře. Je pozoruhodné, jak dokáží tito ptáci přežít drsné podmínky, jako je vysoký obsah chloridů, uhličitanu

sodného, síranů a fluoridů ve vodě, která dosahuje někdy teploty až 68 °C (del Hoyo *et al.*, 1992).

Plameňáci jsou společenší ptáci, a proto vytvářejí velké a početné kolonie. Páry jsou monogamní a stálé. Skupinové rituály nejsou vázány na určité území ani na období páření. Probíhají ve velkých skupinách za doprovodu hlasitého křiku. Jsou iniciovány samci, ale účastní se jich obě pohlaví. Společný rituál ve skupině může být považován za přizpůsobení se měnícím se podmínkám. Za příznivých podmínek zahájí intenzivní rituál, který slouží k vytvoření skupiny jedinců ve stejném fyziologickém stavu a následnému rozmnožování, a snášení vajec do hnízd, ve stejném období (Cramp *et Simmons*, 1977, del Hoyo *et al.*, 1992). Hnízda stavějí obě pohlaví převážně z vlhkého bahna, popřípadě z peří a kamenů. Vytvoří malou hromadu, nahoře promáčkou, kde samice snesou obvykle 1 velké vejce. Na vejci sedí oba rodiče 27–31 dní, poté oba krmí potomka, který opouští hnízdo po 7–12 dnech. Jedinec dosáhne pohlavní dospělosti ve 2–3 letech (Cramp *et Simmons*, 1977).

3.2 Zařazení plameňáků do systému ptáků

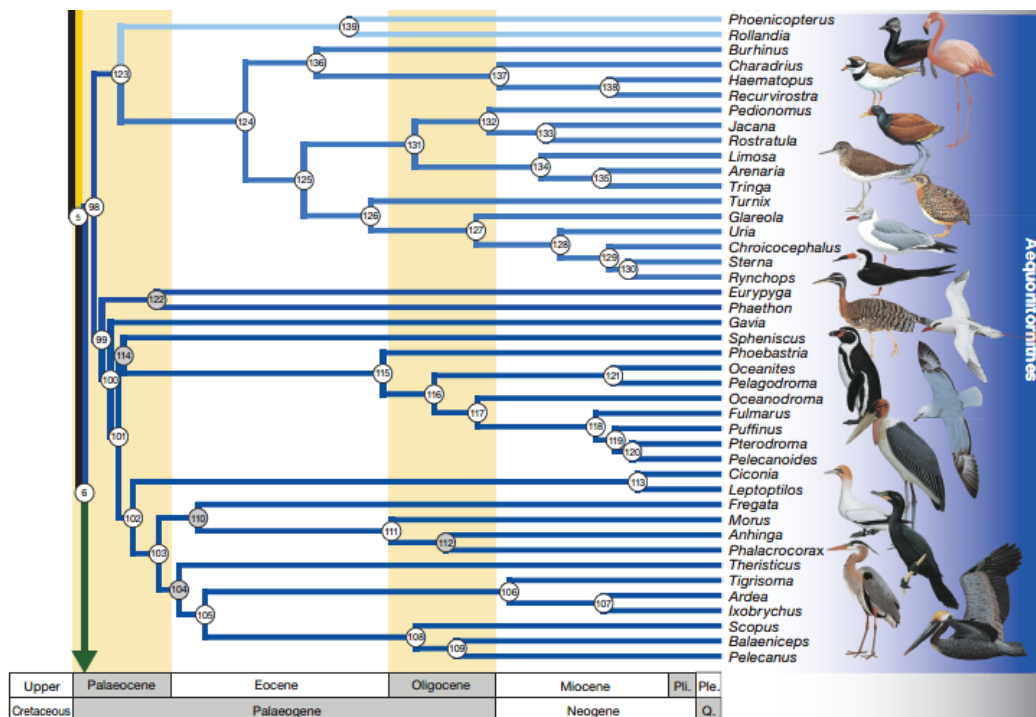
Podle starší literatury spadá řád plameňáci (Phoenicopteriformes), společně s řádem tučňáci (Sphenisciformes) a brodiví (Ciconiiformes), do nadřádu letci (Neognathae) (Šťastný *et al.*, 1998, Veselovský, 2001, Gaisler *et Zima*, 2007).

Zásadní krok v zařazení Neoaves, a tedy i plameňáků, učinili Jarvis *et al.* (2014). Provedli celogenomovou analýzu pro rané rozdělení větví fylogenetického stromu současně žijících ptáků (Neornithes) a potvrdili rozdělení na 2 základní skupiny – Palaeognathae a Neognathae. Skupinu Neognathae dále rozdělili na Galloanseres a Neoaves. Skupinu Neoaves rozdělili na dva sesterské monofyletické klady Passerea a Columbea. Klad Columbea dále na pevninskou ptačí skupinu – Columbimorphae a vodní ptačí skupinu – Phoenicopterimorphae, do které zařadili plameňáky a jako jejich sesterský klad potápky (Jarvis *et al.*, 2014).

Ve studii Prum *et al.* (2015) bylo pro fylogenetickou analýzu použito více než 390000 bází genomických sekvenčních dat pocházejících ze 198 druhů současně žijících ptáků. Tyto druhy pocházely z 122 ptačích čeledí, které spadají pod 40 ptačích řádů, z nichž bylo 14 čeledí pěvců a 108 čeledí ostatních ptáků. Fylogenetická analýza molekulárních a morfologických dat potvrdila, že klady Palaeognathae (běžci) a Galloanseres (hrabaví a vrubozobí) jsou monofyletické a že jejich sesterská

monofyletická skupina Neoaves se rozděluje na pět hlavních kladů – Strisores, Columbaves, Gruiformes, Aequorlornithes a Inopinaves. Nově vzniklý klad Aequorlornithes (viz obrázek 1) je souhrnný klad pro vodní ptáky, s výjimkou vrubozobých, kteří patří do kladu Galloanseres. Klad Aequorlornithes se dělí na 2 skupiny. V první skupině je podskupina Mirandornithes, kam patří plameňáci a potápky, sesterskou podskupinou Charadriiformes, dlouhokřídlých. Ve druhé skupině Ardeae je podskupiny Eurypygimorphae, kam patří slunatec, kagu a faenovití, sesterskou podskupinou Aequornithes, kam patří např. potáplice, tučňáci, pelikáni, trubkonosí a brodiví. Studie Prum *et al.* (2015) tedy vyvrací výsledky studie Jarvis *et al.* (2014), kde se klad Neoaves dělil na Columbea a Passerea.

Obrázek 1 - Klad Aequorlornithes podle Prum *et al.* (2015)



3.3 Plameňák karibský

Plameňák karibský (*P. ruber*) je největším plameňákem. Jeho výška bývá okolo 120–150 cm, ze které pouhé 2/5 tvoří tělo a zbytek nohy a krk (Cramp *et Simmons*, 1977). Hmotnost dospělých jedinců se pohybuje od 2,1 kg do 4,1 kg a jejich rozpětí křídel dosahuje 140–165 cm, přičemž jsou samice asi o 20 % menší než samci a mají kratší nohy (del Hoyo *et al.*, 1992).

Vyskytuje se v Karibiku a na Galapážských ostrovech (del Hoyo *et al.*, 1992). Zajímavá je genetická a morfologická odlišnost populace plameňáka karibského na Galapágách od populace vyskytující se v Karibiku. Byla prozkoumána mtDNA a mikrosatelitní lokusy obou populací. Populace na Galapágách se od populace v Karibiku lišila jednou nukleotidovou substitucí v polymorfní oblasti genu cytochromu b a také několika privátními alelami v mikrosatelitních lokusech v jaderné DNA. Z morfologického hlediska jsou jedinci pocházející z populace na Galapágách menší (především kvůli kratším nohám) a snášejí menší vejce (Frias-Soler *et al.*, 2014).

Potrava je variabilní a téměř stejná, jako u jiných druhů plameňáků. Skládá se z živočišné a rostlinné složky – např. korýši, měkkýši, kroužkovci, hmyz, semínka a výhonky trav, výjimečně malé ryby a krabi. Součástí potravy je také bláto pro získání mikroorganismů (del Hoyo *et al.*, 1992).

Hnízdo staví z hlíny, popř. z kamení. Má typický tvar komolého kuželu, nahore s prohloubeninou, kam kladou jedno, výjimečně dvě vejce (del Hoyo *et al.*, 1992). Inkubace trvá 27–31 dní. Pohlavně dospívají v 5 letech a nejstarší dochovaný jedinec v zajetí měl 44 let (Cramp *et Simmons*, 1977).

3.3.1 Taxonomické zařazení plameňáka karibského

Zařazení do systému (Myers *et al.*, 2016):

Říše:	živočichové (Animalia)
Kmen:	strunatci (Chordata)
Podkmen:	obratlovci (Vertebrata)
Třída:	ptáci (Aves)
Řád:	plameňáci (Phoenicopteriformes)
Čeleď:	plameňákovití (Phoenicopteridae)
Rod:	plameňák (<i>Phoenicopterus</i>)
Druh:	plameňák karibský (<i>Phoenicopterus ruber</i>)

3.4 Mikrosatelity

Mikrosatelity, také označované jako SSRs (Simple Sequence repeats) a nebo STRs (Short Tandem Repeats), jsou tandemově opakující se úseky DNA, které jsou dlouhé 1–6 bp (Goldstein *et al.*, 1999, Tóth *et al.*, 2000). Vyskytují v kódujících i nekódujících oblastech genomu všech prokaryotních i eukaryotních organismů (Tóth *et al.*, 2000). Hlavními vlastnostmi mikrosatelitů, vyskytujících se v kódující oblasti, je exprese genetické informace, včetně transkripce a translace, umlčování genů, alternativní sestřih a organizace chromatinu (Abdurakhmonov, 2016)

Charakteristickým znakem pro mikrosatelity je větší podíl polymorfismu a mutací než ve zbytku genomu, a proto mají důležitou roli nejen v evoluci genomu a genetické variabilitě, ale také jsou vhodnými molekulárními markery pro velké množství genetických studií (Tautz *et al.*, 1986, Oliveira *et al.*, 2006). Využívají se například pro studium populační genetiky, taxonomie, genetického toku a mapování a také pro určení paternity (Oliveira *et al.*, 2006), ale také pro určení genetických neurologických onemocnění, jako je Huntingtonova choroba nebo syndrom fragilního X, která jsou způsobena změnou počtu repetitivních jednotek v trinukleotidových repeticích (Tóth *et al.*, 2000). Hlavními výhodami použití mikrosatelitů, jako molekulárních markerů, je to, že jsou založeny na metodě PCR a pro amplifikaci stačí i malé množství DNA, také to že jsou v hojném počtu rozptýleny v genomu, že jsou kodominantní a multialelické a že jsou použitelné napříč příbuznými taxony (Abdurakhmonov, 2016).

Mikrosatelitní lokusy mohou být klasifikovány na základě repetitivního motivu na mono-, di-, tri-, tetranukleotidy (atd.) (Baker, 2000), anebo je lze rozdělit podle typu repetitivních jednotek do 4 skupin – dokonalé, nedokonalé, přerušené a složené mikrosatelity. Dokonalé mikrosatelity mají nepřerušenu jednotku repetice (např. TATATATATA), zatím co nedokonalé mikrosatelity obsahují v jednotce repetice inzerci nevhodícího se páru bází (např. TATATACTATA). Přerušené mikrosatelity jsou takové, kde v rámci repetitivní jednotky je vložena krátká nerepetitivní sekvence (např. TATATACGTGTTATA) a složené mikrosatelity představují spojení 2 rozdílných repetitivních jednotek (např. TATATATAGTGTGT) (Oliveira *et al.*, 2006).

Mezi SSRs také patří EST sekvence (Expressed sequence tags), které jsou velké 300–1000 bp. Jedná se o unikátní DNA sekvence, které jsou získány sekvenováním náhodných cDNA klonů z cDNA knihoven. Každá cDNA knihovna je vytvořena

z mRNA odvozené od specifické tkáně nebo buňky. cDNA knihovna tedy představuje geny exprimované původní buněčnou populací (Ju *et al.*, 2010, Jin *et al.*, 2016). EST sekvence se dají využít jako markery pro genovou identifikaci, genetické mapování a nebo pro analýzu populační genetiky, protože jsou použitelné napříč různými druhy (Ju *et al.*, 2010).

Mikrosatelity se sice používají pro velké množství studií z různých oblastí genetiky, ale dosud není úplně objasněna dynamika mutací těchto sekvencí. Co je ale jisté, že mutační rychlost mikrosatelitů je mnohem vyšší než ve zbytku genomu, a to v rámci 1 generace o 10^{-2} až 10^{-6} nukleotidů na lokus. Možné mechanismy, které způsobují velké množství mutací mikrosatelitů, mohou být chyba během rekombinace, nerovnoměrný crossing-over a nebo sklouznutí DNA polymerázy během replikace nebo reparace (Oliveira *et al.*, 2006).

3.4.1 Mikrosatelity z řádu tučňáci

Řád tučňáci (Sphenisciformes) zahrnuje 6 rodů, do kterých se řadí celkem 17 druhů, jejichž rozdělení je (Davis, 2017):

- **rod *Aptenodytes***
druhy: tučňák císařský (*A. forsteri*) a patagonský (*A. patagonicus*)
- **rod *Eudyptes***
druhy: tučňák skalní (*E. chrysocome*), žlutorohý (*E. chrysolophus*), novozélandský (*E. pachyrhynchus*), snárský (*E. robustus*), chocholatý (*E. sclateri*) a královský (*E. schlegeli*)
- **rod *Eudyptula***
druhy: tučňák nejmenší (*E. minor*)
- **rod *Megadyptes***
druhy: tučňák žlutooký (*M. antipodes*)
- **rod *Pygoscelis***
druhy: tučňák kroužkový (*P. adeliae*), uzdičkový (*P. antarctica*) a oslí (*P. papua*)
- **rod *Spheniscus***
druhy: tučňák brýlový (*S. demersus*), Humboldtův (*S. humboldti*), magellanský (*S. magellanicus*) a galapážský (*S. mendiculus*)

Dosud bylo celkem v 10 pracích popsáno objevení 113 polymorfních mikrosatelitních lokusů odvozených od 9 druhů tučňáků. Jednotlivé druhy tučňáků budu řešit v následujícím textu a kompletní seznam všech mikrosatelitních lokusů odvozených od těchto druhů tučňáků je popsán v kapitole 4 v tabulce 1.

3.4.1.1 Tučňák žltorohý

U tučňáka žltorohého (*Eudyptes chrysolophus*) bylo popsáno 25 mikrosatelitních lokusů (Ahmed *et al.*, 2009).

Pro výzkum mikrosatelitních lokusů Ahmed *et al.* (2009) použili krev dospělých jedinců tučňáka žltorohého z jedné kolonie pocházející z Ptačího ostrova v soustroví Jižní Georgii. Genomická DNA byla extrahována octanem amonným (Nicholls *et al.*, 2000). Pomocí izolace na magnetické částice byla sestavena DNA knihovna obohacená o následující mikrosatelitní repetitivní motivy: (GT)_n, (CT)_n, (GTAA)_n, (TTTC)_n, (GATA)_n (Glenn *et Schable*, 2005). Bylo vytvořeno 288 transformovaných bakteriálních kolonií, které byly obousměrně osekvenovány. Celkem 132 unikátních sekvencí obsahovalo mikrosatelitní motivy, z nichž bylo vybráno 32 sekvencí, pro které byly navrženy páry primerů softwarem PRIMER3 (Rozen *et Skaletsky*, 2000). Těchto 32 párů primerů bylo testováno na DNA 28 jedinců tučňáka žltorohého pomocí PCR amplifikace. Poté byly stanoveny velikosti alel u PCR produktů pomocí DNA sekvenátoru (ABI 3730) (Ahmed *et al.*, 2009).

Z 32 testovaných lokusů bylo 7 vyřazeno kvůli selhání PCR amplifikace a 25 zbylých bylo polymorfních u 28 jedinců tučňáka žltorohého. Z těchto polymorfních mikrosatelitních lokusů jeden (Ech020) vykazoval vazbu na Z-chromozom. S velkou pravděpodobností na tomto lokusu jsou přítomny i nulové alely. Odchylka od Hardy-Weinbergovy rovnováhy byla výrazná u 6 lokusů (Ech005, Ech012, Ech063, Ech091, Ech113 a Ech130). U některých pravděpodobně kvůli přítomnosti nulových alel, u jiných kvůli neoptimálním podmínkám během PCR.

Byla provedena *cross-species* PCR amplifikace všech 25 mikrosatelitních lokusů na dalších 4 druzích tučňáků – tučňáku patagonském (*Aptenodyptes patagonicus*), oslím (*Pygoscelis papua*), uzdičkovém (*P. antarctica*) a kroužkovém (*P. adeliae*). Byla použita DNA vždy 3 nepříbuzných jedinců od každého druhu tučňáka. Polymorfních bylo 17 lokusů alespoň u jednoho druhu a 8 bylo polymorfních alespoň u 3 druhů. Díky těmto

výsledkům byly mikrosatelity tučňáka žlutorohého shledány jako vhodné pro studium populací různých druhů tučňáků (Ahmed *et al.*, 2009).

3.4.1.2 Tučňák nejmenší

Ve dvou studiích bylo u tučňáka nejmenšího (*Eudyptula minor*) popsáno 28 mikrosatelitů (Billing *et al.*, 2007; Grosser *et Waters*, 2015).

Prvních 8 mikrosatelitů bylo objeveno při hledání polymorfních mikrosatelitních lokusů v populaci tučňáka nejmenšího (*Eudyptula minor*) pro studium paternity a populační struktury (Billing *et al.*, 2007). Genomická DNA byla izolována vysolovací metodou z krve nepříbuzných jedinců tučňáka nejmenšího pocházejících z jedné kolonie na Phillipově ostrově u Austrálie. Následně byly vytvořeny genomické DNA knihovny obohacené o (GA)_n a (GAAA)_n repetitivní motivy podle protokolu popsaného Gardner *et al.* (1999) s modifikací podle Adcock *et Mulder* (2002). Byla provedena digesce genomické DNA, fragmenty byly ligovány do oligonukleotidů a separovány dle velikosti pomocí elektroforézy v agarózovém gelu. Poté byly fragmenty o velikosti 400–900 bp purifikovány z gelu a hybridizovány na GA a GAAA biotinylované oligonukleotidy připojené na streptavidinem pokryté magnetické částice. Následovalo promývání, amplifikace pomocí PCR a klonování do pGEM vektoru (Promega). Po transformaci byly klony tříděny pomocí colony PCR s použitím pGEM specifických primerů a primerů pro detekci mikrosatelitů (repetice G(AG)₁₃ nebo (TTTC)₇). Nakonec byly pozitivní klony amplifikovány a PCR produkty byly dále purifikovány pomocí purifikačního kitu.

Z genomické DNA knihovny, obohacené o GA repetice, bylo vybráno 192 klonů, z nichž 18 klonů obsahovalo GA repetice. Tyto klony byly osekvenovány a pro 9 z nich byly navrženy páry primerů, protože obsahovaly 7 a více repetitivních jednotek GA. Následně bylo z genomické DNA knihovny, obohacené o GAAA repetice, vybráno 179 klonů, z nichž 10 klonů obsahovalo GAAA repetice, avšak pouze pro 1 z nich byl navržen pár primerů, protože obsahoval dostatečně velký počet repetitivních jednotek GAAA (Billing *et al.*, 2007).

Vždy jeden primer z páru byl značen M13 sekvencí a dále byla provedena PCR amplifikace těchto párů primerů pro detekci polymorfismu u nejméně 35 nepříbuzných jedinců pocházejících ze 2 různých populací tučňáka nejmenšího. Osm mikrosatelitních lokusů vykazovalo polymorfismus. Jeden z nich (Emm4) vykazoval polymorfismus pouze v jedné populaci tučňáka nejmenšího. Z tohoto důvodu ho autoři označili jako

nevhodný pro analýzu paternity, ale využitelný pro studium populačních charakteristik. Zbýlých 7 mikrosatelitů bylo polymorfních v obou populacích. Dva mikrosatelity (Emm2 a Emm8) vykazovaly odchylku od Hardy-Weinbergovy rovnováhy a také pravděpodobnost přítomnosti nulových alel. Zbýlé mikrosatelity byly v Hardy-Weinbergově rovnováze.

Navíc Billing *et al.* (2007) použili mikrosatelit B3-2, odvozený od tučňáka brýlového (podrobnosti viz kapitola 3.4.1.6), pro *cross-species* PCR amplifikaci u tučňáka nejmenšího. Tento lokus měl 8 alel u 47 jedinců.

Dalších 20 mikrosatelitů, vyskytujících se u tučňáka nejmenšího, objevili a popsali Grosser *et Waters* (2015).

Byla odebrána krev jedincům žijícím v koloniích na Novém Zélandu a v Austrálii. Genomická DNA byla izolována fenol-chloroformovou metodou a osekvenována pomocí shotgun sekvenování. Pomocí softwaru MSATCOMMANDER v1.0.8. (Faircloth, 2008) bylo vybráno 711 mikrosatelitních lokusů obsahujících minimálně 5 repetitivních jednotek di-, tri- a tetranukleotidových sekvencí a pro 346 z nich byly navrženy páry primerů. Z těchto bylo vybráno 30 lokusů pro PCR amplifikaci. F primery byly značeny M13 sekvencí a se všemi páry primerů byla provedena PCR amplifikace. Pouze 20 párů primerů amplifikovalo produkt nebo bylo polymorfních, proto byly dále použity pro vytvoření 7 multiplexových PCR mixů a byla provedena PCR amplifikace s DNA.

PCR produkty byly separovány pomocí ABI 3730xl DNA analyzátoru (Thermo Fisher Scientific) a genotypovány pomocí GeneMapper v4.1 (Applied Biosystems). Dále byly mikrosatelitní lokusy testovány na odchylku od Hardy-Weinbergovy rovnováhy. Lokus Em15 vykazoval odchylku od Hardy-Weinbergovy rovnováhy pouze u populací žijících na Novém Zélandu, proto je tento lokus doporučený pouze pro populační studie australských populací tučňáka nejmenšího. Také lokusy Em2, Em6 a Em28 vykazovaly odchylku od Hardy-Weinbergovy rovnováhy, ale každý jen v jedné populaci. Toto mohlo být zapříčiněno i přítomností nulových alel. Autoři článku označují všech 20 objevených mikrosatelitních lokusů za velmi přínosné pro následující výzkum rodu *Eudiptula* (Grosser *et Waters*, 2015).

3.4.1.3 Tučňák žlutooký

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

Byly sestaveny 2 obohacené genomické DNA knihovny, od tučňáka žlutookého, dle protokolu popsaného Perrin *et Roy* (2000). Genomická DNA byla izolována pomocí DNeasy Kit (Qiagen) a štěpena pomocí restrikčního enzymu *MboI* (Promega). DNA fragmenty byly ligovány do pUC19 klonovacího vektoru. Poté byly DNA inzerty amplifikovány za použití M13 primerů a následně byly připojeny na biotinylované próby s repeticemi (GT)₁₂ a (GA)₁₂. Produkty obsahující repeticemi byly izolovány pomocí magnetických částic pokrytých streptavidinem. Následně takto izolované produkty byly opět štěpeny restrikční endonukleázou *MboI*, ligovány do klonovacího vektoru pUC19 a transformovány do kompetentních buněk One Shot Top 10 (Invitrogen). Celkem 2976 bakteriálních klonů bylo přeneseno na nylonovou membránu a značeno pomocí [³²P]ATP. Následně bylo vybráno 159 klonů, amplifikováno, a sekvenováno (Boessenkool *et al.*, 2008).

Jelikož bylo detekováno málo klonů, které by obsahovaly 8 a více repetitivních jednotek, byla sestavena 3. genomická knihovna dle protokolu Glenn *et Schable* (2005). Genomická DNA byla štěpena restrikční endonukleázou *RsaI* a ligována se SuperSNX linkery. Tyto fragmenty byly připojeny na biotinylované próby s repeticemi (GA)₁₂, (GT)₁₂, (AAC)₆, (AAG)₈, (ACT)₁₂ a (ATC)₈. Fragmenty obsahující repeticemi byly zachyceny na magnetické částice pokryté streptavidinem. Následně byla provedena PCR amplifikace těchto fragmentů a PCR produkty byly ligovány do plazmidu a transformovány do One Shot Top 10 kompetentních buněk. Celkem 1920 bakteriálních klonů bylo přeneseno na nylonovou membránu a značeno [³²P]ATP značenými próbami s repeticemi (GA)₁₂ a (GT)₁₂ a nebo s repeticemi (AAC)₆, (AAG)₈, (ACT)₁₂ a (ATC)₈. Následně bylo vybráno 97 klonů, které obsahovaly dané repeticemi, a tyto klony byly amplifikovány a sekvenovány (Boessenkool *et al.*, 2008).

Pro sekvence z prvních dvou knihoven bylo navrženo 38 párů primerů a pro sekvence ze třetí knihovny bylo navrženo 20 párů primerů. PCR amplifikace těchto párů primerů byla testována na DNA 12 jedinců tučňáka žlutookého. Bylo nalezeno 12 polymorfních lokusů. Tyto lokusy byly testovány na odchylku od Hardy-Weinbergovy rovnováhy a pouze jeden lokus (Man47) vykazoval výraznou odchylku (Boessenkool *et al.*, 2008).

3.4.1.4 Tučňák kroužkový

U tučňáka kroužkového (*Pygoscelis adeliae*) bylo popsáno 6 mikrosatelitních lokusů (Roeder *et al.*, 2001)

Krevní vzorky byly odebrány 442 dospělým jedincům ze 13 různých kolonií. Genomická DNA byla extrahována buď fenol-chloroformovou metodou anebo kitem Progenome II (Progen Industries). Následně byly vzorky rozsuspendovány v destilované vodě anebo v TE pufru a uchovány ve 4 nebo -20 °C.

Byly sestaveny dvě genomické DNA knihovny. Pro první knihovnu byly použity DNA fragmenty velké 250–900 bp. Tyto fragmenty byly ligovány do plazmidu pUC18 a transformovány do DH5 α kompetentních buněk, které se nechaly růst na Luria-Bertani agarovém médiu obsahujícím ampicilin. Narostlé kolonie byly přeneseny na nylonovou membránu. Následně byly jejich DNA fragmenty hybridizovány s [³²P]dCTP značenými próbami, které obsahovaly repetice (AC)_n(GT)_n. Poté byla provedena detekce kolonií obsahujících dané repetice a tyto kolonie se nechaly dále přes noc růst na médiu s ampicilinem. Po inkubaci byly plazmidy purifikovány, DNA fragmenty osekvenovány a separovány v polyakrylamidovém gelu. Nakonec byly navrhnuty primery pomocí softwaru PRIMER3 (Rozen *et Skaletsky*, 2000). Pro sestavení druhé knihovny byly použity DNA fragmenty velké 300–600 bp. Tyto fragmenty byly ligovány na SAULA linkery, byla provedena PCR se SAULA primery a poté byly PCR produkty denaturovány a inkubovány přes noc na nylonových membránách obsahujících (AC)_n(GT)_n repetice. Následně byly hybridizované fragmenty znovu amplifikovány na SAULA linkery pro znásobení počtu fragmentů obsahujících požadované repetice. Poté byly fragmenty ligovány do plazmidu pUC18, transformovány do MAX Efficiency buněk (Gibco BRL) a inkubovány přes noc na agarovém médiu obsahujícím ampicilin. Následně byly buněčné kolonie přeneseny a opět přes noc inkubovány na nylonových membránách s radioaktivně značenými próbami s CA repeticemi. Kolonie obsahující tyto repetice byly purifikovány, DNA fragmenty byly osekvenovány a byly pro ně navrhnuty primery. Celkově bylo izolováno 6 polymorfních mikrosatelitních lokusů (Roeder *et al.*, 2001).

Pro genotypování jedinců tučňáka kroužkového Roeder *et al.* (2001) ve svém výzkumu použili 6 výše zmíněných izolovaných mikrosatelitů, plus jeden navíc – HrU2, pocházející z vlaštovky (*Hirundo rustica*) (Ellegren, 1992; Primmer *et al.*, 1996). Lokus HrU2 byl použit pro genotypování jedinců z východních populací tučňáka kroužkového, jeden ze 6 izolovaných mikrosatelitů (TP500) (Roeder *et al.*, 2001) byl použit pro

genotypování jedinců ze západní populace a zbývajících 5 izolovaných mikrosatelitů u tučňáka kroužkového bylo použito pro genotypování všech 442 jedinců z celkem 13 kolonií. Byla provedena PCR a následně elektroforéza v polyakrylamidovém gelu. Velikosti alel byly stanoveny dle velikostního standardu. Nakonec bylo 5 izolovaných mikrosatelitů, které byly použity pro genotypování všech jedinců, testováno na odchylku od Hardy-Weinbergovy rovnováhy. Ze 13 kolonií byla u 9 z nich prokazatelná odchylka od Hardy-Weinbergovy rovnováhy (Roeder *et al.*, 2001).

3.4.1.5 Tučňák uzdičkový

Kang *et al.* (2015) objevili a popsali 16 mikrosatelitních lokusů u tučňáka uzdičkového (*Pygoscelis antarctica*).

Genomická DNA byla izolována z krve 7 jedinců tučňáka uzdičkového pomocí DNeasy blood and tissue kitu (Quiagen). Následně byla provedena izolace mikrosatelitních oblastí za pomoci softwaru QDD3 (Megléc *et al.*, 2014). Bylo vybráno 30 oblastí pro následné testování. Variabilita lokusů byla testována genotypizací 23 jedinců tučňáka uzdičkového pocházejících ze stejné oblasti. Byly navrženy primery pro dané lokusy pomocí softwaru PRIMER3 (Rozen *et Skaletsky*, 2000). F primery byly na svém 5' konci značeny M13 sekvencí. Následně byla provedena multiplex PCR amplifikace a poté byly PCR produkty genotypovány (Kang *et al.*, 2015).

Z celkem 30 navržených primerů bylo úspěšně naamplifikováno 29 mikrosatelitních lokusů, z nichž 16 bylo polymorfních. Mikrosatelitní lokusy byly dále testovány na odchylku od Hardy-Weinbergovy rovnováhy a pouze 2 lokusy (Pygantarc11 a Pygantarc18) vykazovaly velkou odchylku, ostatní lokusy byly v rovnováze. Nakonec byla provedena *cross-species* PCR amplifikace na 3 dalších druzích tučňáků – tučňákovi oslím (*Pygoscelis papua*), kroužkovém (*P. adeliae*) a žlutorohém (*Eudyptes chrysolophus*). Nicméně autoři uvádějí pouze úspěšnost PCR amplifikace, jestli získali či nezískali produkt, ale nezmiňují se o případném polymorfismu. Jen mikrosatelit Pygantarc27 se neamplifikoval ani u jednoho ze tří jiných druhů tučňáků, ostatní mikrosatelity se amplifikovaly alespoň u 2 ze 3 druhů (Kang *et al.*, 2015).

3.4.1.6 Tučňák brýlový

U tučňáka brýlového (*Spheniscus demersus*) bylo ve 2 studiích objeveno a popsáno celkem 9 mikrosatelitních lokusů (Akst *et al.*, 2002; Labuschagne *et al.*, 2013).

První mikrosatelitní lokus B3-2, odvozený od tučňáka brýlového, popsal Akst *et al.* (2002) při studiu tučňáka galapážského (*Spheniscus mendiculus*) a magellanského (*S. magellanicus*). Tento mikrosatelitní lokus byl testován pouze u 46 jedinců tučňáka galapážského, kde byl tento lokus monomorfní a u 46 jedinců tučňáka magellanského, kde byl polymorfní a měl 8 alel. Další podrobnosti jsou uvedeny v kapitole 3.4.1.8.

Labuschagne *et al.* (2013) izolovali a popsali dalších 8 mikrosatelitních lokusů u tučňáka brýlového.

Krev byla odebrána 25 jedincům tučňáka brýlového, pocházejícím z jedné kolonie. Genomická DNA byla izolována pomocí DNeasy blood and tissue kitu (Quiagen). Byla sestavena DNA knihovna obohacená o mikrosatelitové sekvence. Následně byla tato DNA knihovna osekvenována přístrojem Roche 454 GS-FLX a pomocí programu MSATCOMMANDER v. 0.8.1 (Faircloth, 2008) byly hledány mikrosatelitní motivy (2–6 bp) s osmi a více repeticemi. Bylo nalezeno 12 mikrosatelitních lokusů, pro které byly navrženy primery pomocí softwaru PRIMER3 (Rozen *et Skaletsky*, 2000).

Byla provedena multiplex PCR amplifikace všech 12 lokusů. Následně byly PCR produkty genotypovány pomocí softwaru GeneMapper v. 4.0 (Applied Biosystems) a následně testovány na odchylku od Hardy-Weinbergovy rovnováhy. Z 12 testovaných mikrosatelitních lokusů bylo 8 polymorfních a žádný z nich nevykazoval odchylku od Hardy-Weinbergovy rovnováhy (Labuschagne *et al.*, 2013).

3.4.1.7 Tučňák Humboldtův

Ve 3 studiích bylo u tučňáka Humboldtova (*Spheniscus humboldti*) objeveno celkem 13 mikrosatelitních lokusů (Akst *et al.*, 2002; Schlosser *et al.*, 2003; Schlosser *et al.*, 2009).

První mikrosatelitní lokus H2-6, vyskytující se u tučňáka Humboldtova, objevili (Akst *et al.*, 2002) při studiu tučňáka galapážského (*Spheniscus mendiculus*) a magellanského (*S. magellanicus*). Tento mikrosatelitní lokus byl testován pouze u 46 jedinců tučňáka galapážského, kde byl polymorfní a měl 3 alely a u 46 jedinců tučňáka magellanského byl také polymorfní a měl 6 alel. Další podrobnosti jsou uvedeny v kapitole 3.4.1.8.

Dalších 7 mikrosatelitních lokusů objevili Schlosser *et al.* (2003) při studiu genetického toku a struktury populace tučňáka Humboldtova ve 4 koloniích.

Genomická DNA byla izolována podle protokolu Sambrook *et al.* (1989) z krve 24 jedinců tučňáka Humboldtova, kteří pocházeli ze 4 volně žijících kolonií, a štěpena restriktivním enzymem *Tsp5091* (New England Biolabs). Fragmenty dlouhé 500–1000 bp byly izolovány, ligovány do TSPADSHORT/TSPADLONG linkerů (Tenzer *et al.*, 1999) a následně byly amplifikovány pomocí PCR. Poté byly PCR fragmenty hybridizovány na biotinylované próby s repeticemi CA a produkty s danými repeticemi byly zachyceny na částice pokryté streptavidinem. Byla provedena druhá PCR. Následně byly tyto PCR produkty klonovány a umístěny na selektivní agarové médium (X-gal). Bílé kolonie byly metodou dot-blot přeneseny na nylonovou membránu a tříděny podle obsahu repetitivních jednotek CA. Sekvence, které obsahovaly tyto repetice, byly osekvenovány a pomocí softwaru PRIMER3 (Rozen *et Skaletsky*, 2000) byly pro lokusy navrženy primery (Schlosser *et al.*, 2003).

Byla provedena PCR amplifikace mikrosatelitních lokusů u 24 jedinců tučňáka Humboldtova pocházejících z 4 přirozeně se vyskytujících kolonií. Sedm mikrosatelitních lokusů vykazovalo polymorfismus. Dál byly tyto mikrosatelity testovány na odchylku od Hardy-Weinbergovy rovnováhy. Všechny lokusy byly v rovnováze, kromě 1 lokusu (Sh2Ca22), který vykazoval velmi malou heterozygotnost.

Tyto primery byly dále testovány pro *cross-species* PCR amplifikaci u 8 dalších druhů tučňáků – u tučňáka magellanského (*Spheniscus magellanicus*), brýlového (*S. demersus*), oslího (*Pygoscelis papua*), uzdičkového (*P. antarctica*), skalního (*Eudyptes chrysocome*), žltorohého (*E. chrysolophus*), patagonského (*Aptenodytes patagonicus*) a nejmenšího (*Eudyptula minor*). U druhů tučňák magellanský, brýlový, oslí, skalní a nejmenší vykazovalo všech 7 mikrosatelitů, odvozených od tučňáka Humboldtova, polymorfismus. U tučňáka žltorohého a patagonského vykazovalo polymorfismus 5 ze 7 mikrosatelitů a u tučňáka uzdičkového byl polymorfni pouze 1 mikrosatelit (Sh2Ca22) (Schlosser *et al.*, 2003).

Dalších 5 mikrosatelitních lokusů, pocházejících od tučňáka Humboldtova, popsali Schlosser *et al.* (2009).

Krev byla odebrána jedincům tučňáka Humboldtova z celkem 22 různých kolonií a byla izolována dle Sambrook *et al.* (1989). Páry primerů mikrosatelitních lokusů byly

navrhnuty stejně, jako bylo popsáno ve článku Schlosser *et al.* (2003). Bylo vybráno 28 potenciálních párů primerů, z nichž 12 lokusů vykazovalo dinukleotidové repeticity (7 z nich bylo již popsáno Schlosser *et al.*, 2003). Následně byla provedena PCR amplifikace a genotypizace PCR produktů.

Bylo objeveno 5 nových polymorfních mikrosatelitních lokusů vyskytujících se u tučňáka Humboldtova. Lokusy byly testovány na přítomnost nulových alel. U 3 lokusů (Sh1Ca12, Sh2Ca22 a Sh2Ca55) byla prokázána přítomnost nulových alel v kombinaci samec/potomci (Schlosser *et al.*, 2009).

3.4.1.8 Tučňák galapážský a tučňák magellanský

Akst *et al.* (2002) objevili a popsali celkem 6 mikrosatelitních lokusů, odvozených od 4 druhů tučňáků z rodu *Spheniscus*. Lokus B3-2 pocházel od tučňáka brýlového (*S. demersus*), lokusy G2-2, G3-6 a G3-11 od galapážského (*S. mendiculus*), lokus H2-6 od Humboldtova (*S. humboldti*) a lokus M1-11 od magellanského (*S. magellanicus*).

Pro každý ze čtyř druhů tučňáků z rodu *Spheniscus* byly pro mikrosatelitové lokusy navrženy páry primerů dle protokolu (Armour *et al.*, 1994; Hamilton *et al.*, 1999). Bylo optimalizováno celkem 6 lokusů, které obsahovaly dinukleotidové repeticity, z nichž 5 lokusů vykazovalo polymorfismus alespoň u 1 z druhů. Byla provedena PCR amplifikace těchto párů primerů s fluorescenčně značenými F primery, anebo jako alternativa byly do reakce přidány fluorescenčně značené dNTPs. Následně byly PCR produkty purifikovány na Sephadex koloně (Amersham) a vysušeny. Takto připravené produkty byly sekvenovány na automatickém DNA sekvenátoru ABI 377 s velikostním standardem značeným ROX (Applied Biosystems). Tyto lokusy byly testovány pouze u 46 jedinců tučňáka galapážského a u 46 jedinců tučňáka magellanského. Jejich DNA byla izolována pomocí DNeasy tissue kitu (Quiagen) (Akst *et al.*, 2002).

U tučňáka galapážského z 5 testovaných mikrosatelitních lokusů byly 3 lokusy polymorfní, z nichž jeden lokus (G3-6) vykazoval odchylku od Hardy-Weinbergovy rovnováhy, která byla způsobena 1 monomorfním jedincem, díky vzácné alele. Z těchto polymorfních mikrosatelitů byly 2 mikrosatelity odvozeny od tučňáka galapážského a 1 mikrosatelit od tučňáka Humboldtova.

U tučňáka magellanského z 5 testovaných mikrosatelitních lokusů byly 4 lokusy polymorfní a stejně jako u tučňáka galapážského lokus G3-6 jako jediný vykazoval odchylku od Hardy-Weinbergovy rovnováhy. Z těchto polymorfních mikrosatelitů byl 1

mikrosatelit odvozen od tučňáka brýlového, 2 mikrosatelity od tučňáka galapážského a 1 mikrosatelit od tučňáka Humboldtova. Mikrosatelit, který byl odvozen od tučňáka magellanského, byl u všech testovaných jedinců monomorfni (Akst *et al.*, 2002).

3.4.2 Univerzální ptačí mikrosatelity

Tým doktorky Deborah A. Dawson z Univerzity v Sheffieldu vyvinul 2 sady univerzálních ptačích mikrosatelitů. Jedna byla založená na mikrosatelitech vyskytujících se v EST sekvencích a druhá na mikrosatelitech vyskytujících se v celém genomu. Tyto mikrosatelity mají využití pro široké spektrum genetických studií, jako je např. studium patenity, analýza populací a *cross-species* analýza napříč velkou škálou druhů ptáků.

3.4.2.1 EST mikrosatelity

Dawson *et al.* (2010) vyvinuli nový postup vytvoření párů primerů pro konzervované ptačí mikrosatelity, které jsou polymorfni napříč velkou škálou druhů ptáků. EST sekvence byly vybrány z cDNA knihovny, která vznikla reverzní transkripcí mRNA. Bylo popsáno celkem 35 ptačích EST (Expressed Sequence Tag) mikrosatelitů, které měly vysokou homologii mezi sekvencemi vyskytujícími se u zebřičky pestré (*Taeniopygia guttata*) a u kura domácího (*Gallus gallus*) se 3–15 repetitivními jednotkami (na rozdíl od Dawson *et al.* (2013), kde použili výhradně sekvence s počtem repetitivních jednotek ≥ 8). Pro tyto mikrosatelity bylo navrženo celkem 36 párů primerů. Z 35 mikrosatelitů testovaných u zebřičky pestré a kura domácího bylo polymorfni 34 mikrosatelitů. Dále bylo těchto 35 ptačích EST mikrosatelitů testováno pomocí *cross-species* PCR amplifikace u dalších druhů ptáků, kdy u pěvců bylo nalezeno 33 z nich polymorfni.

Bylo identifikováno celkem 687 mikrosatelitů v EST sekvencích, vyskytujících se u zebřičky pestré. Následně byly tyto sekvence přiřazeny k homologním sekvencím vyskytujícím se u kura domácího a pomocí nástroje BLAST bylo vybráno 135 nejpodobnějších sekvencí. Tyto homologní sekvence byly dále zpracovány pomocí softwaru MEGA3 (Kumar *et al.*, 2004) a softwaru PRIMER3 (Rozen *et Skaletsky*, 2000). Bylo vybráno 35 konzervovaných mikrosatelitů, pro které bylo vytvořeno 36 párů primerů (pro lokus TG08-024 byly vytvořeny 2 páry primerů). Z nich bylo 34 párů primerů navrženo tak, aby byly 100% homologní u kura domácího a u zebřičky pestré, a zbylé 2 páry primerů obsahovaly v 5' primerech 1 degenerovanou bázi. Písmena v názvech primerů byla odvozena od názvu původních druhů (TG – *Taeniopygia guttata*

a *Gallus gallus*) a čísla v názvech byla odvozena od polohy lokusu v genomu kura domácího. Dvojcísli značí chromozom, na kterém je lokus lokalizován, a trojcísli značí polohu na chromozomu (v megabázích). Všechny F primery byly značeny HEX nebo 6-FAM fluorescenčními barvami. Následně byly provedeny multiplex PCR.

Z 35 testovaných EST mikrosatelitů, pro které bylo navrženo 36 párů primerů, bylo 34 mikrosatelitů polymorfních (tedy bylo amplifikováno 35 párů primerů) u jedinců zebřičky pestré a kura domácího. Jediný lokus TG01-086 neměl žádný produkt (Dawson *et al.*, 2010).

Vytvořené páry primerů byly použity pro genotypování jedinců 52 různých druhů ptáků patřících do 15 různých řádů (klasifikace dle Simbley *et Monroe* (1990)). Pomocí 34 konzervovaných ptačích EST mikrosatelitů byl genotypován vždy 1 jedinec z každého z 21 druhů ptáků (8 druhů pěvců a 13 ostatních druhů). Poté genotypovali vždy 4 jedince z každého z 22 druhů (17 pěvců a 5 ostatních druhů ptáků), kde v rámci těchto druhů byly zařazeny na přetestování 4 druhy z předešlých 21 testovaných druhů. Následně byly udělány testy na 13 doplňkových druzích dlouhokřídlých, kde byla provedena amplifikace 9 mikrosatelity. Genomická DNA jedinců byla extrahována octanem amonným (Nicholls *et al.*, 2000) nebo pomocí Chelex-100 (Ceo *et al.*, 1993).

Při testování vždy 1 jedince z 21 druhů ptáků poskytlo 70 % testovaných mikrosatelitů produkt u každého druhu pěvců a průměrně 67 % testovaných mikrosatelitů u ostatních druhů. Při testování vždy minimálně 4 jedinců z 22 druhů ptáků poskytlo u druhů pěvců produkt 100 % testovaných mikrosatelitů, z nichž bylo 48 % polymorfních a u ostatních druhů ptáků poskytlo produkt 99 % testovaných mikrosatelitů, z nichž bylo polymorfních 21 %. Bylo objeveno 33 polymorfních lokusů z 35 testovaných. Lokus TG01-086 se neamplifikoval u žádného jedince a lokus TG09-014 byl monomorfní u všech testovaných druhů ptáků. U pěvců klesal polymorfismus s rostoucí genetickou vzdáleností testovaného druhu od zebřičky pestré. Většina lokusů byla polymorfní u 8 a více druhů. U 17 testovaných druhů pěvců mělo minimálně 50 % druhů polymorfních 17 lokusů a nejúčinnější lokusy byly TG01-040, TG02-088, TG04-012, TG11-011 a TG12-015, které byly polymorfní u 13–16 druhů z 17 testovaných druhů pěvců. Tyto nově popsané mikrosatelity jsou velmi užitečné pro velkou škálu aplikací, jako je studium paternity a populací. Také velmi usnadnily porovnání ptačího genomu, jako je např. mapování genomu, a poskytly možnost porovnání genetické variability mezi druhy (Dawson *et al.*, 2010).

3.4.2.2 Konzervované ptačí mikrosatelity

Dawson *et al.* (2013) vyvinuli nové páry primerů pro ptačí mikrosatelity, které mají vyšší užití pro *cross-species* studie. Bylo nalezeno 24 konzervovaných ptačích mikrosatelitů, označených jako CAM (conserved avian microsatellite), které byly izolovány od zebřičky pestré (*Taeniopygia guttata*) a kura domácího (*Gallus gallus*).

Pro nalezení konzervovaných ptačích mikrosatelitů bylo třeba srovnat homologní úseky dvou geneticky vzdálených druhů ptáků. Byl využit postup, jaký použili Dawson *et al.* (2010), a byly hledány vysoce homologní sekvence vyskytující se u zebřičky pestré a kura domácího. Konzervované mikrosatelitní lokusy byly hledány v celém genomu a podmínka byla, že lokus musí obsahovat minimálně 8 repetitivních jednotek. U mikrosatelitů s větším počtem repetitivních jednotek je vyšší pravděpodobnost mutací a tím pádem pravděpodobnost vyšší variability. Byly nalezeny konzervované mikrosatelity u zebřičky pestré, poté byly přiřazeny k homologním sekvencím pocházejícím z kura domácího a následně pomocí nástroje BLAST byly vybrány nejvíce homologní oblasti. Následně byly tyto homologní sekvence zarovnané pomocí softwaru MEGA3 (Kumar *et al.*, 2004) a nekomplementární báze nebo mezery byly nahrazeny písmenem „n“. Bylo nalezeno 48 vysoce homologních sekvencí a pro 24 z nich byly pomocí softwaru PRIMER3 (Rozen *et Skaletsky*, 2000) navrženy páry primerů. Na rozdíl od studie (Dawson *et al.*, 2010) nebyly navrženy primery pouze pro 100% homologní sekvence, ale homologie sekvencí mohla dosahovat jen 86 %. Pouze 6 sekvencí bylo 100% homologních se sekvencemi kura domácího. Následně byla provedena PCR amplifikace těchto párů primerů s F primerem značeným HEX nebo 6-FAM fluorescenční barvou.

Všech 24 testovaných ptačích mikrosatelitů bylo amplifikováno u zebřičky pestré a kura domácího.

Těchto 24 párů primerů bylo použito pro *cross-species* PCR amplifikaci vždy 4 jedinců z každého z 8 druhů pěvců a vždy 1 jedince ze 4 ostatních druhů ptáků. Genomická DNA byla izolována z krve jedinců octanem amonným (Nicholls *et al.*, 2000) a nebo vysolovací metodou (Bruford *et al.*, 1998). Byla provedena PCR a poté byly PCR produkty separovány pomocí DNA analyzátoru. Každý druh byl hodnocen samostatně. Následně bylo porovnání zastoupení polymorfních CAM a TG lokusů (Dawson *et al.*, 2010) u pěvců a ostatních druhů ptáků.

Ze 24 testovaných CAM mikrosatelitů poskytlo produkt v průměru 94 % mikrosatelitů u pěvců, z nichž bylo polymorfní 68 %. U ostatních druhů ptáků poskytlo produkt průměrně 95 % mikrosatelitů, z nichž bylo 42 % polymorfní. Oproti dříve popsaným TG lokusům (Dawson *et al.*, 2010) bylo v této studii větší procento naamplifikovaných lokusů polymorfních. U pěvců bylo testováno na 8 druzích 24 lokusů, z nichž bylo 19 lokusů polymorfních alespoň u 50 % druhů. Nejúčinnějšími lokusy u pěvců byly CAM-13 a CAM-19, které byly polymorfní u všech 8 testovaných druhů a nejméně účinný byl lokus CAM-22, který se amplifikoval pouze u 3 druhů.

Z 24 objevených konzervovaných ptačích mikrosatelitů (CAM) bylo 17 homologních s EST sekvencemi popsanými Dawson *et al.* (2010). CAM lokusy homologní s EST sekvencemi jsou mnohem více polymorfní, napříč škálou druhů ptáků a CAM lokusy, které nejsou homologní s EST sekvencemi, jsou více variabilní.

4 Materiál a metody

4.1 Biologický materiál

Biologický materiál (krev) pro analytickou část této bakalářské práce, pocházející ze šesti nepříbuzným jedincům plameňáka karibského (*Phoenicopterus ruber*), byl odebrán a poskytnut pracovníky Zoologické zahrady Dvůr Králové. Z krve byla izolována genomická DNA fenol-chloroformovou metodou, kterou provedl vedoucí bakalářské práce. Izolovaná DNA byla rozpuštěna v TE pufru a její koncentrace byla 10–50 µg/ml.

4.2 Chemikálie

- Akrylamid (Sigma)
- *aTaq* DNA polymeráza (5 U/µl), M1241 (Promega)
- Bromfenolová modř (Serva)
- Deionizovaná voda
- dNTPs (100 mmol/l, 400 µl od každého), U1240 (Promega)
- Dusičnan stříbrný (Sigma)
- Ethanol 96% roztok (Lihovar Vrbátky)
- Ethylendiaminotetraoctan sodný – Na₂EDTA (Lachner)
- Formaldehyd (Lachema)
- Formamid (Lachema)
- Hydroxid sodný (Lachner)
- Chlorid sodný (Lachema)
- Kyselina boritá (Lachner)
- Kyselina dusičná 65% roztok (Lachner)
- Kyselina octová (Lachner)
- Močovina (Lachner)
- N, N'-methylenbisakrylamid (Serva)
- N, N, N',N'-tetramethylethylendiamin – TEMED (Serva)
- Peroxodisíran amonný (Serva)
- Rain-off – tekuté stěrače (Sheran)
- Thiosíran sodný (Lachema)

- Trishydroxymethylaminomethan – Tris (AppliChem)
- Uhličitan sodný (Lachner)
- Xylenová modř – Xylenecyanol FF (AppliChem)
- 3-methakryloxypropyltrimethoxysilan (Serva)

4.3 Roztoky

Molekulární lepidlo

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

TBE pufr, 10x zásobní roztok

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

Akrylamid, 6% zásobní roztok

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

Peroxodisíran amonný, 10% roztok

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

Polyakrylamidový gel, 6% roztok

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

Nanášecí roztok

- 0,125 g xylenové modře
- 0,125 g bromfenolové modře

- 100 ml formamidu
- 25 ml deionizované vody

Fix/stop roztok

- 800 ml deionizované vody
- 88 ml ledové kyseliny octové

Kyselina dusičná, 1% roztok

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

Dusičnan stříbrný, 0,1% roztok

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

Vývojka

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

Hydroxid sodný, 1mol/l roztok

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

4.4 Laboratorní přístroje

- Elektroforetický zdroj EV232 (Consort)
- Hybridizační pec HB-2D (Techne)
- Chladnička kombinovaná (Whirlpool)
- Laboratorní váhy Mark S622 (BEL Engineering)
- Magnetická míchačka MR Hei-Combi (Heidolph)
- Mikropipety Finnpiette 0,5–10 µl (osmikanálová), 0,3 µl–1 ml (ThermoLabsystem)
- Mikropipety Nichipet EX 0,5 µl–1 ml (Nichiryo)
- Minicentrifuga CLE CSQSP (Cleaver Scientific)
- Minicentrifuga Prism mini (Labnet International)

- Negatoskop NEGA1 (Maneko)
- Sekvenační elektroforetická komůrka S2 (Whatman Biometra)
- Sušárna CAT 8050 (Contherm)
- Termocykler GenePro (BIOER Technology)
- Termocykler PTC 100-96 VHB (MJ Research)
- Třepačka Orbit 1 900 (Labnet International)
- Vortex mixer (Labnet International)
- Vortex MS2 (Ika)
- Výrobník deionizované a ultračisté vody typ 01 (AquaOsmotic)
- Výrobník ledu Icematic F100 Compact (Castel Mac)

4.5 PCR amplifikace

Byla provedena *cross-species* PCR amplifikaci genomické DNA 6 nepříbuzných jedinců plameňáka karibského pomocí 171 párů primerů pro amplifikaci mikrosatelitů. Z celkového počtu 171 testovaných párů primerů je 113 párů primerů známých pro mikrosatelitní lokusy z řádu tučňáci (viz tabulka 1), 34 párů primerů pro EST mikrosatelitní lokusy (ale objeveno jich bylo 36, ze kterých 2 nebyly v laboratoři k dispozici během mé bakalářské práce) a zbylých 24 párů primerů pro konzervované ptačí mikrosatelitní lokusy (viz tabulka 2).

Tabulka 1 - Přehled mikrosatelitních lokusů pocházejících od zástupců řádu tučňáci, které byly testovány na polymorfismus u plameňáka karibského. Je uveden zdrojový druh, název mikrosatelitního lokusu a literární zdroj.

Zdrojový druh	Název lokusu	Literární zdroj
Tučňák žlutorohý (<i>Eudyptes chrysolophus</i>)	Ech003, Ech005, Ech007, Ech008, Ech009, Ech010, Ech011, Ech012, Ech014, Ech020, Ech024, Ech029, Ech030, Ech036, Ech039, Ech050, Ech051, Ech060, Ech063, Ech065, Ech071, Ech081, Ech091, Ech113, Ech130	Ahmed <i>et al.</i> (2009)
Tučňák nejmenší (<i>Eudyptula minor</i>)	Emm1, Emm2, Emm3, Emm4, Emm5, Emm6, Emm7, Emm8	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)

Tabulka 1 – Pokračování.

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

Tabulka 2 - Přehled ptačích EST mikrosatelitů a konzervovaných ptačích mikrosatelitů použitých pro testování polymorfismu u plameňáka karibského. Je uveden zdroj mikrosatelitů, název lokusu a literární zdroj. Dva mikrosatelity označené hvězdičkou nebyly testovány, protože nebyly během mé bakalářské práce k dispozici.

Zdroje	Název lokusu	Literární zdroj
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)

Tabulka 2 – Pokračování.

Zdroj	Název lokusu	Literární zdroj
Ptačí EST mikrosatelity	TG01-000, TG01-040, TG01-077, *TG01-086, TG01-092, TG01-114, TG01-124, TG01-147, TG01-148, TG02-078, TG02-088, TG02-120, TG03-002, TG03-031, TG03-034, TG03-035, TG03-098, TG04-004, TG04-012, TG04-012A, TG04-041, TG04-061, TG05-030, TG05-046, TG05-053, TG06-009, TG07-022, TG08-024 (1), TG08-024 (2), *TG09-014, TG11-011, TG12-015, TG13-009, TG13-016, TG13-017, TG22-001	Dawson <i>et al.</i> (2010)

Postup:

1. Rozmražení, zvortexování a zcentrifugování složek PCR mixu (viz tabulka 3).
2. Pro 1 reakci do stojánku přichystat 6 PCR mikrozkušavek a jednu 1,5ml mikrozkušavku.
3. Do 1,5ml mikrozkušavky napipetovat složky PCR mixu podle tabulky 3. Směs zvortexovat a zcentrifugovat.

Tabulka 3 - Složení PCR mixu pro 6 vzorků.

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

4. Do PCR mikrozkušavek multikanálovou pipetou napipetovat 1 μl genomické DNA plameňáka karibského (každá ze 6 zkušavek obsahuje genomickou DNA jiného jedince).
5. Ke genomické DNA připipetovat vždy 9 μl PCR reakční směsi a zcentrifugovat.

6. PCR mikrozkušavky dobře uzavřít, vložit do termocykleru a nastavit teplotní program dle schématu 1. Teplota annealingu 50 °C byla základní teplota, která byla použita u všech vzorků během 1. testování. V rámci optimalizace podmínek PCR amplifikace některých vzorků byla teplota snížena nebo zvýšena. Vše je vysvětleno v kapitole č. 5 výsledky.

Schéma 1 – Základní teplotní a časový rozpis PCR reakce

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

4.6 Elektroforetická separace

Následující postup byl optimalizován pro elektroforetickou separaci pobíhající za denaturujících podmínek, při použití vyhřívané sekvenační elektroforetické komůrky S2 Whatman Biometra, rozměry skel 330 x 390 mm a 330 x 420 mm, s tloušťkou gelu 0,4 mm.

1. Příprava menšího skla:
 - a. omýt vodou a saponátem pomocí kartáčku,
 - b. utřít plochu skla papírovými ubrousky do sucha a 2x omýt 96% ethanolem,
 - c. připravit si molekulární lepidlo, protřepat a aplikovat na plochu skla, která přijde do styku s gelem, pomocí papírového ubrousku,
 - d. 4x omýt plochu skla 96% ethanolem.
2. Příprava většího skla:
 - a. omýt deionizovanou vodou s pomocí kartáčku,
 - b. utřít plochu skla papírovými ubrousky,
 - c. nanést Rain off přípravek na plochu skla, která přijde do styku s gelem, a rozetřít ubrouskem,
 - d. 2x omýt deionizovanou vodou.
3. Položit větší sklo ošetřenou plochou nahoru na polystyren v digestoři.
4. Na delší okraje většího skla položit 0,4mm spacersy gumami nahoru a na ně položit menší sklo ošetřenou plochou dolů. Spacersy zarovnat k okrajům, menší sklo těsně přitisknout ke gumám a na každou delší stranu skla připevnit vždy 2 klipsy.

5. Do kádinky připravit 6% roztok polyakrylamidového gelu. Opatrně promíchat roztok krouživými pohyby kádinky a pomalu nalévat do prostoru mezi skla, až do úplného vyplnění prostoru mezi nimi. Druhou rukou jemně poklepávat na horní sklo, aby se zabránilo vzniku vzduchových bublin v gelu.
6. Po vyplnění prostoru mezi skly gelem, na straně mezi gumami spaceru zasunout hřebínek rovnou stranou do gelu (asi 0,5 cm). Opatrně připevnit 4 klipsy a nechat alespoň 60 min polymerizovat.
7. Po zatuhnutí gelu odstranit klipsy a pod tekoucí vodou odstranit přebytky gelu pomocí kartáčku.
8. Plochu malého skla utřít papírovými ubrousky do sucha. Skla s gelem upevnit do elektroforetické komůrky tak, aby malé sklo směřovalo k hliníkové desce a hřebínek byl nahoře. Řádně přitáhnout úchyty pro držení skla.
9. Do anodového a katodového prostoru nalít 0,5x TBE pufr, vytáhnout hřebínek a vzniklý prostor pečlivě promýt proudem 0,5x TBE pufru z injekční stříkačky. Zavřít víka, připojit zdroj stejnosměrného elektrického proudu a nastavit hodnotu výkonu na 90 W (hodnoty elektrického napětí a proudu nechat nastaveny na maximum 3000 V/150 mA). Nechat gel 30 min nahřát.
10. Během nahřívání gelu připravit vzorky: do každé zkumavky se vzorkem přidat 5 μ l nanášecího pufru. Těsně před nanesením vzorů na gel dát takto připravené vzorky na 3 min do denaturačních podmínek do termocykleru vytemperovaném na 96 °C. Poté vzorky umístit ihned do ledové tříště, pro zabránění renaturace.
11. V průběhu denaturace připravit elektroforézu pro nanesení vzorků. Odpojit elektroforetickou komůrku od zdroje stejnosměrného elektrického proudu, odklopit víko katodového prostoru a opět pročistit mezeru mezi skly proudem pufru ze stříkačky, aby byly odstraněny případné zbytky polyakrylamidového gelu a močoviny. Do mezery opatrně zasunout hřebínek tak, aby zoubky hřebínku byly v gelu asi 1 mm hluboko.
12. Pomocí pipety nanést vzorky po 2 μ l.
13. Zavřít víko katodového prostoru, připojit zdroj stejnosměrného elektrického proudu a nastavit hodnotu výkonu na 70 W (hodnoty elektrického napětí a proudu nechat nastaveny na maximum 3000 V/150 mA).
14. Vzorky separovat 1,5–3 hod.

15. Během elektroforetické separace nachystat fix/stop roztok, 1% roztok kyseliny dusičné a vývojkou. Vývojkou připravit prozatím bez formaldehydu a thiosíranu sodného a umístit do chladničky.
16. Po uplynutí požadované doby separace vzorků vypnout zdroj stejnosměrného elektrického proudu a odpojit elektrody z elektroforetické komůrky. Pomocí otočení šroubku na pravé straně elektroforetické komůrky se otevře kanálek pro odtečení pufru z katodového do sběrného prostoru. Povolit úchyty pro držení skel, a skla s gelem opatrně vytáhnout a položit menším sklem nahoru na vodorovnou plochu. Vytáhnout hřebínek a oba spacery z prostoru mezi skly a pomocí nože oddělit od sebe skla tak, aby nebyl gel poškozen.
17. Menší sklo s gelem umístit gelem nahoru do fotomisky, umístit na třepačku a zalít fix/stop roztokem. Nechat působit alespoň 20 min. Po uplynutí doby fix/stop roztok nalít zpět do baňky (uchovat pro zastavení vyvolávání barvy) a sklo s gelem promýt 3x deionizovanou vodou.
18. Fotomisku s gelem umístit zpět na třepačku a zalít 1% roztokem HNO₃. Nechat působit 5 min, roztok vylít do odpadu a sklo s gelem promýt 4x deionizovanou vodou.
19. Bezprostředně před použitím do baňky s AgNO₃ přidat 1,2 ml formaldehydu. Přenést promyté sklo s gelem ve fotomisce na třepačku a ihned zalít tímto roztokem. Nechat působit alespoň 30 min.
20. Před skončením doby barvení gelu je třeba přidat do baňky s vývojkou 1,2 ml formaldehydu a 160 µl thiosíranu sodného a připravit si fotomisku s deionizovanou vodou.
21. Po uplynutí doby barvení nalít roztok AgNO₃ zpět do baňky a sklo s gelem asi na 5 sekund ponořit do připravené deionizované vody. Sklo nechat trochu okapat a přenést do fotomisky na třepačce. Sklo s gelem zalít vývojkou a sledovat vyvíjení hnědočerných pruhů PCR produktů. Jakmile jsou pruhy dostatečně viditelné a než začne tmavnout pozadí, přilít do fotomisky fix/stop roztok, který zastaví vyvíjení zbarvení. Takto nechat roztok působit ještě 2 min a poté vylít roztok do odpadu.
22. Sklo s gelem a vyvolanými pruhy ponořit asi na 2 min do deionizované vody, poté podepsat a nechat 30 min sušit v sušárně při 90 °C.
23. Po usušení gel vyhodnotit na negatoskopu.
24. Nepotřebný gel namočit na několik hod do roztoku NaOH o koncentraci 1 mol/l a tím ho odlepit od skla. Poté sklo umýt a takto je připraveno k opětovnému použití.

5 Výsledky

V rámci mé bakalářské práce jsem na 6 nepříbuzných jedincích plameňáka karibského (*Phoenicopterus ruber*) testovala *cross-species* PCR amplifikaci 171 párů primerů pro amplifikaci mikrosatelitů. Ze 171 párů primerů bylo 113 dosud popsáno pro mikrosatelity izolované od zástupců z řádu tučňáci a 58 pro univerzální ptačí mikrosatelity, které zahrnovaly 24 párů primerů pro konzervované ptačí mikrosatelity a 34 párů primerů pro EST mikrosatelitů. EST mikrosatelitů bylo objeveno celkem 35, pro které bylo navrženo 36 párů primerů, ale v rámci této bakalářské práce jsem testovala 33 mikrosatelitů, pro které bylo navrženo 34 párů primerů. Netestované mikrosatelity, které nebyly v době testování k dispozici, byly TG01-086 a TG09-014.

Se všemi mikrosatelity jsem provedla *cross-species* PCR amplifikaci, se základní teplotou annealingu 50 °C. Poté jsem PCR produkty dělila v 6% polyakrylamidovém gelu za denaturujících podmínek po dobu 90 minut. Následně jsem provedla optimalizaci podmínek PCR reakce mikrosatelitů, které měly neprůkazný produkt po elektroforetické separaci. V případě, že byl PCR produkt málo zřetelný, anebo nebyl viditelný žádný produkt, postupně jsem snižovala teplotu annealingu, v některých případech až na 46 °C. Pokud však byl produkt velmi intenzivní, zvyšovala jsem teplotu annealingu, v některých případech až na 70 °C, aby bylo možné mikrosatelity vyhodnotit a provést jejich genotypizaci. Optimalizace podmínek PCR reakce u jednoho mikrosatelitu zahrnovala snížení koncentrace hořčnatých iontů v PCR mixu z původních 1,6 nmol/l na tříčtvrtinovou koncentraci 1,2 nmol/l a také na poloviční koncentraci 0,8 nmol/l. Některé produkty měly vyšší relativní molekulovou hmotnost, a proto jsem musela v těchto případech prodloužit dobu elektroforetické separace až na 3 hodiny, aby bylo možné rozeznat jednotlivé alely mikrosatelitního lokusu.

U všech 170 mikrosatelitů testovaných u 6 jedinců plameňáka karibského se mi podařilo získat produkt PCR. 147 mikrosatelitů bylo monomorfních. Jeden mikrosatelit, Emm5, který byl izolován u tučňáka nejmenšího (*Eudyptula minor*), byl homozygotní, ale bylo by lepší tento lokus otestovat na dalších jedincích, u kterých by mohl být heterozygotní. Dále mikrosatelit Ech020, který byl izolován u tučňáka žlutorohého (*Eudyptes chrysolophus*), vyšel taktéž monomorfní, ale je u něj pravděpodobná vazba na W chromozom, jelikož se amplifikoval pouze u samic. Polymorfních bylo 23 mikrosatelitů, jejichž charakteristiky uvádím v tabulce 4.

Tabulka 4 - Charakteristika 23 nalezených polymorfních mikrosatelitů testovaných u 6 nepříbuzných jedinců plameňáka karibského. V tabulce jsou uvedeny názvy mikrosatelitních lokusů, včetně kódu uvedeného v databázi GenBank (Accession number), sekvence primerů, jednotky repetice, zdrojového druhu, teploty annealingu, délky elektroforetické separace a počtu alel.

Lokus (GenBank – Accession no.)	Sekvence primerů (5' → 3')	Jednotka repetice	Zdrojový druh	T _a [°C]	ELFO [min]	Počet alel
Ech005 (FM878336)	F: GCCTTATGCAGGTACAGATGTCTTCTC R: TGCTGAAGGTAAAGAGCAGTGAAATC	CTTTT	Tučňák žltorohý	67	180	5
Ech009 (FM878340)	F: CCTCTGTTGTACAAGCTGGATGC R: GCAATTCTGCTTGCCTCTGC	AC		69	180	2
Ech011 (FM878342)	F: CACAGCACTGTGACAGAAGCA R: TTAACTGGTTCGATTTGTCAGTCTTT	GT		53	120	3
Ech024 (FM878355)	F: TGTTTCTTGCTTGCTACTTCCACAG R: CCAAATATGTTGTGGTTCGACAGTG	CT		63	90	2
Ech030 (FM878361)	F: TGACGCCGCAGGGACTTC R: GCTCAGCTCTTGCTCACAGTTTCAG	CTAT		68	120	3
Ech039 (FM878370)	F: TCTTCCCAGGCAAGGAATAAC R: CTCTGACTAATTGCTAAGAAATACTCCTG	TTTCT		64	150	7
Em2 (KM272222)	F: GGC ACTGGGATCTTTCTTCC R: GACCATGCTGCAGGTTCTTG	AGAT	Tučňák nejmenší	67	120	3
Em9* (KM272227)	F: TTCACCACA ACTCTCTGGGC R: CTACCCACCCACCCACTG	GATA		53	90	2
Em23 (KM272234)	F: GATGCATGTGGAGGAAGTGC R: GGCAACATGGTAGCTGACAC	CA		69	90	3
B3-2 (neuveдено)	F: GGTGGTTATAGATGCACGAC R: ACGTGCC CAGGAATCCAGTT	GT	Tučňák brýlový	66	180	3
PNN08 (JX494408)	F: GGAAATGCCACTGAAAACCTAA R: GATAGATGGGGA ACTGGAAACA	ATAG		59	90	4

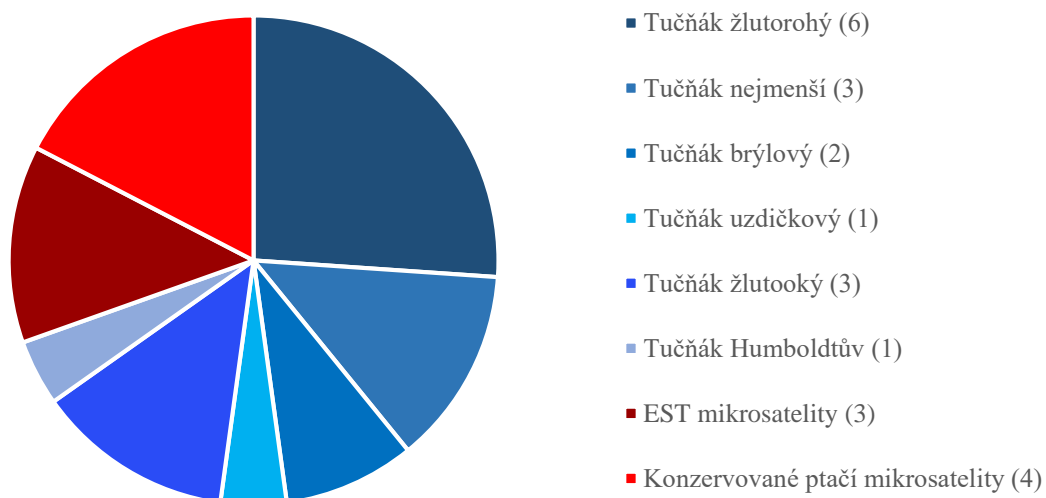
* mikrosatelit vykazoval navíc nulovou alelu, která není započítána do počtu alel

Tabulka 4 – Pokračování.

Lokus (GenBank – Accession no.)	Sekvence primerů (5' → 3')	Jednotka repeticce	Zdrojový druh	T _a [°C]	ELFO [min]	Počet alel
Pygantarc07 (KP316214)	F: CCCATCAGAGTGACGTTCAA R: TATTTGACAGCCTTCCTGCC	AAGG	Tučňák uzdičkový	56	150	2
Man27 (EU267114)	F: GATCCTGAGAAGAGAGACAG R: GGCTGTTCATTTTGTAC	GA/GT/CA/TG/GCA	Tučňák žlutooký	60	90	2
Man47 (EU267116)	F: ATACCTCCAGAATGGCTG R: CACTAAGGGTGACCAAGG	TGA		54	90	2
Man55 (EU267120)	F: TTGAACTAGCAAGCAGTGTAG R: AAGGGCATTTCATTCTG	TTG		61	90	2
Sh2Ca21 (AF540011)	F: AAAATAAAGCCTATACACAACAGG R: GTGCACTTAATGGGGTGTATG	CA	Tučňák Humboldtův	53	90	2
TG03-002 (DV575298)	F: TCTTGCCTTTTTGGTATGAGTATAG R: TACAAAGCACTGTGGAGCAG	AT	EST mikrosatelity	62	90	2
TG04-061 (CK235034)	F: GACAATGGCTATGAAATAAATTAGGC R: AGAAGGGCATTGAAGCACAC	A/GA		64	150	4
TG22-001 (CK317333)	F: TTGGATTCAGAACATGTAGC R: TCTGATGCAAGCAAACAA	AT/AT		59	120	2
CAM-06 (neuvedeno)	F: GTGATGGTCCAGGTCTTGC R: CAAGAGGAACAGATGAGGGTC	AT	Konzervované ptačí mikrosatelity	62	120	2
CAM-11 (neuvedeno)	F: TGGTACAGGGACAGCAAACC R: AGATGCTGAGAGCGGATG	GT		63	90	2
CAM-20 (neuvedeno)	F: TAACAGGCAGGAATGCAGG R: TCAGCCAGTGTGGAGGTC	AT		53	150	3
CAM-24 (neuvedeno)	F: CCCACTTCAGTCTTCAGAGC R: TGGAGTATTTGGGATTGGAG	CA		52	90	4

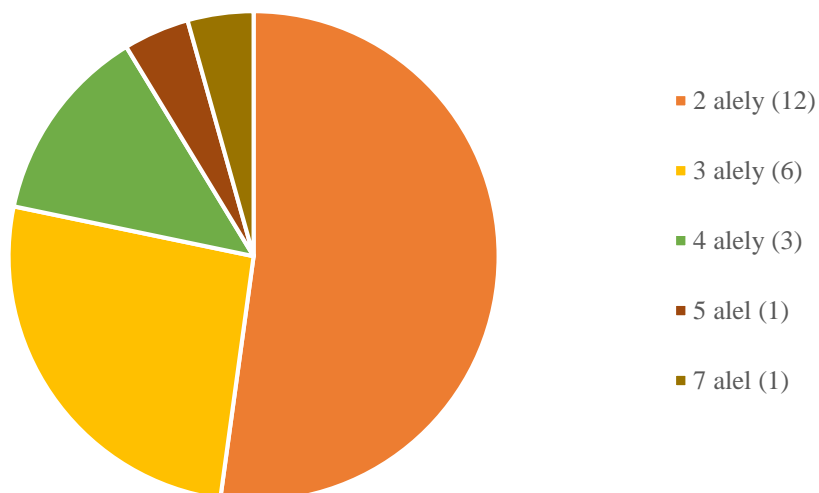
Testovala jsem *cross-species* PCR amplifikaci 170 mikrosatelitů u 6 nepříbuzných jedinců plameňáka karibského. Z celkového počtu testovaných mikrosatelitů bylo 23 mikrosatelitů polymorfních. Stanovila jsem celkovou úspěšnost nalezení polymorfních mikrosatelitů na 13,5 %. Z 23 mikrosatelitů, které byly polymorfní, bylo 16 mikrosatelitů odvozených od zástupců z řádu tučňáci a 7 bylo univerzálních ptačí mikrosatelitů. Bylo testováno celkem 113 mikrosatelitů pocházejících z řádu tučňáci, ze kterých bylo 16 mikrosatelitů polymorfních. Úspěšnost nalezení polymorfních lokusů tedy byla 14,16 %. Největší úspěšnost *cross-species* PCR amplifikace mikrosatelitů z řádu tučňáci byla u mikrosatelitů odvozených od tučňáka žlutookého, kdy z 12 testovaných mikrosatelitů byly 3 polymorfní, a tedy úspěšnost byla 25 %. Univerzálních ptačích mikrosatelitů bylo testováno 57, polymorfních bylo 7, celková úspěšnost *cross-species* PCR amplifikace byla 12,28 %. Do univerzálních ptačích mikrosatelitů patří EST mikrosatelity a konzervované ptačí mikrosatelity. Úspěšnost amplifikace EST mikrosatelitů u plameňáka karibského byla 8,82 %, protože z 33 testovaných mikrosatelitů byly polymorfní 3. Konzervovaných ptačích mikrosatelitů bylo testováno 24, z nichž byly 4 mikrosatelity polymorfní. Úspěšnost tedy činila 16,6 %. Polymorfní mikrosatelity rozdělené dle jejich původu, včetně počtem polymorfních lokusů u jednotlivých druhů, jsou znázorněny v grafu 1.

Graf 1 – Rozdělení 23 mikrosatelitů polymorfních u 6 nepříbuzných jedinců plameňáka karibského podle zdroje ze kterého byly odvozeny. Odstíny modré barvy značí mikrosatelity odvozené z řádu tučňáci a odstíny červené značí univerzální ptačí mikrosatelity. V závorkách jsou uvedeny počty jednotlivých polymorfních lokusů z daného zdroje.



Počet alel, který byl zjištěný u 23 polymorfních mikrosatelitů, byl v rozpětí 2–7. Nejvíce mikrosatelitů mělo 2 alely, které byly detekovány u 12 mikrosatelitů z 23 polymorfních. Tři alely byly zjištěny u 6 mikrosatelitů, 4 alely u 3 mikrosatelitů, 5 alel u 1 mikrosatelitu, a stejně tak 7 alel bylo detekováno pouze u 1 mikrosatelitu. V Grafu 2 je znázorněno rozdělení mikrosatelitů dle počtu detekovaných alel.

Graf 2 – Rozdělení 23 mikrosatelitů odvozených z řádu tučňáci a univerzální ptačí mikrosatelity, které byly polymorfní u 6 nepříbuzných jedinců plameňáka karibského, podle počtu alel, které byly detekovány v jednotlivých mikrosatelitech. V závorce jsou uvedeny počty mikrosatelitů, které obsahovaly daný počet alel.



Genotypy 23 polymorfních mikrosatelitů nalezeným u 6 nepříbuzných jedinců plameňáka karibského byly vyhodnoceny po optimalizaci podmínek PCR a také po optimalizaci délky elektroforetické separace (viz tabulka 5). U mikrosatelitu Em9 byla v genotypu 2 ze 6 jedinců plameňáka karibského přítomna nulová alela, která není započítána v počtu alel vyskytujících se u tohoto mikrosatelitu.

Tabulka 5 – Genotypy 23 mikrosatelitů polymorfních u 6 nepříbuzných jedinců plameňáka karibského. V tabulce jsou uvedeny názvy mikrosatelitních lokusů, zdrojové druhy, počty alel a genotypy.

Název lokusu	Zdrojový druh	Počet alel	Genotypy
Ech005	Tučňák žlutorohý	5	1/4, 4/4, 3/4, 2/4, 4/4, 4/5
Ech009		2	1/1, 1/1, 1/1, 2/2, 1/1, 1/1
Ech011		3	2/3, 1/2, 2/3, 2/3, 2/3, 2/3
Ech024		2	1/2, 2/2, 2/2, 1/1, 2/2, 2/2
Ech030		3	1/2, 2/3, 1/3, 2/3, 2/2, 2/2
Ech039		7	4/5, 4/6, 2/2, 1/3, 3/6, 6/7
Em2	Tučňák nejmenší	3	2/3, 3/3, 3/3, 1/3, 3/3, 2/3
Em9*		2	0/0, 1/1, 0/0, 1/2, 2/2, 1/2
Em23		3	3/3, 3/3, 2/3, 1/3, 3/3, 3/3
Man27	Tučňák žlutooký	2	1/1, 1/1, 1/2, 1/2, 1/2, 2/2
Man47		2	1/1, 1/1, 2/2, 1/2, 2/2, 1/2
Man55		2	2/2, 1/2, 1/2, 2/2, 1/2, 1/2
Pygantarc07	Tučňák uzdičkový	2	2/2, 1/2, 2/2, 1/2, 1/2, 1/2
B3-2	Tučňák brýlový	3	1/2, 1/1, 1/3, 1/2, 1/1, 1/1
PNN08		4	2/4, 2/3, 2/3, 2/3, 3/3, 1/3
Sh2Ca21	Tučňák Humboldtův	2	1/1, 1/1, 2/2, 1/1, 1/2, 1/1
TG03-002	EST mikrosatelity	2	2/2, 1/2, 2/2, 2/2, 2/2, 2/2
TG04-061		4	3/3, 2/4, 2/3, 1/3, 3/3, 2/3
TG22-001		2	1/1, 1/1, 1/1, 1/1, 1/2, 1/2
CAM-06	Konzervované ptačí mikrosatelity	2	2/2, 2/2, 1/2, 2/2, 1/2, 1/1
CAM-11		2	2/2, 2/2, 2/2, 2/2, 2/2, 1/1
CAM-20		3	2/2, 2/3, 2/2, 2/3, 2/2, 1/2
CAM-24		4	3/3, 2/4, 2/3, 3/4, 1/4, 1/1

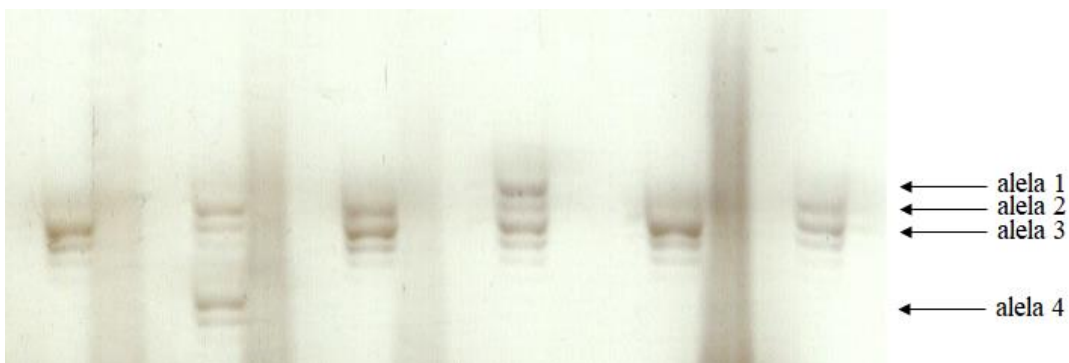
* mikrosatelit vykazoval navíc nulovou alelu, která není započítána do počtu alel

Na následujících obrázcích jsou vybrané úseky fotografií elektroforetogramů, na kterých lze vidět separované PCR produkty získané *cross-species* PCR amplifikací u 6 nepříbuzných jedinců plameňáka karibského. Na obrázku 2 je separovaný mikrosatelitní lokus PNN08, který byl původně izolován od tučňáka brýlového a na obrázku 3 je separovaný mikrosatelitní lokus TG04-061, který patří mezi EST mikrosatelity.

Obrázek 2 – Elektroforetogram polymorfního mikrosatelitního lokusu PNN08 u 6 nepříbuzných jedinců plameňáka karibského. U tohoto lokusu byly detekovány 4 alely, které jsou označeny šipkami v obrázku. Teplota annealingu byla 59 °C a elektroforetická separace trvala 90 minut.



Obrázek 3 – Elektroforetogram polymorfního mikrosatelitního lokusu TG04-061 u 6 nepříbuzných jedinců plameňáka karibského. U tohoto lokusu byly detekovány 4 alely, které jsou označeny šipkami v obrázku. Teplota annealingu byla 64 °C a elektroforetická separace trvala 150 minut.



Polymorfní mikrosatelity nalezené v rámci této bakalářské práce byly testovány na 6 nepříbuzných jedincích plameňáka karibského. Je to dostačující počet jedinců pro nalezení polymorfismů, ale bylo by vhodné do budoucna tyto mikrosatelity otestovat na více nepříbuzných jedincích, aby bylo možné stanovit další charakteristiky, jako je heterozygotnost, odchylka od Hardy-Weinbergovy rovnováhy anebo vazba lokusů.

6 Diskuze

V rámci této práce jsem se zabývala *cross-species* PCR amplifikací celkem 170 mikrosatelitů, pro které bylo navrženo 171 párů primerů, u 6 nepříbuzných jedinců plameňáka karibského (*Phoenicopterus ruber*), kde jsem detekovala polymorfismus. Testovala jsem 113 párů primerů navržených pro mikrosatelity vyskytující se u 9 druhů z řádu tučňáci a našla jsem 16 polymorfních mikrosatelitních lokusů. Dále jsem testovala 58 párů primerů pro univerzální ptačí mikrosatelity, do kterých se řadí EST mikrosatelity a konzervované ptačí mikrosatelity, kde bylo polymorfních 7 mikrosatelitních lokusů. Celkem tedy bylo polymorfních 23 mikrosatelitů ze 170 testovaných.

Z řádu tučňáci jsem testovala 113 párů primerů, které amplifikovaly 16 polymorfních lokusů u 6 nepříbuzných jedinců plameňáka karibského. Tyto nalezené polymorfní lokusy byly odvozeny od tučňáka žltorohého (*Eudyptes chrysolophus*), nejmenšího (*Eudyptula minor*), žlutookého (*Megadyptes antipodes*), uzdičkového (*Pygoscelis antarctica*), brýlového (*Spheniscus demersus*) a Humboldtova (*S. humboldti*).

U tučňáka žltorohého Ahmed *et al.* (2009) popsali 25 mikrosatelitních lokusů, které amplifikovali u tučňáka žltorohého. Já jsem použila těchto 25 mikrosatelitů pro testování *cross-species* PCR amplifikace u 6 nepříbuzných jedinců plameňáka karibského a objevila jsem 6 polymorfních lokusů. Autoři použili u všech mikrosatelitů teplotu annealingu (dále již T_a) 60 °C. U lokusu Ech005 autoři testovali 27 jedinců, u kterých našli 33 alel. Já jsem u tohoto lokusu při T_a 67 °C objevila 5 alel. Lokus Ech009 autoři testovali na 28 jedincích a počet alel byl 8, kdežto já jsem detekovala 2 alely při T_a 69 °C. U lokusu Ech011 autoři našli 8 alel u 27 jedinců a já jsem našla 3 alely při T_a 53 °C. Lokus Ech024 autoři amplifikovali u 28 jedinců, kde našli 5 alel, já jsem detekovala 2 alely při T_a 63 °C. Autoři u lokusu Ech030 našli 11 alel u 28 jedinců, já jsem našla jen 3 alely, T_a byla 68 °C. U lokusu Ech039 autoři detekovali u 22 jedinců 25 alel a já jsem objevila u 6 jedinců plameňáka karibského celkem 7 alel při T_a 64 °C, což byl nejvyšší počet detekovaných alel u plameňáka karibského v rámci této bakalářské práce. V rámci výzkumu Ahmed *et al.* (2009) použili 25 popsáných mikrosatelitů pro *cross-species* PCR amplifikaci u 4 dalších druhů tučňáků, kde lokusy Ech005 a Ech039 nebyly mikrosatelity u testovaných druhů, lokus Ech009 byl polymorfní u 3 druhů tučňáků, lokus

Ech011 byl polymorfní u 2 druhů tučňáků, lokus Ech024 u 1 a lokus Ech030 u 3 druhů tučňáků.

Grosser *et Waters* (2015) popsali u tučňáka nejmenšího 20 mikrosatelitů, které testovali na polymorfismus při T_a 60 °C, ale autoři dále neuvádí, na kolika jedincích byl testován. Já jsem na 6 nepříbuzných jedincích plameňáka karibského testovala na polymorfismus všech 20 mikrosatelitních lokusů, z nichž polymorfní byly 3. Autoři u lokusu Em2 detekovali 17 alel a já jsem objevila 3 při T_a 67 °C. Lokus Em9 dle autorů měl 22 alel. Já jsem u tohoto lokusu našla jen 2 alely při T_a 53 °C. U lokusu Em23 autoři našli 9 alel, já jsem našla 3 alely u plameňáka karibského při T_a 69 °C.

Boessenkool *et al.* (2008) ve svém výzkumu popsali 12 mikrosatelitů odvozených od tučňáka žlutookého, které byly polymorfní u 43 jedinců. Já jsem u 6 nepříbuzných jedinců plameňáka karibského testovala na polymorfismus všech 12 mikrosatelitů, z nichž jsem detekovala 3 polymorfní mikrosatelity. U lokusu Man27 autoři našli 2 alely, když prováděli PCR při T_a 48 °C, já jsem při T_a 60 °C našla 2 alely. Dle autorů měl lokus Man47 4 alely, při T_a 48 °C, já jsem detekovala 2 alely při T_a 54 °C. U lokusu Man 55 autoři detekovali 2 alely, stejně jako já, ale použili T_a 48 °C a já jsem použila 61 °C.

U tučňáka uzdičkového Kang *et al.* (2015) popsali 16 polymorfních mikrosatelitů testovaných na 23 jedincích. T_a se během 42 cyklů PCR amplifikace měnila – 7 cyklů mělo teplotu 65 °C, další 7 cyklů mělo teplotu 61 °C, dalších 7 cyklů mělo teplotu 58 °C a posledních 21 cyklů mělo teplotu 55 °C. Já jsem testovala u 6 nepříbuzných jedinců plameňáka karibského všech 16 mikrosatelitních lokusů, ale našla jsem pouze 1 polymorfní lokus, a to Pygantarc07, který měl při T_a 56 °C alely 2, stejně tak, jako uvádějí i autoři.

Mikrosatelity odvozené od tučňáka brýlového, které mi vyšly polymorfní při testování u 6 nepříbuzných jedinců plameňáka karibského, byly popsány celkem ve 2 studiích. Labuschagne *et al.* (2013) popsali 8 mikrosatelitních lokusů, odvozených od tučňáka brýlového, které byly testovány u 25 jedinců. T_a všech testovaných lokusů byla 50–60 °C, ale autoři neuvádí, která teplota patří ke kterému lokusu. Lokus PNN08 měl dle autorů 4 alely a já jsem našla, při T_a 59 °C, také 4 alely. Lokus B3-2 našli a popsali Akst *et al.* (2002) pro studium tučňáka magellanského a galapážského. Tento lokus měl T_a 50 °C a byl testován u 46 jedinců, ale autoři neuvádí, jaký měl počet alel. Dále tento lokus autoři testovali pomocí *cross-species* PCR amplifikace u tučňáka galapážského

a magellanského, kde byl tento lokus testován na 46 jedincích z každého druhu. Lokus B3-2 byl u tučňáka galapážského monomorfní a u tučňáka magellanského měl 8 alel. Já jsem u lokusu B3-2 detekoval 3 alely u plameňáka karibského při T_a 66 °C.

Schlosser *et al.* (2003) detekovali u 24 zástupců tučňáka Humboldtova 7 polymorfních mikrosatelitních lokusů. Všechny lokusy jsem použila pro *cross-species* PCR amplifikaci 6 nepříbuzných jedinců plameňáka karibského. Já jsem našla 1 polymorfní lokus, Sh2Ca21, který měl u plameňáka karibského 2 alely. Použila jsem T_a 53 °C, stejně jako autoři, ale ti objevili u tohoto lokusu 6 alel. Dále Schlosser *et al.* (2003) testovali všech 7 popsaných mikrosatelitů pomocí *cross-species* PCR amplifikace u 8 jiných druhů tučňáků. Lokus Sh2Ca21 byl polymorfní u 7 z nich.

Testovala jsem 57 univerzálních ptačích mikrosatelitů, pro které bylo navrženo 58 párů primerů. Podařilo se mi amplifikovat 7 polymorfních mikrosatelitních lokusů u 6 nepříbuzných jedinců plameňáka karibského. Do univerzálních ptačích mikrosatelitů patří EST mikrosatelity a konzervované ptačí mikrosatelity.

EST mikrosatelity byly popsány Dawson *et al.* (2010). Bylo objeveno celkem 35 mikrosatelitů, pro které bylo navrženo 36 párů primerů. Z nich jsem testovala 34 párů primerů pro 33 mikrosatelitních lokusů, ze kterých byly polymorfní u 6 nepříbuzných jedinců plameňáka karibského celkem 3 mikrosatelity. Autoři amplifikovali všechny popsané EST mikrosatelity u 4 jedinců zebřičky pestré (*Taeniopygia guttata*), u 1 jedince kura domácího (*Gallus gallus*) a u 4 jedinců divoké formy kura domácího při T_a 56 °C. U lokusu TG03-002 autoři detekovali 2 alely u zebřičky pestré, 1 alelu u kura domácího a u jeho divoké formy našli alely 2. Já jsem u tohoto lokusu našla 2 alely, které měly T_a 62 °C. U dalšího lokusu TG04-061 autoři detekovali 2 alely u zebřičky pestré a u kura domácího, i u jeho divoké formy, bylo objeveno po 1 alele. Já jsem po amplifikaci tohoto lokusu u plameňáka karibského našla 4 alely, T_a byla 64 °C. Lokus TG22-001 dle autorů obsahoval 3 alely u zebřičky pestré a u kura domácího, i u jeho divoké formy, bylo nalezeno po 1 alele. Já jsem detekovala u tohoto lokusu 2 alely a T_a byla 59 °C. Autoři dále testovali všech 35 EST mikrosatelitů pomocí *cross-species* PCR amplifikace vždy u minimálně 4 jedinců z každého ze 17 druhů pěvců a 5 ostatních druhů ptáků. U těchto druhů bylo polymorfních 33 mikrosatelitů, ale autoři již neuvádějí počty alel u těchto lokusů.

Dawson *et al.* (2013) popsalí 24 konzervovaných ptačích mikrosatelitů. Tyto mikrosatelity autoři amplifikovali vždy minimálně u 4 jedinců zebřičky pestré a kura domácího a T_a byla vždy 56 °C. Já jsem pomocí *cross-species* PCR amplifikace testovala všech 24 konzervovaných ptačích mikrosatelitů u 6 nepříbuzných jedinců plameňáka karibského a našla jsem 4 polymorfní lokusy. Locus CAM-06 autoři testovali na 8 jedincích zebřičky pestré, kde našli 5 alel a u 4 jedinců kura domácího našli 1 alelu. Já jsem našla u plameňáka karibského 2 alely a T_a jsem optimalizovala na 62 °C. Lokusu CAM-11 autoři testovali na 12 jedincích zebřičky pestré, a našli 6 alel a u 4 jedinců kura domácího našli 1 alelu. Mně se podařilo najít 2 alely, který měli T_a 63 °C. Dále jsem měla polymorfní lokus CAM-20, u kterého jsem detekovala 3 alely, T_a byla 53 °C. Autoři tento lokus testovali na 12 jedincích zebřičky pestré, kde našli 6 alel, a při testování na 2 jedincích kura domácího získali jen 1 alelu. U lokusu CAM-24 autoři našli 6 alel u 12 jedinců zebřičky pestré a u 4 jedinců kura domácího našli 1 alelu. Já jsem detekovala u tohoto lokusu amplifikovaného u 6 jedinců plameňáka karibského celkem 4 alely a T_a byla 52 °C. Dawson *et al.* (2013) testovali všech 24 konzervovaných ptačích mikrosatelitů pomocí *cross-species* PCR amplifikace u 4 jedinců každého z 8 druhů pěvců a 1 jedince každého ze 4 ostatních druhů ptáků. U pěvců bylo detekováno 19 polymorfních lokusů alespoň u 4 z 8 testovaných druhů ptáků, což vypovídá o velké univerzálnosti těchto mikrosatelitů, jelikož genetická vzdálenost mezi zebřičkou pestrá (která je jeden ze 2 zdrojových druhů konzervovaných ptačích mikrosatelitů) a pěvec je hodně velká. Tyto mikrosatelity mají být univerzálnější než EST mikrosatelity, jelikož jsou izolovány z celého genomu a ne jen z EST sekvencí (jak je tomu u EST mikrosatelitů), což se mi taky podařilo prokázat díky takřka dvojnásobné hodnotě úspěšnosti nalezení polymorfních lokusů konzervovaných ptačích mikrosatelitů amplifikovaných u plameňáka karibského.

Dosud popsané mikrosatelity odvozené od 9 druhů z řádu tučňáci a univerzální ptačí mikrosatelity byly testovány v rámci Laboratoře populační genetiky Katedry buněčné biologie a genetiky PřF UPOL i na jinýchdruzích ptáků kladu Aequorlitorornithes. Pechová (2014) pomocí *cross-species* PCR amplifikace testovala 77 párů primerů odvozených z řádu tučňáci (netestovala mikrosatelity odvozené od tučňáka nejmenšího a tučňáka uzdičkového), 34 párů primerů pro EST mikrosatelity a 24 párů primerů pro konzervované ptačí mikrosatelity u 6 nepříbuzných jedinců nesyta indomalajského (*Mycteria leucocephala*). Našla 5 polymorfních mikrosatelitů odvozených z řádu

tučňáci, 1 EST mikrosatelit a 3 konzervované ptačí mikrosatelity. Ty, které byly polymorfní u 6 nepříbuzných jedinců plameňáka karibského, a současně byly polymorfní u 6 nepříbuzných jedinců nesyta indomalajského, jsou uvedeny v tabulce 6.

Filipová (2016) pomocí *cross-species* PCR amplifikace u 6 nepříbuzných jedinců potápky roháče (*Podiceps cristatus*) amplifikovala celkem 171 párů primerů navržených pro mikrosatelity z řádu tučňáci a univerzální ptačí mikrosatelity a našla 19 polymorfních lokusů. Šest polymorfních mikrosatelitních lokusů bylo odvozeno z řádu tučňáci, 7 bylo EST mikrosatelitů a 5 bylo konzervovaných ptačích mikrosatelitů. Lokusy, které byly polymorfní u 6 nepříbuzných jedinců plameňáka karibského, a současně byly polymorfní u 6 nepříbuzných jedinců potápky roháče, jsou uvedeny v tabulce 6.

Šuláková (2017) ve své práci testovala *cross-species* PCR amplifikaci mikrosatelitů z řádu tučňáci a univerzálních ptačích mikrosatelitů u 6 nepříbuzných jedinců pelikána skvrnozobého (*Pelecanus philippensis*). Použila celkem 173 párů primerů a detekovala 14 polymorfních lokusů, z nichž 8 bylo odvozeno z řádu tučňáci, 1 byl EST mikrosatelit a 5 bylo konzervovaných ptačích mikrosatelitů. Do tabulky 6 jsem označila lokusy, které byly polymorfní u 6 nepříbuzných jedinců plameňáka karibského, a současně byly polymorfní u 6 nepříbuzných jedinců pelikána skvrnozobého.

Srovnala jsem polymorfní lokusy, které byly nalezeny v této bakalářské práci, v pracích Pechová (2014), Filipová (2016) a Šuláková (2017) a zjistila jsem, že u všech testovaných druhů ptáků – u plameňáka karibského, nesyta indomalajského, potápky roháče a pelikána skvrnozobého, byl pouze 1 polymorfní lokus společný pro všechny druhy, a to CAM-11, který patří do konzervovaných ptačích mikrosatelitů.

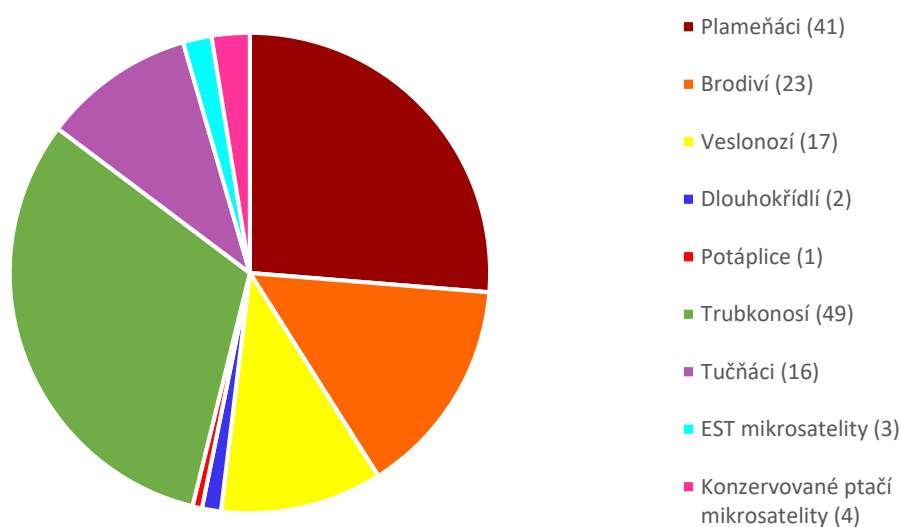
Tabulka 6 – Přehled polymorfních mikrosatelitů z řádu tučňáci a univerzální ptačí mikrosatelity, které byly pomocí *cross-species* PCR amplifikovány u 6 nepříbuzných jedinců plameňáka karibského (tato práce) a současně byly polymorfní u 6 nepříbuzných jedinců nesyta indomalajského (Pechová, 2014), potápky roháče (Filipová, 2016) a pelikána skvrnozobého (Šuláková, 2017). V tabulce uvádím názvy lokusů a počty alel nalezené u jednotlivých druhů, monomorfní lokus je označen M a netestovaná lokus je označen NT.

Název lokusu	Zdrojový druh	Plameňák karibský	Nesyt indomalajský	Potápka roháč	Pelikán skvrnozobý
Ech005	Tučňák žlutorohý	5	4	6	M
Ech009		2	M	2	M
Ech011		3	M	M	M
Ech024		2	M	M	M
Ech030		3	M	M	M
Ech039		7	M	M	M
Em2	Tučňák nejmenší	3	NT	M	M
Em9*		2	NT	M	M
Em23		3	NT	M	M
Man27	Tučňák žlutooký	2	2	M	M
Man47		2	M	M	M
Man55		2	M	M	M
Pygantarc07	Tučňák uzdičkový	2	NT	M	M
B3-2	Tučňák brýlový	3	M	M	M
PNN08		4	M	M	M
Sh2Ca21	Tučňák Humboldtův	2	M	M	M
TG03-002	EST mikrosatelity	2	M	3	M
TG04-061		4	M	5	M
TG22-001		2	M	M	M
CAM-06	Konzervované ptačí mikrosatelity	2	M	M	M
CAM-11		2	5	5	2
CAM-20		3	M	M	M
CAM-24		4	M	4	2

Cross-species PCR amplifikací u plameňáka karibského bylo již testováno v Laboratoři populační genetiky Katedry buněčné biologie a genetiky PřF UPOL celkem 748 párů primerů ve 4 pracích (Drobek, 2010, Buržáková, 2013, Strejčková, 2016, tato bakalářská práce). Z nich bylo 690 párů primerů navrženo pro mikrosatelity ptáků z kladu Aequorlitorornithes (z řádu plameňáci, brodiví, veslonozí, dlouhokřídlí, potáplice, trubkonosí a tučňáci) a 58 párů primerů bylo pro univerzální ptačí mikrosatelity.

U plameňáka karibského bylo nalezeno celkem 156 mikrosatelitových lokusů, které poskytly polymorfni produkt (viz graf 3). Úspěšnost nalezení polymorfni lokusů je 20,85 %.

Graf 3 – Rozdělení 156 polymorfni mikrosatelitů, které byly nalezeny u plameňáka karibského pomocí *cross-species* PCR amplifikace, dle jejich zdrojového řádu, od kterého byly odvozeny (řády veslonozí a brodiví jsou zde chápány v tradičním pojetí). Jedná se o mikrosatelity odvozené od řádů z kladu Aequorlitorornithes a univerzální ptačí mikrosatelity. V závorce je uveden počet polymorfni lokusů od daného řádu.



Až na výjimky univerzálních ptačích mikrosatelitů, polymorfni produkt u plameňáka karibského především poskytly mikrosatelity, které byly odvozeny od zástupců kladu Aequorlitorornithes, kam patří i řád dlouhokřídli (Charadriiformes), který byl u tohoto druhu velmi málo testován. Drobek (2010) a Strejčková (2016) testovali dohromady u plameňáka karibského 7 mikrosatelitů, ze kterých byly polymorfni 2 – APY06 (Drobek, 2010) a RBG29 (Strejčková, 2016). U ptáků z řádu dlouhokřídli bylo nalezeno zatím asi 350–400 mikrosatelitů, které by bylo vhodné otestovat pomocí *cross-species* PCR amplifikace na polymorfismus u plameňáka karibského, jelikož je velká pravděpodobnost nalezení dalších polymorfni lokusů. Protože úspěšnost nalezení polymorfni lokusů u plameňáka karibského dosud činí průměrně 20,85 %, předpokládám, že při stejné úspěšnosti mikrosatelitů z řádu dlouhokřídli by mohlo být celkově nalezeno asi 70–80 mikrosatelitů.

7 Závěr

V této bakalářské práci jsem pomocí *cross-species* PCR amplifikovala mikrosatelitní lokusy, odvozené od druhů z řádu tučňáci a univerzální ptačí mikrosatelity, u 6 nepříbuzných jedinců plameňáka karibského (*Phoenicopterus ruber*) a hledala jsem polymorfnní lokusy.

Testovala jsem celkem 171 párů primerů, navržených pro 170 mikrosatelitů, ze kterých bylo 113 mikrosatelitů odvozeno od 9 druhů tučňáků – od tučňáka žltorohého (*Eudyptes chrysolophus*), nejmenšího (*Eudyptula minor*), žltookého (*Megadyptes antipodes*), kroužkového (*Pygoscelis adeliae*), uzdičkového (*P. antarctica*), brýlového (*Spheniscus demersus*), Humboldtova (*S. humboldti*), galapážského (*S. mendiculus*) a magellanského (*S. magellanicus*). Zbýlých 57 mikrosatelitů, pro které bylo navrženo 58 párů primerů, bylo univerzálních ptačích mikrosatelitů, ze kterých bylo 33 EST mikrosatelitů (pro které bylo navrženo 34 párů primerů) a 24 konzervovaných ptačích mikrosatelitů.

Pomocí *cross-species* PCR amplifikace jsem u plameňáka karibského našla 23 polymorfnních mikrosatelitů, z nichž 16 pocházelo od 6 druhů tučňáků, konkrétně od tučňáka žltorohého 6 mikrosatelitů, od tučňáka nejmenšího 3 mikrosatelity, od tučňáka žltookého 3 mikrosatelity, od tučňáka uzdičkového 1 mikrosatelit, od tučňáka brýlového 2 mikrosatelity a od tučňáka Humboldtova 1 mikrosatelit. Z univerzálních ptačích mikrosatelitů bylo polymorfnních 7 mikrosatelitů, z nichž 3 byly EST mikrosatelity a 4 byly konzervované ptačí mikrosatelity. Teplotu annealingu u polymorfnních lokusů jsem optimalizovala v rozmezí 52–69 °C, nejnižší počet alel, který jsem našla, byl 2 alely a nejvyšší byl 7 alel. Dobu elektroforetické separace jsem optimalizovala od 90 minut do 180 minut.

Celková úspěšnost *cross-species* PCR amplifikace a nalezení polymorfnních lokusů byla 13,5 %. Pro mikrosatelity z řádu tučňáci činila úspěšnost 14,16 % a pro univerzální ptačí mikrosatelity byla úspěšnost 12,28 %. Nejvyšší úspěšnost *cross-species* PCR amplifikace jsem stanovila u mikrosatelitů odvozených od druhu tučňák žltooký, která byla 25 %.

8 Seznam použitých zkratek

bp	páry bází
DNA	deoxyribonukleová kyselina
dNTPs	deoxynukleosidtrifosfáty
mtDNA	mitochondriální DNA
nDNA	jaderná DNA
PCR	polymerázová řetězová reakce
[³² P]dATP	deoxyriboadenintrifosfát značený radioaktivním izotopem ³² P
[³² P]dCTP	deoxyribocytidintrifosfát značený radioaktivním izotopem ³² P

9 Použitá literatura

- Abdurakhmonov, I. Y. (2016). Introduction to Microsatellites: Basics, Trends and Highlights. In *Microsatellite Markers*. (internetový zdroj, navštíveno dne 26. 7. 2017 na www.intechopen.com)
- Adcock, G. J., et Mulder, R. A. (2002). Polymorphic microsatellite loci for paternity analysis in the Madagascar paradise flycatcher (*Terpsiphone mutata*: Aves). *Molecular Ecology Notes*, 2(3), 287–289.
- Ahmed, S., Hart, T., Dawson, D. A., Horsburgh, G. J., Trathan, P. N., et Rogers, A. D. (2009). Isolation and characterization of macaroni penguin (*Eudyptes chrysolophus*) microsatellite loci and their utility in other penguin species (Spheniscidae, AVES). *Molecular Ecology Resources*, 9(6), 1530–1535.
- Akst, E., Boersma, P., et Fleischer, R. (2002). A comparison of genetic diversity between the Galapagos Penguin and the Magellanic Penguin. *Conservation Genetics*, 3(4), 375–383.
- Armour, J. A., Neumann, R., Gobert, S., et Jeffreys, A. J. (1994). Isolation of human simple repeat loci by hybridization selection. *Human Molecular Genetics*, 3(4), 599–65.
- Baker, A., J. (2000). *Molecular methods in ecology*. Blackwell Science Ltd, Oxford
- Billing, T. M., Guay, P.-J., Peucker, A. J., et Mulder, R. A. (2007). Isolation and characterization of polymorphic microsatellite loci for the study of paternity and population structure in the little penguin *Eudyptula minor*. *Molecular Ecology Notes*, 7(3), 425–427.
- Boessenkool, S., King, T. M., Seddon, P. J., et Waters, J. M. (2008). Isolation and characterization of microsatellite loci from the yellow-eyed penguin (*Megadyptes antipodes*). *Molecular Ecology Resources*, 8(5), 1043–5.
- Bruford, M., Hanotte, O., Brookfield, J., Burke, T. (1998) *Multilocus and single-locus DNA fingerprinting. Molecular genetic analysis of populations: a practical approach*. Oxford University Press, New York.

- Ceo, R. N., Kazerouni, M. R., et Rengan, K. (1993). Sorption of silver ions by Chelex 100 chelating resin. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry Articles*, 172(1), 43–48.
- Cramp, S., Simmons, K. E. L., Ferguson–Lees, I. J., Gillmor, R., Hollom, P. A. D. (1977). Handbook of the Birds of Europe, the Middle East and North Africa: The Birds of Western Palearctic. Volume 1. Ostrich to Ducks. Oxford University Press, New York.
- Davis, L., S., Penguinworld (internetový zdroj), navštíveno dne 15. 3. 2017 na <http://penguinworld.com/types/index.html>
- Dawson, D. A., Ball, A. D., Spurgin, L. G., Martín-Gálvez, D., Stewart, I. R. K., Horsburgh, G. J., et Burke, T. (2013). High-utility conserved avian microsatellite markers enable parentage and population studies across a wide range of species. *BMC Genomics*, 14, 176.
- Dawson, D. A., Horsburgh, G. J., Küpper, C., Stewart, I. R. K., Ball, A. D., Durrant, K. L., et Burke, T. (2010). New methods to identify conserved microsatellite loci and develop primer sets of high cross-species utility - as demonstrated for birds. *Molecular Ecology Resources*, 10(3), 475–94.
- Del Hoyo, J., Elliott, A., Sargatal, J., Imboden, C. (1992). Handbook of the birds of the world. Volume 1. Ostrich to Ducks. Lynx Editions, Barcelona
- 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.
- Ellegren, H. (1992). Polymerase-Chain-Reaction (PCR) Analysis of Microsatellites: A New Approach to Studies of Genetic Relationships in Birds. *The Auk*, 109(4), 886–895.
- Faircloth, B. C. (2008). msatcommander: detection of microsatellite repeat arrays and automated, locus-specific primer design. *Molecular Ecology Resources*, 8(1), 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.

- Frias-Soler, R., Tindle, E., Lopez, G. E., Blomberg, S., Studer-Thiersch, A., Wink, M., & Tindle, R. (2014). Genetic and Phenotypic Evidence Supports Evolutionary Divergence of the American Flamingo (*Phoenicopterus ruber*) Population in the Galápagos Islands. *Waterbirds*, 37(4), 349–468.
- Gaisler, J., Zima, J. (2007). Zoologie obratlovců. Academia, Akademie věd České republiky, Praha.
- Gardner, M. G., Cooper, S., Bull, C., et Grant, W. (1999). Brief communication. Isolation of microsatellite loci from a social lizard, *Egernia stokesii*, using a modified enrichment procedure. *Journal of Heredity*, 90(2), 301–304.
- Glenn, T. C., et Schable, N. A. (2005). Isolating microsatellite DNA loci. *Methods in Enzymology*, 395, 202–22.
- Goldstein, D., B., et Schlötterer, Ch. (1999) Microsatellites evolution and applications. Oxford University Press, New York.
- Grosser, S., et Waters, J. M. (2015). Development and characterisation of 20 novel microsatellite markers for the little blue penguin (*Eudyptula minor*) using next-generation sequencing. *Conservation Genetics Resources*, 7(1), 143–145.
- Hamilton, M. B., Pincus, E. L., Di Fiore, A., et Fleischer, R. C. (1999). Universal linker and ligation procedures for construction of genomic DNA libraries enriched for microsatellites. *BioTechniques*, 27(3), 500–2, 504–7.
- Jarvis, E. D., Mirarab, S., Aberer, A. J., Li, B., Houde, P., Li, C., et Zhang, G. (2014). Whole-genome analyses resolve early branches in the tree of life of modern birds. *Science (New York, N.Y.)*, 346(6215), 1320–31.
- Jin, Y., Liu, S., Yuan, Z., Yang, Y., Tan, S., et Liu, Z. (2016). 4 – Catfish genomic studies: progress and perspectives. In *Genomics in Aquaculture* (pp. 73–104).
- Ju, C., Feng, Z., Brindley, P. J., McManus, D. P., Han, Z., Peng, J., et Hu, W. (2010). Our Wormy World: Genomics, Proteomics and Transcriptomics in East and Southeast Asia (pp. 327–371).
- Kang, S., Jung, J.-W., Ahn, D. H., Lee, J. E., Kim, J.-H., et Park, H. (2015). Isolation and characterization of polymorphic microsatellite loci from the chinstrap penguin, *Pygoscelis antarctica*. *Conservation Genetics Resources*, 7(2), 561–563.

- Kumar, S., Tamura, K., *et* Nei, M. (2004). MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. *Briefings in Bioinformatics*, 5(2), 150–63.
- Labuschagne, C., van Wyk, A. M., Kotzé, A., Grobler, P., *et* Dalton, D. L. (2013). Isolation and characterization of species-specific microsatellite loci in African penguin (*Spheniscus demersus*). *Conservation Genetics Resources*, 5(1), 169–171.
- Megléczy, E., Pech, N., Gilles, A., Dubut, V., Hingamp, P., Trilles, A., *et* 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(6), 1302–1313.
- Myers, P., R. Espinosa, C. S. Parr, T. Jones, G. S. Hammond, *et* T. A. Dewey. (2016). The Animal Diversity Web (online), navštíveno dne 10. 11. 2016 na <http://animaldiversity.org>
- Nicholls, J. A., Double, M. C., Rowell, D. M., *et* Magrath, R. D. (2000). The evolution of cooperative and pair breeding in thornbills *Acanthiza* (Pardalotidae). *Journal of Avian Biology*, 31(2), 165–176.
- Oliveira, E. J., Pádua, J. G., Zucchi, M. I., Vencovsky, R., *et* Vieira, M. L. C. (2006). Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. *Genetics and Molecular Biology*, 29(2), 294–307.
- Pechová, A. (2014): *Cross-species* amplifikace mikrosatelitů z řádu tučňáci a konzervovaných ptačích mikrosatelitů u nesyta indomalajského (*Mycteria leucocephala*). Bakalářská práce. Depon in: Knihovna biologických oborů PřF UPOL Olomouc.
- Perrin, C., *et* Roy, M. S. (2000). Rapid and efficient identification of microsatellite loci from the sea urchin, *Evechinus chloroticus*. *Molecular Ecology*, 9(12), 2221–3.
- Primmer, C. R., Møller, A. P., *et* Ellegren, H. (1996). A wide-range survey of cross-species microsatellite amplification in birds. *Molecular Ecology*, 5(3), 365–378.
- Prum, R. O., Berv, J. S., Dornburg, A., Field, D. J., Townsend, J. P., Lemmon, E. M., *et* Lemmon, A. R. (2015). A comprehensive phylogeny of birds (Aves) using targeted next-generation DNA sequencing. *Nature*, 526(7574), 569–73.

- Roeder, A. D., Marshall, R. K., Mitchelson, A. J., Visagathilagar, T., Ritchie, P. A., Love, D. R., et Lambert, D. M. (2001). Gene flow on the ice: genetic differentiation among Adélie penguin colonies around Antarctica. *Molecular Ecology*, 10(7), 1645–56.
- Rozen, S., et Skaletsky, H. (2000). Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 132, 365–86.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., et Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory.
- Schlosser, J. A., Garner, T. W. J., Dubach, J. M., et McElligott, A. G. (2003). Characterization of microsatellite loci in Humboldt penguin (*Spheniscus humboldti*) and cross-amplification in other penguin species. *Molecular Ecology Notes*, 3(1), 62–64.
- Schlosser, J. A., Dubach, J. M., Garner, T. W. J., Araya, B., Bernal, M., Simeone, A., Wallace, R. S. (2009). Evidence for gene flow differs from observed dispersal patterns in the Humboldt penguin, *Spheniscus humboldti*. *Conservation Genetics*, 10(4), 839–849.
- Simbley, C. G., Monroe, B. L. (1990). *Distribution and taxonomy of birds of the world*. Yale University Press, New Haven.
- Strejčková, B. (2016): *Cross-species* amplifikace mikrosatelitů z řádu trubkonosí u plameňáka karibského (*Phoenicopterus ruber*). Bakalářská práce. Depon in: Knihovna biologických oborů PřF UPOL Olomouc.
- Šťastný, K. et al. (1998): *Svět zvířat IV., Ptáci* (1). Albatros, Praha.
- Šuláková, M. (2017): *Cross-species* amplifikace mikrosatelitů z řádu tučňáci a konzervovaných ptačích mikrosatelitů u pelikána skvrnozobého (*Pelecanus philippensis*). Bakalářská práce. Depon in: Knihovna biologických oborů PřF UPOL Olomouc.
- Tautz, D., Trick, M., et Dover, G. A. (1986). Cryptic simplicity in DNA is a major source of genetic variation. *Nature*, 322(6080), 652–656.
- Tenzer, I., degli Ivanissevich, S., Morgante, M., et Gessler, C. (1999). Identification of microsatellite markers and their application to population genetics of *Venturia inaequalis*. *Phytopathology*, 89(9), 748–753.

- Torres, C. R., Ogawa, L. M., Gillingham, M. A. F., Ferrari, B., *et van* Tuinen, M. (2014). A multi-locus inference of the evolutionary diversification of extant flamingos (Phoenicopteridae). *BMC Evolutionary Biology*, *14*(1), 36.
- Tóth, G., Gáspári, Z., & Jurka, J. (2000). Microsatellites in different eukaryotic genomes: survey and analysis. *Genome Research*, *10*(7), 967–81.
- Veselovský, Z. (2001). *Obecná ornitologie*. Academia, Akademie věd České republiky, Praha.