

**Univerzita Palackého v Olomouci**

**Přírodovědecká fakulta**

**Katedra botaniky**



**Analýza a charakteristika**

**vybraných polymorfních mikrosatelitů z řádu trubkonosí**

**u pelikána bílého (*Pelecanus onocrotalus*)**

Diplomová práce

**Bc. Veronika Adámková**

Studijní program: Učitelství biologie pro střední školy, Učitelství chemie pro střední školy

Studijní obor: Biologie-Chemie

Forma studia: Prezenční

**Olomouc 2021**

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

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně během mého magisterského studia pod vedením RNDr. Petra Nádvorníka, Ph.D. za použití uvedených literárních zdrojů.

V Olomouci dne 04.08.2021

Chtěla bych poděkovat RNDr. Petru Nádvorníkovi, Ph.D. za jeho trpělivost, čas a ochotu, kterou mi poskytoval po celou dobu psaní teoretické i experimentální části mé diplomové práce.

## **Bibliografická identifikace**

**Jméno a příjmení:** Veronika Adámková

**Název práce:** Analýza a charakteristika vybraných polymorfních mikrosatelitů z řádu trubkonosí u pelikána bílého (*Pelecanus onorotalus*)

**Typ práce:** Magisterská

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

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

**Rok obhajoby:** 2021

### **Abstrakt**

Náplní mé diplomové práce bylo analyzovat a charakterizovat polymorfní mikrosatelity u pelikána bílého (*Pelecanus onocrotalus*).

V teoretické části jsem nastínila fylogenetické vztahy kladu Aequirornithes. Dále jsem se zabývala zařazením a charakteristikou pelikána bílého do systému, konkrétně jsem popsala rod pelikán a druh pelikán bílý. Poslední součástí teoretické části byla charakteristika mikrosatelitů, jejich mutace a také využití. V neposlední řadě jsem také popsala metody izolace (*de novo*, *cross-species* a *in silico*).

V experimentální části jsem využila metodu *cross-species* PCR amplifikace. K dispozici jsem měla celkem 42 mikrosatelitů, které jsem charakterizovala na 21 nepříbuzných jedincích pelikána bílého, které byly primárně navrženy pro studium variability druhů z řádu trubkonosí z čeledi albatrosovití, buňňákovití a buňňáčkovití a z řádu dlouhokřídli z čeledi kulíkovití. Celkem jsem potvrdila polymorfismus u 36 mikrosatelitů, provedla genotypizaci a charakterizovala jsem je pomocí programů Genopop a Cervus 3.0.7.

**Klíčová slova:** pelikán bílý, *Pelecanus onocrotalus*, trubkonosí, *cross-species* PCR amplifikace, mikrosatelit

**Počet stran:** 60

**Počet příloh:** 3

**Jazyk:** český

## **Bibliographic identification**

**Author's first name and surname:** Veronika Adámková

**Title of thesis:** The analysis and characterization of selected polymorphic microsatellites from order Procellariiformes in Great White Pelican (*Pelecanus onocrotalus*)

**Type of thesis:** Master

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

**Supervisor:** RNDr. Petr Nádvorník, Ph.D.

**The year of presentation:** 2021

### **Abstract**

The content of my master thesis was to analyze and characterize polymorphic microsatellites in the white pelican (*Pelecanus onocrotalus*).

I outlined phylogenetic relationships in the clade Aequorlitorornithes in the theoretic part. Furthermore, I dealt with classification and characteristics of white pelican into the system, particularly I described genus pelican and species white pelican. The last component of the theoretic part was characteristics of the microsatellites, their mutations, utilization and description of the isolation methods (*de novo*, *cross-species* and *in silico*).

I used method of cross-species PCR amplification in the experimental part. I had 42 microsatellites available which I characterized on 21 unrelated individuals of white pelican, which were primarily estimated for study of species variability from order tubinares (Procellariiformes) from family albatrosses (Diomedidae), procellariids (Procellariidae) and hydrobatides (Hydrobatidae) and from order Charadriiformes and family Charadriidae. I confirmed polymorphism in 36 microsatellites all together, I did their genotypization and I characterized them by programs Genopop and Cervus 3.0.7.

**Keywords:** Great White pelican, *Pelecanus onocrotalus*, Procellariiformes, microsatellite, cross-species PCR amplification

**Number of pages:** 60

**Number of appendices:** 3

**Language:** Czech

## Obsah

Úvod.....	7
Cíle práce .....	8
1 Literární přehled .....	9
1.1 Systematické zařazení pelikána bílého.....	9
1.2 Rod pelikán .....	10
1.3 Pelikán bílý.....	12
1.4 Mikrosatelity .....	13
1.4.1 Klasifikace mikrosatelitů.....	13
1.4.2 Mutace mikrosatelitů.....	13
1.4.3 Využití mikrosatelitů.....	14
1.4.4 Hledání mikrosatelitů .....	14
1.4.5 Mikrosatelity izolované u ptáků z řádu trubkonosí .....	15
1.4.6 Mikrosatelity izolované <i>de novo</i> u pelikánů.....	15
1.4.7 <i>Cross-species</i> PCR amplifikace u pelikánů.....	16
2 Materiál a metody.....	19
2.1 Biologický materiál.....	19
2.2 PCR amplifikace genomické DNA .....	19
2.3 Chemikálie .....	21
2.4 Roztoky .....	22
2.5 Laboratorní přístroje.....	24
2.6 Analýza PCR produktů pomocí elektroforetické separace .....	24
3 Výsledky.....	28
4 Diskuze .....	36
5 Závěr.....	44
6 Didaktická část .....	45
7 Přílohy .....	46
8 Literatura .....	53

## Úvod

Mikrosatelity jsou úseky DNA složené z tandemově se opakujících repetit, jejichž délka je v řádu jednotek nukleotidů. Mikrosatelity jsou často délkově variabilní, kdy se v populaci na jednom lokusu nachází více alel. Mají široké využití, především v genetice, kde se používají jako molekulární markery. Často u nich také dochází k mutacím. Mikrosatelity mohou být izolovány pomocí izolace *de novo*, *cross-species* nebo *in silico*.

V laboratoři populační genetiky se dlouhodobě řeší vodní ptáci kladu *Aequorlitorornithes* a hledají se pro ně *cross-species* polymorfní mikrosatelity. Tato práce bude tematicky v souladu, protože pomocí *cross-species* PCR amplifikace se budu snažit ověřit polymorfismus 42 mikrosatelitů a charakterizovat je na 21 nepříbuzných jedincích pelikána bílého.

## Cíle práce

1. Shromáždění dostupných literárních zdrojů.
2. Vypracování rešerše na téma diplomové práce.
3. Amplifikace a charakteristika vybraných polymorfních mikrosatelitních lokusů na DNA 21 nepříbuzných jedinců pelikána bílého; jedná se o mikrosatelity označené jako polymorfní v bakalářské práci Hudzieczková, A. (2019): *Cross-species* amplifikace mikrosatelitů z řádu trubkonosí u pelikána bílého (*Pelecanus onocrotalus*).



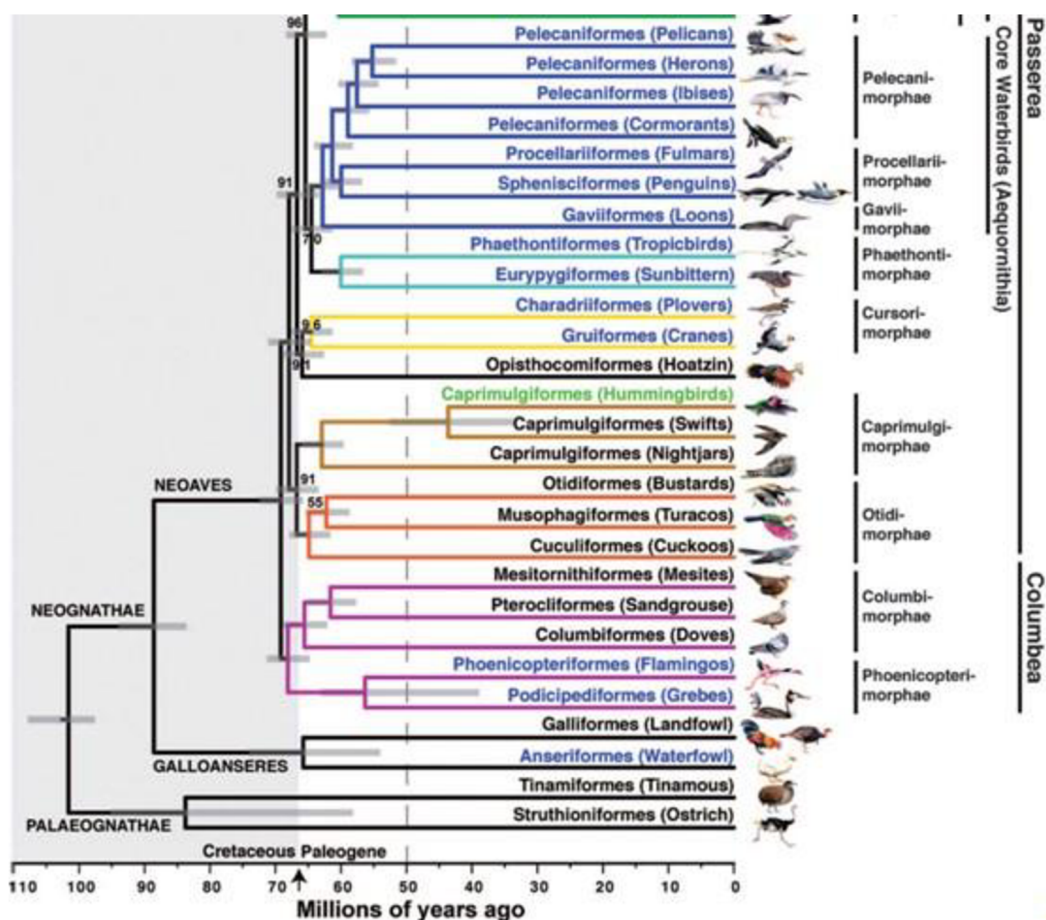
# 1 Literární přehled

## 1.1 Systematické zařazení pelikána bílého

V tradičním pojetí systému ptáků zahrnuje řád Pelecaniformes 6 čeledí vodních ptáků: terejovité (Sulidae), kormoránovité (Phalacrocoracidae), fregatkovité (Fregatidae), faetonovité (Phaetontidae), anhingovité (Anhingidae) a pelikánovité (Pelecanidae) (Nelson, 2005; Gaisler *et Zima*, 2007). Novější taxonomické revize založené na podrobnějším zkoumání a aplikaci molekulárních technik plně změnily pohled na systém a fylogenezi tohoto řádu. Nejdříve byli úplně vyjmuti faetonoví, kteří byli označeni za zcela nepříbuznou skupinu. Zbylých 5 čeledí bylo zařazeno do podřádu Pelecani. Novější studie však kromě čeledi Pelecanidae a Fregatidae řadí zbylé čeledi řádu Pelecaniformes do řádu Suliformes. Řád Pelecaniformes tvoří dnes čeleď pelikánovití, dále monotypické čeledi kladivoušovití, člunozobcoví a též jsou zde některými autory řazeny čeledi volavkoví a ibisoví (Kovalik *et al.*, 2010). Čeleď fregatkoví, byla z řádu veslonozí odstraněna a byla označena za sesterskou skupinu tučňáků. Podle metody DNA-DNA hybridizace bylo zjištěno, že nejpříbuznější jsou čeledi terejoví, kormoránoví a anhingoví. Hedges *et Sibley* (1994) z dat odvodili, že čeleď pelikánovití je nejpříbuznější k člunozobci africkému (*Balaeniceps rex*). Mayr *et al.* (2003) na základě studia jejich fylogeneze do čeledi pelikánovití kromě rodu pelikán zařadili i člunozobce afrického (*Balaeniceps rex*) a kladivouše afrického (*Scopus umbretta*).

Jarvis *et al.* (2014) na základě molekulárních dat vytvořili podobu systému ptáků, mimo jiné rozdělili Neornithes na 2 základní skupiny (Paleognathae a Neognathae). Skupina Neognathae byla rozčleněna na Galloanseres a Neoaves, která zahrnuje i pelikány. Pomocí dalších podrobných fylogenetických analýz byla skupina Neoaves dále rozdělena na 2 velké samostatné klady - Passera a Columbea. Součástí kladu Passera je i klad Aequornithia, do kterého patří právě vodní ptáci s výjimkou vrubozobých, kteří se řadí do kladu Galloanseres.

Obrázek č. 1: Fylogenetické rozdělení ptáků podle Jarvis *et al.* (2014)



Prum *et al.* (2015) ustanovili klad Aequorlitorithes, který zahrnuje 2 hlavní skupiny. Do první skupiny zařadili plameňáky (Phoenicopteriformes), dlouhokřídlé (Charadriiformes) a potápky (Podicipediformes). Do druhé skupiny zahrnují slunatce, kagu, potáplice (Gaviiformes), trubkonosé (Procellariiformes), tučňáky (Sphenisciformes), brodivé (Ciconiiformes) a veslonohé (Pelecaniformes). V rámci druhé skupiny byl původní řád veslonozí (Pelecaniformes) rozdělen na řád Pelecniiformes v užším slova smyslu, kam byla zahrnuta čeleď Pelecniidae (pelikánovití). Faetoni byli zařazeni do jedné skupiny společně se slunatcem nádherným (*Eurypyga helias*), kagu chocholatým (*Rhynochetos jubatus*). Další výraznou změnou je, že zbytek řádu Pelecniiformes vytvořil vlastní řád Suliformes zahrnující čeledě kormoránovití, anhingovití, fregatkovití a terejovití.

## 1.2 Rod pelikán

Rod pelikán (*Pelecanus*) je jediným rodem čeledi pelikánovití (Pelecanidae). Jedná se o velké vodní ptáky s příznačnou veslovací nohou, která má všechny 4 prsty

spojené pomocí plovací blány (Gaislet *et* Zima, 2007). Je pro ně charakteristický roztažitelný vak, který se nachází pod spodní čelistí a byl vytvořen jako adaptace na lov ryb. Velké kolonie pelikánů za den zkonzumují až 20 kg ryb, proto se každý den musí přemísťovat až na vzdálenost 160 km, aby nedošlo k vyčerpání zdrojů (Alderton, 1995). Kořist pelikánů může být různé velikosti, od malých ančoviček a sardinek, až po větší úlovky, jako je kapr, okoun či štika (Winkler *et al.*, 2015). Do vaku mohou nabrat vodu, která může mít objem až okolo 14 l. Vak často pelikáni používají, kdy se jeho roztažením a pulzací ochlazují (Šťastný *et al.*, 1998).

Opeření bývá po většinu času bílé barvy, často s šedými nebo růžovými skvrnami, kromě pelikána hnědého. Mladí jedinci jsou nenápadného zbarvení, oproti dospělcům. Pelikáni mají dlouhý krk, který jim umožňuje položení si velkého zobáku na prsa. Nohy jsou krátké a jsou umístěny daleko od sebe, v zadní části těla, aby mohly sloužit jako účinná pádla (del Hoyo *et al.*, 1992). Ryby chytají většinou v koloniích a mají při tom křídla zdvižená nad vodní hladinu (Alderton, 1995). Vzlet z vodní hladiny je díky jejich hmotnosti obtížný a vyžaduje spoustu úsilí. Potřebují taktéž i velký prostor, aby mohli vzlétnout. Rozběhnou se po vodní hladině, zatímco současně mávají křídly a kopou nohama, dokud se jim nepodaří vzlétnout (del Hoyo *et al.*, 1992).

Je známo celkem 8 druhů pelikánů – pelikán bílý (*Pelecanus onocrotalus*), p. hnědý (*P. occidentalis*), p. africký (*P. rufescens*), p. australský (*P. conspicillatus*), p. kadeřavý (*P. crispus*), p. skvrnozobý (*P. philippensis*), p. severoamerický (*P. erythrorhynchos*) a p. chilský (*P. thagus*). Vyskytují se v široké škále vodních prostředí, ať už se jedná o otevřené oceány, slaná jezera, močály, řeky a jejich delty. Preferují mělké vody, zejména kvůli jejich stylu lovu ryb (del Hoyo *et al.*, 1992). Pelikáni a kormoráni mohou během roku měnit stanoviště, mohou tedy střídat prostředí se sladkou a slanou vodou (Winkler *et al.*, 2015).

Hnízdí na zemi i na stromech, hnízda si často stavějí z větví (Gosler, 1994). Na začátku páření se jejich peří zbarvuje pestrými barvami, a tím může dojít k odlišení pohlaví (del Hoyo *et al.*, 1992). Pohlavní dospělosti dosahují pelikáni až po několika letech (3–5 letech). Jedná se o jedince, kteří se dožívají vysokého věku (15–25 let), v zajetí se můžou dožít až 54 let (Hanzák *et* Hudec, 1974, Šťastný *et al.*, 1998).

### 1.3 Pelikán bílý

Pelikán bílý (*Pelecanus onocrotalus*) je středně velký vodní pták, který je často velikostně připodobňován k labuti (Bouchner, 1989). Délka nataženého těla se pohybuje okolo 140 až 160 cm a jeho hmotnost může být až 11 kg. Pelikán bílý je velice dobrý letec a plachtař. Křídla jsou dlouhá a široká, jejich rozpětí je od 2 do 2,8 m (Gosler, 1994). Dospělí jedinci mají bílé zbarvení peří, občas s nádechem do růžova, jen konce křídel mají tmavě hnědě až černě zbarvené. Zobák mají zářivě žlutý, je zakončený červeně zbarvenou špičkou. Mláďata jsou nejprve růžově zbarvená a nahá, následně se jejich tělo pokrývá hustým hnědým peřím (Brown *et al.*, 1982). Od ostatních druhů pelikánů se pelikán bílý liší červeně zbarvenýma nohama (Hanzák *et Hudec*, 1974).

Potravu pelikánů tvoří především ryby, které mohou dosahovat hmotnosti až 600 g. Dokáží pojmout větší ryby než pelikán africký, pokud jsou k dispozici, tak tvoří až 90 % jeho jídelníčku (Brown *et al.*, 1982). Největším úlovkem pelikána byl kapr, který vážil 1850 g (Šťastný *et al.*, 1998).

V době páření mají samec i samice malou chocholku v oblasti týla a peří má růžový nádech (Gosler, 1994). Hnízdí často v roztroušených koloniích, které mohou mít až 3000 párů. Kolonie se nacházejí na méně dostupných místech, především kvůli ochraně před predátory. Velikost hnízda je přiměřená tělu pelikánů a je postaveno z rákosí, které sbírá samec, samice hnízdo staví (Brown *et al.*, 1982). Na vejcích sedí samice i samec, který ji vystřídá pouze v případě, kdy se samice potřebuje nasytit. Samice usedá na první vejce a druhé snáší až po čtrnácti dnech, proto bývají mláďata z jednoho hnízda odlišného stáří. Obvyklá doba sezení na vejcích je až 6 týdnů. Mívá 2–4 vejce, která jsou namodralá a mají vápenitou skořápku (Bouchner, 1989). Mláďata se líhnou po 33 dnech, jsou nidikolní a krmena dvakrát denně (Hanzák *et Hudec*, 1974).

Pelikán bílý se vyskytuje v okolí alkalických a sladkovodních jezer, zřídka i u mořského pobřeží (Brown *et al.*, 1982). Rozšíření pelikána bílého je od jihovýchodní Evropy (Rumunsko a Bulharsko) až po Mongolsko, dále pak Afrika jižně od Sahary, severozápad Indie nebo jižní Vietnam (Hanzák *et Hudec*, 1974, Šťastný *et al.*, 1998).

## 1.4 Mikrosatelity

Mikrosatelity jsou určité úseky DNA se speciální strukturou, kde se bezprostředně za sebou opakují několikanukleotidové sekvence, s různou délkou párů bází. Jsou známé jako SSRs (Simple Sequence Repeats) nebo STRs (Short Tandem Repeats). Jejich rozložení není stejnoměrné, ale vyskytují se v kódujících i nekódujících oblastech DNA, téměř u všech prokaryotních i eukaryotních organismů (Tóth *et al.*, 2000; Zane *et al.*, 2002; Oliveira *et al.*, 2006). Mikrosatelity jsou rozprostřeny po celém genomu a délka jejich repetice se může lišit. Různí autoři uvádějí různá čísla, 2–8 bp nebo 1–5 bp (Zane *et al.*, 2002; Kantartzi 2013). Jsou využívány především při studiu evolučních vztahů nebo při určení příbuznosti jako genetické markery (Zane *et al.*, 2002).

### 1.4.1 Klasifikace mikrosatelitů

Podle Tóth *et al.* (2000) se mikrosatelity rozdělují na základě délky jejich základní jednotky na mono-, di-, tri-, tetra- až polynukleotidové repetice. Bylo zjištěno, že repetice poly (A/T) u všech taxonů vyskytují více než repetice poly (C/G). Mezi nejčastěji zastoupené repetice patří trinukleotidové a hexanukleotidové mikrosatelity (Oliveira *et al.*, 2006).

Další rozdělení mikrosatelitů uvádějí ve své práci Oliveira *et al.* (2006), kteří je rozdělují podle typu opakování na 4 skupiny: dokonalé, nedokonalé, přerušované a složené. Dokonalé mikrosatelity nemají opakovanou sekvenci základního motivu přerušovanou žádnou bází (např. TATATATATATATA). Od nich se odlišující nedokonalé mikrosatelity, které mají vloženou bázi, která přerušuje jejich základní sekvenci (např. TATATACTATATA). U přerušovaných mikrosatelitů je do základního motivu vložena sekvence bází, která danému motivu neodpovídá (např. TATATACGTGTATATATATA). Složené mikrosatelity jsou tvořeny dvěma různými jednotkami repetice, které spolu sousedí (např. TATATATATAGTGTGTGTGT).

### 1.4.2 Mutace mikrosatelitů

Mutace mikrosatelitů jsou častější u mikrosatelitů s větším počtem repetitivních jednotek, jsou relativně nestabilní a jejich četnost se pohybuje od  $10^{-2}$  do  $10^{-6}$  nukleotidů na jednu generaci (Goldstein *et Schlötterer*, 1999). Mechanismus, který je zodpovědný za mutaci mikrosatelitů, je popisován jako sklouznutí DNA

polymerázy při replikaci (DNA replication slippage) (Schlötterer, 2000). Princip sklouznutí DNA polymerázy při DNA replikaci spočívá v prozatímním odloučení řetězců DNA a v jiném místě dochází k jejich opětovnému spárování do dvoušroubovice. Takto dochází k posunu báží a nově vznikající vlákno se tak prodlužuje nebo zkracuje (Olivier *et al.*, 2006).

U lidí mohou mutace trinukleotidových mikrosatelitů způsobovat neurodegenerativní autozomálně dominantní dědičné onemocnění, Huntingtnovu chorobu. Toto onemocnění je způsobeno zmožením opakování tripletů CAG (Tóth *et al.*, 2000).

### 1.4.3 Využití mikrosatelitů

Díky jednoduché PCR amplifikace se z mikrosatelitů staly oblíbené genetické markery, které mají široké uplatnění v genetice (Schlötterer, 2000) a používají se především ke studiu vnitrodruhových vztahů (např. příslušnosti k poddruhu či geograficky oddělené populaci), ale i k určení příbuznosti mezi jednotlivými jedinci (Vieira *et al.*, 2016). Hlavním nedostatkem mikrosatelitů je i to, že od druhů, které jsem zkoumány poprvé, musí nejdříve proběhnout izolace *de novo*. Protože se mikrosatelity nacházejí především v nekódujících oblastech genomu, je obtížné navrhnout univerzální primery (Zane *et al.*, 2002).

### 1.4.4 Hledání mikrosatelitů

Izolace mikrosatelitů může být provedena pomocí různých metod. Mezi základní 3 metody izolace patří metoda *de novo*, *cross-species* PCR amplifikace a *in silico* (Zane *et al.*, 2002; Dawson *et al.*, 2010).

Izolace *de novo* se využívá při zkoumání druhů, které jsou předmětem zájmu poprvé. Problém je, že v nekódujících oblastech genomu se mikrosatelity nacházejí ve větší míře, než v kódujících oblastech v důsledku toho je velice obtížné navrhnout tzv. univerzální primery. Izolace mikrosatelitních lokusů metodou *de novo* je složena z několika kroků. Nejprve dojde k izolaci DNA zkoumaného druhu a k vytvoření knihovny. V další fázi přichází na řadu sekvenování, následně pak navrhování primerů, optimalizace podmínek PCR amplifikace a nakonec ověření polymorfismu na nepříbuzných jedincích. Tato metoda je však velmi časově náročná, proto jsou navrhovány nové alternativní metody, které by čas izolace mohly zkrátit (Zane *et al.*, 2002).

Jednotlivé alely mohou být rozlišeny díky gelové elektroforetické separaci. Homozygotní lokus je typický tím, že má obě alely stejné, zatímco lokus heterozygotní obsahuje jiný počet repetice na každé alele (Oliviera *et al.*, 2006). Pomocí metody *cross-species* PCR amplifikace lze u druhů, které jsou si blízce příbuzné, využít PCR primery jednoho druhu ke zjištění polymorfismu u druhu druhého (Moore *et al.*, 1991). *Cross-species* PCR amplifikace, která využívá dříve navržené primery pro jiné druhy, které jsou spolu v těsném příbuzenském vztahu. Často úspěšnost PCR amplifikace zvyšuje fylogenetická blízkost zdrojového a cílového druhu. S rostoucí fylogenetickou vzdáleností mezi zdrojovým a testovaným druhem klesá úspěšnost *cross-species* PCR amplifikace, kterou lze také ovlivnit například snížením teploty annealingu (Primmer *et al.*, 1996, Primmer *et al.*, 2005).

Metoda *in silico* je nejnovější metoda, která se dá využít pro nalezení mikrosatelitů. Jedná se o rychlejší a levnější formu izolace, a proto postupně vytlačuje metodu *de novo*. Princip spočívá v průzkumu databází sekvencí DNA pomocí programů (Dawson *et al.*, 2010, Dawson *et al.*, 2013). Příkladem mohou být programy MISA (MIroSATellite), Tandem-Repeats Finder či TROLL (Tandem Repeats Occurent Locator) (Sharma *et al.*, 2007).

#### **1.4.5 Mikrosatelity izolované u ptáků z řádu trubkonosí**

Řád trubkonosí (Procellariiformes) se dělí do 4 čeledí. Jsou to čeledi albatrosovití (Diomedidae), buňňákovití (Procellariidae), buňňáčkovití (Hydrobatidae) a buňňíkovití (Pelecanoididae). V Laboratoři populační genetiky na Katedře buněčné biologie a genetiky PřF Univerzity Palackého v Olomouci bylo celkem studováno 213 mikrosatelitních lokusů, z nichž 207 pochází od 3 čeledí řádu trubkonosých (albatrosovití, buňňákovití a buňňáčkovití), 5 od zástupců z řádu dlouhokřídlí a 1 z řádu pěvci. V laboratoři nejsou k dispozici žádné mikrosatelity od poslední čeledě buňňíkovitých.

#### **1.4.6 Mikrosatelity izolované *de novo* u pelikánů**

Pomocí izolace mikrosatelitů *de novo* bylo nalezeno celkem 10 mikrosatelitních lokusů, které jsou známé od dvou druhů pelikánů.

U pelikána severoamerického bylo celkem testováno 25 párů primerů, z nichž 9 mikrosatelitních lokusů (PeEr 01–09) bylo polymorfních u 23 jedinců. Nejdříve

byla provedena extrakce DNA a poté byly navrženy primery, které byly následně použity pro PCR amplifikaci. Autoři u polymorfních mikrosatelitů našli od 2 do 8 alel (Hickman *et al.*, 2008).

U pelikána bílého bylo izolováno 10 mikrosatelitních lokusů (PEL086, PEL149, PEL175, PEL185, PEL188, PEL190, PEL207, PEL221, PEL265 a PEL304). Pro PCR amplifikaci byly navrženy primery a následně byly testovány u 46 jedinců, kteří pocházeli ze dvou populací. 23 jedinců pocházelo z oblasti Jihoafrické republiky a 23 jedinců bylo z Namibie. Počet alel se pohyboval v rozmezí od 2 do 19 na lokus. Nesoulad s Hardy-Weinbergovou rovnováhou vykazovaly dva mikrosatelitní lokusy (PEL185 a PEL221) (De Ponte Machado *et al.*, 2009).

#### **1.4.7 Cross-species PCR amplifikace u pelikánů**

De Ponte Machado *et al.* (2009) našli celkem 10 mikrosatelitních lokusů u tří druhů pelikánů a u všech tří vykazovaly polymorfismus. U pelikána afrického se jednalo o jednoho jedince, u pelikána hnědého o pět jedinců a u pelikána severoamerického o dva jedince. Dva mikrosatelity z deseti (PEL086 a PEL185) u pelikána afrického nebyly úspěšně amplifikovány. Ostatní mikrosatelitní lokusy poskytly produkty s 1–7 alelami na lokus.

Populace pelikána severoamerického byla zkoumána z hlediska genetické struktury. Celkem bylo prostudováno 10 mikrosatelitních lokusů, z nichž 7 mikrosatelitů (PeEr01, PeEr02, PeEr03, PeEr04, PeEr06, PeEr08 a PeEr09) bylo izolováno od pelikána severoamerického (Hickman *et al.*, 2008) a zbylé 3 mikrosatelity (PEL086, PEL149 a PEL304) byly získány od pelikána bílého (de Ponte Machado *et al.*, 2009). PCR amplifikace byla provedena celkem na 333 jedincích, kteří pocházeli z 19 různých kolonií. U pelikána severoamerického se počet alel pohyboval v rozmezí od 4 do 13 na lokus a počet alel u pelikána bílého byl v rozmezí od 7 do 19 (Reudink *et al.*, 2011).

Jeyasingham *et al.* (2013) se zabývali výzkumem genového toku u pelikána chilského. Testovali celkem 7 mikrosatelitních lokusů izolovaných od pelikána severoamerického a bílého na 83 jedincích. Lokusy PeEr02, PeEr03, PeEr05, PeEr07 a PeEr09 byly izolovány od pelikána severoamerického (Hickman *et al.*, 2008) a zbylé dva lokusy pocházely od pelikána bílého (PEL149 a PEL185) (de



Ponte Machado *et al.*, 2009). Počet alel se pohyboval v rozmezí od 4 do 26 na lokus, v průměru bylo nalezeno 12 alel na lokus. Autoři našli nulové alely u lokusu PeEr05.

Laboratoř populační genetiky na Katedře buněčné biologie a genetiky Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého v Olomouci se v bakalářských a diplomových pracech věnuje *cross-species* PCR amplifikaci u vybraných druhů velkých vodních ptáků. V přehledu uvádím pouze ty, které se věnovaly pelikánu bílému.

Buržáková (2011) pomocí *cross-species* PCR amplifikace ve své bakalářské práci testovala celkem 137 mikrosatelitních lokusů u pelikána bílého a pelikána skvrnozobého. Páry primerů byly odvozeny pro amplifikaci mikrosatelitů příbuzných druhů ptáků z řádu veslonozí, plameňáci, brodiví a vrubozobí. Celkem našla 20 polymorfních mikrosatelitů, z nichž jeden byl nehodnotitelný kvůli velkému počtu *stutter* bandů. 13 polymorfních mikrosatelitů pocházelo z řádu veslonozí, 3 polymorfní mikrosatelity z řádu brodiví a z řádu plameňáci našla 4 polymorfní mikrosatelity.

Bartoňková (2013) se ve své diplomové práci zabývala *cross-species* PCR amplifikací u pelikána bílého a pelikána skvrnozobého. K PCR amplifikaci použila 82 párů primerů, které amplifikují 84 polymorfních lokusů u pelikána bílého a 18 polymorfních lokusů u pelikána skvrnozobého. Testovala lokusy, které byly prohlášeny za polymorfní u různých druhů pelikánů a v diplomových pracech Ranochová (2008) a Mikulová (2010) a v bakalářské práci Buržáková (2011). Celkem u pelikána bílého našla 10 polymorfních mikrosatelitů, které charakterizovala na 21 nepříbuzných jedincích.

Kremlová (2019) ve své bakalářské práci testovala pomocí *cross-species* PCR amplifikace 173 párů primerů na 6 nepříbuzných jedincích pelikána bílého. 113 párů primerů bylo navrženo pro amplifikaci u 9 druhů tučňáků, 36 párů primerů pro EST ptačí mikrosatelity a 24 párů primerů pro konzervované ptačí mikrosatelity. Celkem našla 35 polymorfních mikrosatelitů, z nichž 18 bylo od 7 druhů tučňáků, 10 polymorfních EST ptačích mikrosatelitů a zbylých 7 konzervovaných ptačích mikrosatelitů. Výzkumem polymorfismu se zabývala i ve své diplomové práci (Kremlová, 2021). Pomocí *cross-species* PCR amplifikace mikrosatelitů, které

označila za polymorfní ve své bakalářské práci (Kremlová, 2019), zjistila, že ne všechny mikrosatelity, které označila jako polymorfní ve své bakalářské práci skutečně vykazují polymorfismus. Celkem potvrdila 32 párů primerů, které amplifikovaly celkem 34 polymorfních lokusů, z nichž 17 párů primerů bylo navrženo pro amplifikaci mikrosatelitů pocházejících z řádu tučňáci a 15 párů primerů bylo navrženo pro amplifikaci univerzálních ptačích mikrosatelitů.

Hudzieczková (2019) se ve své bakalářské práci zabývala hledáním polymorfních mikrosatelitů u pelikána bílého pomocí *cross-species* PCR amplifikace. Na 213 párech primerů (207 z řádu trubkonosí, 5 z řádu dlouhokřídli a 1 z řádu pěvci) našla celkem 47 polymorfních produktů, které byly amplifikovány na 46 párech primerů (Dc5 poskytoval 2 produkty). 46 párů primerů, které amplifikovaly polymorfní PCR produkt, budu testovat v praktické části své diplomové práce. Přesný soupis čeledi, zdrojového druhu, příslušných mikrosatelitů, včetně literárního zdroje je v Tabulce č. 2 v kapitole Materiál a metody.

## 2 Materiál a metody

### 2.1 Biologický materiál

Zoologické zahrady Dvůr Králové, Jihlava a Liberec poskytly biologický materiál pro praktickou část mé diplomové práce. Krev byla odebrána 21 nepříbuzným jedincům pelikána bílého (*Pelecanus onocrotalus*) z tarzální žíly dolní končetiny. DNA byla vyizolována pomocí fenol-chloroformové metody mým vedoucím práce, naředěna v TE pufru, spektrofotometricky změřena její koncentrace a naředěna pro PCR v koncentraci 10–20 µg/ml.

### 2.2 PCR amplifikace genomické DNA

PCR amplifikace byla provedena na 21 nepříbuzných jedincích pelikána bílého. K testování bylo použito celkem 42 párů primerů. V Tabulce č. 1 je uvedeno složení reakční směsi, které bylo připraveno pro 21 vzorků každého páru primerů.

1. Každá složka PCR mixu byla napřed ponechána při laboratorní teplotě, aby rozmrzla a následně byla zvortexována a zcentrifugována. Do 1,5ml mikrozkušavky byly napipetovány jednotlivé složky PCR mixu podle Tabulky č. 1 a poté znovu zvortexovány a zcentrifugovány.

**Tabulka č. 1:** Složení PCR reakční směsi pro 21 vzorků.

Složení PCR mixu	Objem [µl]
Deionizovaná voda	177,6
Reakční pufr (10x)	26,8
Roztok MgCl <sub>2</sub> (25 mmol/l)	16,0
Roztok dNTPs (20 mmol/l)	2,8
Primer R (10 µmol/l)	13,2
Primer F (10µmol/l)	13,2
<i>aTaq</i> DNA polymeráza (5U/µl)	6,0

2. Do každé z připravených 0,2ml mikrozkušavek bylo napipetováno po 1µl genomické DNA a následně 9 µl PCR reakční směsi.
3. Uzavřené mikrozkušavky byly vloženy do termocykleru, kde podle teplotního a časového rozpisu probíhá reakce podle schématu č. 1.

**Schéma č. 1:** Časový a teplotní profil PCR reakce.

1. 94 °C ... 5 minut
  2. 94 °C ... 30 s
  - T<sub>A</sub> °C ... 30 s
  - 72 °C ... 30 s
  3. 72 °C ... 7 min
- } 35 cyklů

Jako teplota annealingu (T<sub>A</sub>) byla použita finální teplota, která byla uvedena v bakalářské práci Anety Hudzieczkové (2019).

**Tabulka č. 2:** Seznam 42 mikrosatelitních lokusů od druhů z řádu trubkonosí, které byly označeny jako polymorfní u pelikána bílého v bakalářské práci Hudzieczková (2019). V případě problematického produktu byla teplota snižována nebo zvyšována, viz. Tabulka č. 3 v kapitole Výsledky.

Čeľad'	Zdrojový druh	Mikrosatelity	Literární zdroj
albatrosovití (Diomedidae)	albatros stěhovavý ( <i>Diomedea exulans</i> )	7D8, 11H1	Dubois <i>et al.</i> , 2005
	albatros šedohlavý ( <i>D. chrysostoma</i> )	Dc5, Dc31	Burg, 1999
	albatros šedohlavý, albatros stěhovavý	D24	
	albatros černobrvý ( <i>T. melanophris</i> ), albatros šedohlavý	De35	Burg <i>et</i> Croxall, 2001
	albatros černonohý ( <i>Phoebastria nigripes</i> )	BFAL4	Hernandez <i>et</i> <i>al.</i> , 2014
	albatros laysanský ( <i>P. immutabilis</i> )	LAAL19	
buřňákovití (Procellariidae)	buřňák bělobradý ( <i>P. aequinoctialis</i> )	Paequ2, Paequ3, Paequ8	Techow <i>et</i> O'Ryan, 2004
	buřňák taiko ( <i>Pterodroma magentae</i> )	Tch6	Lawrence, 2008
	buřňák trinidatský ( <i>P. arminjoniana</i> )	Parm02	Brown <i>et</i> Jordan, 2009
	buřňák havajský ( <i>P. sadwicensis</i> )	Ptero04, Ptero06, Ptero09	Welch <i>et</i> Fleischer, 2011
	buřňák šedý ( <i>Calonectris diomedea</i> )	Cd1, Cd2, Cd3, Cd4, Cd5, Cd6	Bried <i>et al.</i> , 2008
	buřňák světlonohý ( <i>Puffinus carneipes</i> )	Pc B109	Hardesty <i>et al.</i> , 2013

**Tabulka č. 2:** Pokračování.

<b>Čeleď</b>	<b>Zdrojový druh</b>	<b>Mikrosatelity</b>	<b>Literární zdroj</b>
buňňákovití (Procellariidae)	<b>buňňák baleárský</b> ( <i>P. mauretanicus</i> )	Puff 1.5	Gonzalez <i>et al.</i> , 2009
	<b>buňňák útlozobý</b> ( <i>Pachyptila</i> <i>belcheri</i> )	Patbel2, Patbel3, Patbel6, Pacbel_08867, Pacbel_10895, Pacbel_15327	Quillfeldt <i>et al.</i> , 2012  Moodley <i>et al.</i> , 2015
buňňáčkovití (Hydrobatidae)	<b>buňňáček</b> <b>dlouhokřídlý</b> ( <i>Oceanodroma</i> <i>leucorhoa</i> )	Ole01, Ole09, Ole13, Ole19, Ole25, Ole26	Bicknell <i>et al.</i> , 2011
	<b>buňňáček</b> <b>madeirský</b> ( <i>O. castro</i> )	Oc28B, Oc79, Oc84	Sun <i>et al.</i> , 2009
	<b>buňňáček</b> <b>Monteirův</b> ( <i>O. monteiroi</i> )	Omn3, Omn8	Bried <i>et al.</i> , 2012 a Andris <i>et al.</i> , 2012
kulíkovití (Charadriidae)	<b>kulík mořský</b> ( <i>Charadrius</i> <i>alexandrius</i> )	Calex-01	Brown <i>et Jordan</i> , 2009

## 2.3 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 - Na<sub>2</sub>EDTA (Lachner)
- Formaldehyd (Lachner)
- Formamid (Lachner)
- Hydroxid sodný (Lachner)
- Chlorid sodný (Lachema)
- Kyselina boritá (Lachner)
- Kyselina dusičná 65% roztok (Lachner)
- Kyselina octová (Lachner)

- Močovina (Lachner)
- N, N' - methylenbisakrylamid (Serva)
- N, N, N', N' - tetramethylethyldiamin - TEMED (Serva)
- Peroxodisíran amonný (Serva)
- Rain-off - tekuté stěrače (Sheran)
- Thiosíran sodný (Lachema)
- Trishydroxymethylaminomethan - Tris (AppliChem)
- Uhličitan sodný (Lachner)
- Xylenová modř - Xylenecyanol FF (AppliChem)
- 3-methakryloxypropyltrimethoxysilan (Serva)

## 2.4 Roztoky

1. Akrylamid, 6% zásobní roztok
  - 150 ml 40% zásobního roztoku - akrylamid: N, N'-methylenbisakrylamid (19 : 1)
  - 420 g močoviny
  - 50 ml 10x TBE
  - 484 ml deionizované vody
  - po rozpuštění všech složek zfiltrovat a uložit v temné láhvi v chladničce
2. Dusičnan stříbrný, 0,1% roztok
  - 0,8 g dusičnanu stříbrného
  - 800 ml deionizované vody
  - před použitím přidat 1,2 ml formaldehydu
3. Fix/stop roztok
  - 800 ml deionizované vody
  - 88 ml ledové kyseliny octové
4. Hydroxid sodný, 1mol/dm<sup>3</sup> roztok
  - 40 g hydroxidu sodného
  - deionizovanou vodou doplnit do 1 l
5. Kyselina dusičná, 1% roztok
  - 12 ml 65% kyseliny dusičné
  - 800 ml deionizované vody
6. Roztok 3-metakryloxypropyltrimetoxysilanu
  - 1 ml 0,5% kyseliny octové v 96% etanolu

- 3  $\mu$ l 3-methakryloxypropyltrimethoxysilanu
- 7. Nanášecí pufr pro polyakrylamidové gely
  - 0,125 g xylenové modře
  - 0,125 g bromfenolové modře
  - 100 ml formamidu
  - 25 ml deionizované vody
- 8. Peroxodisíran amonný, 10% roztok
  - 1 g peroxodisíranu amonného
  - 10 ml deionizované vody
  - rozpustit ve vodě a roztok uchovávat v chladničce
- 9. Polyakrylamidový gel, 6% roztok
  - 60 ml 6% zásobního roztoku akrylamidu
  - 400  $\mu$ l 10% roztoku peroxodisíranu amonného
  - 40  $\mu$ l N, N, N', N'- tetramethylethyldiaminu
  - 25 ml deionizované vody
- 10. Reakční pufr pro *Taq* DNA polymerázu, 10x
  - 80 ml deionizované vody
  - 1,211 g Tris
  - upravit pH pomocí HCl na hodnotu 9
  - 3,73 g KCl
  - 1 ml Triton X-100
  - po rozpuštění doplnit na 100 ml
- 11. TBE pufr, 10x zásobní roztok
  - 55 g kyseliny borité
  - 108 g trishydroxymethylaminomethanu (Tris)
  - 40 ml roztoku Na<sub>2</sub>EDTA 0,5 mol/l, pH 8,0
  - doplnit do 1 l deionizovanou vodou
- 12. Vývojka
  - 24 g uhličitanu sodného
  - 800 ml deionizované vody
  - vychladit na teplotu nižší než 10 °C
  - před použitím přidat 1,2 ml formaldehydu a 160  $\mu$ l roztoku thiosíranu sodného

## 2.5 Laboratorní přístroje

- Elektroforetický zdroj EV232 (Consort)
- Hybridizační pec HB-2D (Techne)
- Chladnička kombinovaná (Whirlpool)
- Laboratorní váhy Mark S622 (BEL Engineering)
- Magnetická míchačka MR Hei-Combi (Heidolph)
- Mikropipety Finnpiquette 0,5–10  $\mu$ l (osmikanálová) 0,3  $\mu$ l–1 ml (jednokanálové) (Thermo Labsystem)
- Mikropipety Nichipet EX 0,5  $\mu$ l–1 ml (Nichiryo)
- Minicentrifuga CLE CSQSP (Clever Scientific)
- Minicentrifuga Prism mini (Labnet International)
- Negatoskop NEGA (Maneko)
- Sekvenční elektroforetická komůrka S2 (Whatman Biometra)
- Sušárna CAT 8050 (Contherm)
- Termocykler GenePro (BIOER Technology)
- Termocykler PTC 100-96 VHB (MJ Research)
- Termocykler TC XP (BIOER Technology)
- Třepačka Orbit 1 900 (Labnet International)
- Vortex mixer (Labnet International)
- Vortex MS2 (Ika)
- Výrobník deionizované a ultračisté vody typ 01 (AquaOsmotic)
- Výrobník ledu Ice Flaker (Brema IceMakers)

## 2.6 Analýza PCR produktů pomocí elektroforetické separace

Následující postup elektroforetické separace probíhá za denaturujících podmínek. Využívá sekvenační elektroforetické komůrky S2 (Whatman Biometra) s rozměrem velkého skla 330 x 420 mm a malého skla 330 x 390 mm. Za použití 6% polyakrylamidového gelu, jehož tloušťka byla 0,4 mm.

1. Plochy velkého i malého skla, které se budou dotýkat gelu řádně umýt pomocí saponátu a kartáčku pod tekoucí vodou. Dále obě skla opláchnout deionizovanou vodou a osušit je ubrouskem.



2. Na plochu velkého skla nanést přípravek na odpuzování vody Rain off (tekuté stěrače), rozetřít pomocí ubrousku a nechat chvíli zaschnout. Po zaschnutí je zapotřebí velké sklo ošetřit znova deionizovanou vodou ze stříčky a zase usušit.
3. Plochu malého skla, která se bude dotýkat gelu je zapotřebí nejprve 2x umýt deionizovanou vodou, následně usušit a poté 2x opláchnout 96% etanolem. Poté je nutné na sklo nanést roztok 3-metakryloxypropyltrimetoxysilanu, důkladně rozetřít po celé ploše skla, nechat 5 minut zaschnout a dále sklo 4x ošetřit 96% etanolem.
4. Velké sklo přenést na nachystanou polystyrenovou desku do digestoře ošetřenou plochou vzhůru. Po jeho stranách umístit 2 spacers, jejichž tloušťka je 0,4 mm. Na spacers na velkém skle přiložit malé sklo ošetřenou plochou směrem dolů a urovnat spacers tak, aby přiléhaly ke kratší straně malého skla. Na delší straně skla upevnit pomocí 4 klipsů.
5. Do kádinky si nachystat 6% polyakrylamidový gel. Roztok je zapotřebí obezřetně promíchat krouživými pohyby a následně ho pomalu za pomoci poklepávání na sklo nalévat mezi skla, aby nedošlo ke vzniku bublin.
6. Až bude prostor mezi skly vyplněn gelem, je třeba zasunout připravený hřebínek rovnou stranou do gelu asi 5 mm. Obě skla zafixovat pomocí 4 klipsů a nechat gel po dobu 60 minut polymerizovat.
7. Po uplynutí doby, která je zapotřebí, aby došlo k polymerizaci gelu, oddělat všechny klipsy a opláchnout pod tekoucí vodou ve výlevce, aby byly odstraněny nežádoucí zbytky gelu. Malé sklo je zapotřebí osušit dosucha papírovými ubrousky a upevnit do elektroforetické komůrky pomocí šroubů.
8. Do katodového i anodového prostoru je třeba nalít dostatečné množství 0,5x TBE pufu. V dalším kroku je nutné vyjmout hřebínek a prostor, který jeho vyjmutím vznikl, důkladně pomocí injekční stříkačky promýt. Uzavřít oba prostory víkem, připojit elektrody ke zdroji stejnosměrného elektrického proudu a gel ponechat po dobu 30 minut nahřívat. Podmínky nahřívání nastavit na 90 W, proud na hodnotu 150 mA a napětí na hodnotu 3000 V.
9. Během nahřívání gelu si připravit mikrozkušavky s PCR vzorky. Ke každému vzorku přidat 5  $\mu$ l nanášecího pufu a vložit je na 3 minuty do termocykleru, kde dojde k denaturaci při 96 °C. Po skončení denaturace vzorky přenést do připravené polystyrenové nádoby s ledem.

10. Po nahřátí gelu vypnout zdroj stejnosměrného elektrického proudu a odpojit elektrody. Pomocí injekční stříkačky opatrně vyčistit prostor mezi skly proudem 0,5x TBE pufru a následně do tohoto prostoru zasunout hřebínek tak, aby zoubky směřovaly asi 1 mm do gelu. Poté pomocí osmikanálové pipety nanést vzorky o objemu 2 $\mu$ l do prostor mezi zoubky hřebínku.
11. Po nanesení všech vzorků, uzavřít katodový prostor, připojit elektrody a zdroj. Parametry nastavit na výkon 70 W a hodnoty elektrického proudu a napětí nechat na maximum (150 mA a 3000 V). Doba elektroforetické separace je různá, závisí na počtu nukleotidů řetězce (90–180 minut).
12. Během separace si nachystat příslušné roztoky (roztok fix/stop, 1% roztok HNO<sub>3</sub> a vývojkou, kterou je zapotřebí umístit do chladničky).
13. Po skončení elektroforetické separace odpojit zdroj stejnosměrného proudu, elektrody a vypustit pufr z katodového prostoru. Povolit šrouby, vyjmout skla a položit je na podložku, aby malé sklo bylo směrem vzhůru. Poté opatrně vytáhnout spacery a pomocí nože od sebe skla odlepit.
14. Malé sklo vložit do fotomisky gelem nahoru, umístit ho na třepačku a zalít roztokem fix/stopu, ten nechat působit po dobu 20 minut. Po uplynutí doby roztok slít zpět do baňky a sklo s gelem 3x propláchnout deionizovanou vodou.
15. Fotomisku umístit zpět na třepačku a sklo s gelem zalít 1% roztokem HNO<sub>3</sub>, který bude působit 4 minuty. Poté roztok vylít a sklo s gelem promýt 4x deionizovanou vodou.
16. Následně sklo s gelem umístit do misky, která je určena na roztok dusičnanu stříbrného a umístit ji na třepačku. Do roztoku 0,1% AgNO<sub>3</sub> přidat 1200  $\mu$ l formaldehydu, vzniklý roztok nalít na sklo s gelem a nechat působit po dobu půl hodiny. Během toho je zapotřebí si připravit misku s deionizovanou vodou.
17. Po uplynutí 30 minut roztok AgNO<sub>3</sub> slít zpět do zásobní lahve. Po skončení reakce sklo s gelem vložit na 5 vteřin do misky s deionizovanou vodou. Poté ho přenést do čisté fotomisky a zalít vývojkou z chladničky, do které je nutno před použitím přidat 1200  $\mu$ l formaldehydu a 160  $\mu$ l 1% thiosíranu sodného.
18. Postupně bude docházet k vyvíjení obarvených bandů, které budou mít hnědočernou barvu. Až budou bandy dostatečně viditelné, zalít gel fix/stop roztokem a tím dojde k zastavení vyvíjení.

19. Po 2 minutách působení fix/stopu, roztok slít do odpadu a sklo s gelem následně umístit do misky s deionizovanou vodou. Poté sklo s gelem vložit do sušárny po dobu 30 minut a 90 °C.
20. Po usušení gel vložit gel na negatoskop, kde je za pomoci vedoucího práce hodnocen a následně byl proveden sken jednotlivých gelů, které jsou poté vloženy do roztoku NaOH, jehož koncentrace je 1 mol/dm<sup>3</sup>. Pro další použití je nutno sklo řádně umýt vodou, saponátem a opláchnout deionizovanou vodou. Takto očištěné sklo je možno opakovaně použít.

### 3 Výsledky

V experimentální části diplomové práce jsem se zabývala *cross-species* PCR amplifikací mikrosatelitů, které byly označeny za polymorfní u pelikána bílého (*Pelecanus onocrotalus*) v bakalářské práci Anety Hudzieczkové (Hudzieczková, 2019). Ta našla celkem 42 párů primerů, které poskytovaly 43 polymorfních lokusů (mikrosatelit Dc5 poskytl dva polymorfní produkty). 8 polymorfních mikrosatelitů pocházelo od zástupců z čeledi albatrosovití, 22 od zástupců z čeledi buňňákovití, 11 mikrosatelitů od druhů z čeledi buňňáčkovití a 1 z řádu dlouhokřídlí, který byl popsán u kulíka mořského. PCR amplifikaci provedla na 6 nepříbuzných jedincích pelikána bílého.

Všechny mikrosatelity jsem amplifikovala při teplotě *annealingu* ( $T_A$ ), která byla označena jako finální u jednotlivých polymorfních mikrosatelitů v bakalářské práci Hudzieczkové (2019). Při PCR amplifikaci bylo nutné u některých mikrosatelitů upravit finální teplotu, délku separace či koncentraci hořčnatých iontů, protože mikrosatelity neposkytovaly dobře hodnotitelné produkty. Snížením původní koncentrace hořčnatých iontů, respektive snížením objemu roztoku  $MgCl_2$ , který jsem pipetovala do PCR mixu. U páru primerů pro amplifikaci mikrosatelitů Ole25 jsem koncentraci (objem) hořčnatých iontů snížila na  $\frac{3}{4}$ . Finální teploty byly v rozmezí od 48 do 67 °C. Nejkratší elektroforetická separace byla 90 minut, naopak nejdelší 180 minut.

Při PCR amplifikaci u 21 nepříbuzných jedinců pelikána bílého nakonec poskytlo pouze 36 mikrosatelitů celkem 37 produktů, u kterých bylo detekováno od 2 do 7 alel. U mikrosatelitu Oc28B byla nalezena 2 místa polymorfismu. Z dalších experimentů byly vyřazeny mikrosatelity: Cd2 byl mylně označen jako monomorfní a další (Dc5, Paequ2, Cd4, Ptero06 a Ole13) byly polymorfní, ale byly nezřetelné a problematicky hodnotitelné, což bylo zapříčiněno výskytem PCR artefaktů, *stutter* bandů a mutacemi v oblastech nasedání primerů. Nebo to, co bylo na 6 nepříbuzných jedincích považováno za mikrosatelitovou variabilitu, odpovídá pravděpodobně jiným sekvencím genomu. Souhrn všech polymorfních mikrosatelitů uvádím v Tabulce č. 3.

**Tabulka č. 3:** Charakteristika 36 polymorfních mikrosatelitů, které byly charakterizovány na 21 nepříbuzných jedincích pelikána bílého. V tabulce je uveden název lokusu, zdrojový druh, jednotka repetice, sekvence primerů, počet alel (N), teplota annealingu  $T_A$  [°C], délka elektroforetické separace (ELFO), případná odchylka od Hardy–Weinbergovy rovnováhy (HW) a jako poslední frekvence výskytu nulových alel (F).

Název lokusu (GenBank)	Zdroj	Jednotka repetice	Sekvence primerů (5'→3')	N	$T_A$ [°C]	ELFO [min]	HW	F
<b>7D8</b> (AY945757)	Albatros stěhovavý	GA	F: CACGCTGCACTTTGTGATTT R: ACACGGTTTGATTCCTCTGC	2	62	120	ND	-
<b>11H1</b> (AY945752)		GT/GA	F: ACCGGAGCACCAAAATACCT R: CCGGTATTGACCCAGAGAGA	2	62	90	ND	-
<b>D24</b> (AF096804)	Albatros stěhovavý a šedohlavý	CA	F: AGCCTGCTTTTGATGGAAGC R: CACTCTATTTTTCCTCCAGCTGA	3	65	90	NS	-
<b>De31</b> (AF096810)	Albatros šedohlavý	GC/AN/AC/AG	F: CTGACTCTCTGGGATGAGCC R: GTACCCCTGGAAAGCCAGAC	4	61	90	NS	0,2447
<b>De35</b> (nevedeno)	Albatros černobrvý a šedohlavý	nevedeno	F: CAAACCTGAAACCTTCCAAAAC R: CCCCTGTTTCTACTCTGGTC	2	55	90	ND	-
<b>BFAL4</b> (nevedeno)	Albatros černonohý	TC	F: TGGGTCAGTTTACCTCTCAGC R: GTTTGCCATTTTAAACTGTCATTGGC	2	63	90	***	0,9994
<b>LAAL19</b> (nevedeno)	Albatros laysanský	ATCC	F: ATGACCAGTGCCATCAACAG R: TGGCCAGATGTGATTTGAAG	6	63	90	NS	0,0580
<b>Cd1</b> (EU029083)	Buňák šedý	TG/TC	F: CAAGCAGTCAGAACTCTGTG R: TGAGTTTGCCCTACATGAAC	5	64	90	NS	-

Tabulka č. 3: Pokračování 1.

Název lokusu (GenBank)	Zdroj	Jednotka repetice	Sekvence primerů (5'→3')	N	T <sub>A</sub> [°C]	ELFO [min]	HW	F
<b>Cd3</b> (EU029085)	Buňák šedý	GT/CT	F: TTGCCTCTTTTACAGGACTGC R: TCCCTGTGGCTAAGGATCTG	4	58	90	NS	0,0294
<b>Cd5</b> (EU029087)		GT/AT	F: CTGCACAGACTGAGAGTATAAGATTC R: GGCTTAAAGGGTAAATACACATGG	2	63	90	NS	-
<b>Cd6</b> (EU029088)		AC	F: GAGAGGAAAAAGCGTTAGGG R: TGCTGCAGTTACTGATTGGA	2	58	90	NS	0,5426
<b>Puff 1.5</b> (EU158894)	Buňák baleárský	GT	F: AGGCAGCAACATAGTCAC R: GCACTGATAAGGGAACTT	2	55	90	ND	0,2857
<b>Ptero04</b> (HQ918221)	Buňák havajský	CA	F: TGCATTGTTTCTGTCCAAACTC R: GGCTGGAATGCATAGTACCAAC	3	60	90	NS	0,1662
<b>Ptero09</b> (HQ918226)		AAGG	F: GCAAATACCAGTCTTCCAAAGG R: TTTAAGATAAAGATGTTTGAGAACCAC	4	61	120	NS	0,1172
<b>Omn8</b> (JQ303232)	Buňáček Monteurův	AC	F: TGCAACCTTAGCATTACCTAGC R: GGGGCGAGCATTACATTTAA	7	62	90	NS	-
<b>Omn3</b> (JQ303228)		AC/GT	F: GCGCTTGAAAGGGTGAAGTA R: TCCCATCTGAGATTTAAGGAAGA	4	60	180	NS	0,2267
<b>Patbel2</b> (JF288776)	Buňák útlozobý	CTAT	F: GGTGTCATGCAACTGACTGAA R: CAATGGGAATGGCAGAGACT	5	65	90	NS	0,0345
<b>Patbel3</b> (JF288777)		CTAT	F: CCTTCCCTAGAGCAATGGAG R: TGCACACACTGAAAGAGGACA	7	62	90	ND	0,0421

Tabulka č. 3: Pokračování 2.

Název lokusu (GenBank)	Zdroj	Jednotka repetice	Sekvence primerů (5'→3')	N	T <sub>A</sub> [°C]	ELFO [min]	HW	F
<b>Patbel6</b> (JF288790)	Buřňák útlozobý	CTAT	F: TGAGTGGGTGGAATTGAACA R: AATGGTTTGGGCACACTTCT	2	55	90	ND	-
<b>Pacbel_08867</b> (neuveдено)		GA	F: TTTGGTCAATTTCCCTCGC R: ACAGAAAACCAATGTTGTTAATAGG	3	55	90	ND	-
<b>Pacbel_10895</b> (neuveдено)		AC/AT	F: AGCTTTCTGTCTGGTAGCAC R: TGCTCCTGCCTAAGCTACG	2	48	90	ND	-
<b>Pacbel_15527</b> (neuveдено)		CA	F: TTCTTGTAGCAGTAGGAGACC R: ACCTCATGTGTAACCTGCC	3	55	90	ND	-
<b>Tch6</b> (neuveдено)	Buřňák taiko	GT/GC	F: GTTTCTTGGTGGTGGCTGAAGGTGTATG R: GCCATTTGAGAATGTTTCAGC	3	51	90	NS	0,2495
<b>Ole01</b> (FR696377)	Buřňáček dlouhokřídlý	ACAG	F: CACCCTGAATCCCAGAACCAAGC R: TCAGTGAAGGTCCACTCCGAATCC	3	58	90	ND	-
<b>Ole19</b> (FR696395)		GA/CA	F: GAAGGCTCTCAAGGGTCAAG R: TTTGGGAGAAGTTCAGTAGAAGAAC	2	60	90	ND	0,3205
<b>Ole09</b> (FR696385)		CA	F: GGCCTGGATTCTGCGTGTTGGG R: CAGCTACAGGCCACGGGTGC	2	66	90	ND	0,8973
<b>Ole25</b> (FR696401)		AGAT/ GAAA	F: CCTCCTCATCGTAGGGACTG R: TTAAAGGCAGCGATTCTGTTC	7	57	180	NS	0,3907
<b>Ole26</b> (FR696402)		TG	F: TCAGCTTCTGGTGCAGTTATG R: TCCTGCTGATGGATAGGTTATG	3	48	90	***	0,6086

Tabulka č. 3: Pokračování 3.

Název lokusu (GenBank)	Zdroj	Jednotka repetic	Sekvence primerů (5'→3')	N	T <sub>A</sub> [°C]	ELFO [min]	HW	F
<b>Oc79</b> (FJ238102)	Buřňáček madeirský	AC	F: TATTCCTGGCCATGTTTTCC R: GCTTCCTTTGTTTCAGTTTAGA	2	54	90	NS	0,1064
<b>Oc84</b> (FJ238103)		AG	F: CCTTTTTCCAGGCAGACAAA R: AGTTCAAGGGCAACCTTGTTG	3	58	90	NS	-
<b>Oc28B</b> (FJ238097)		TG	F: GCGTTGACCAGCAAATAGTC R: GGAAGGCTACCACAATTTCA	4	54	90	NS	0,0345
<b>Calex-01</b> (AM072445)	Kulík mořský	GT/GA/GC	F: CTTCTCCATTGTTGTCACCTCCAGT R: CTTGACTTGGCCTGGGTTTAGGTT	3	67	180	ND	0,0151
<b>Parm02</b> (EU360818)	Buřňák trinidadský	CA	F: AGCAAGCTGACAGCAACAGA R: TGTTATGTCCTGCGGATGAG	4	63	120	NS	0,0773
<b>Pc B109</b> (JX435475)	Buřňák světlonohý	CAA	F: CTCAGAGCGATCACACTGTACT R: AAAGCATTTCAGGATGTAGGTTTC	3	60	120	NS	0,0015
<b>Paequ3</b> (AY371071)	Buřňák bělobradý	GA	F: TGTGGGTGCAGTAGAGCA R: CAATAAGAAGATCAGCAGAACAGAC	4	62	180	NS	-
<b>Paequ8</b> (AY371074)		CA	F: TATTCTGAGACTTGCGTTATCC R: GTGATCCATTAGTTGATGTCTACTG	2	60	120	NS	-

**Legenda:**

ND - lokus nelze vyhodnotit, zda je v souladu s Hardy-Weinbergovou rovnováhou

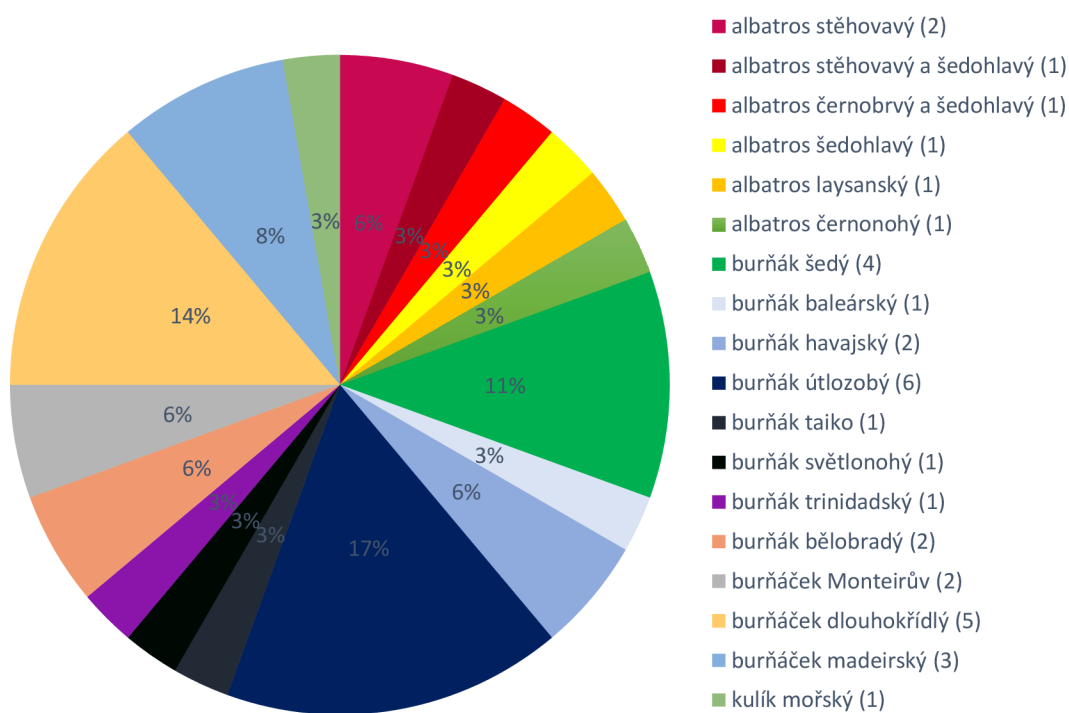
NS - lokus je v souladu s Hardy-Weinbergovou rovnováhou

\*\*\* - signifikantní odchylka od Hardy-Weinbergovy rovnováhy na hladině významnosti 0,1 %



Z 213 testovaných párů primerů pochází celkem 208 od trubkonosých a 1 od kulíka mořského z řádu dlouhokřídli. Z čeledi albatrosovitých pocházelo 53 mikrosatelitů, nakonec jich mám polymorfních 7, což odpovídá 3,4 %. Z čeledi buřňakovití 100 mikrosatelitů, z nichž nakonec polymorfních bylo 18 (8,7 %), z čeledi buřňáčkovití 54 mikrosatelitů, z nichž polymorfních nakonec bylo 10 (4,8 %). Souhrn všech polymorfních mikrosatelitů u pelikána bílého uvádím v Grafu č. 1.

**Graf č. 1:** Rozdělení 36 polymorfních mikrosatelitů u pelikána bílého na základě zdrojového druhu. V závorce je uveden počet polymorfních lokusů, které byly od daného druhu polymorfní.



Amplifikací 36 párů primerů jsem našla 37 polymorfních produktů, které vykazovaly od 2 do 7 alel. Celkově jsem měla 14 dvoualelových lokusů (tj. 38,9 %), 10 tříalelových (tj. 27,7 %), 7 čtyřalelových (tj. 19,4 %), jeden pětialelový (tj. 2,7 %), 2 šestialelové (tj. 5,56 %) a 3 sedmialelové (tj. 8,3 %).

Na základě analýzy mikrosatelitů pomocí programu Genopop (Rousset, 2008) jsem prokázala, že mezi žádnou dvojicí lokusů není vazba a všechny jsou navzájem

nezávislými markery. Potenciálně několik lokusů je vázáno na pohlaví, ale mají nízký počet alel, proto by testování muselo proběhnout na větším počtu jedinců. Pomocí programu Cervus 3.0.7 (Kalinowski *et al.*, 2007) bylo vypočítáno, že na lokus připadalo v průměru 3,351 alely a průměrná očekávaná heterozygotnost byla 0,4641. Součástí analýzy byla dále vypočítána pravděpodobnost, že by bylo mládě chybně přiřazeno k prvnímu rodiči, v případě, že jsou oba rodiče neznámí, ta činila 0,00265. Dále pravděpodobnost chybného zařazení k druhému rodiči, v případě, že je už první rodič známý činila 0,00000984, pravděpodobnost, že bude mládě chybně přiřazeno k rodičovskému páru byla  $3,48 \cdot 10^{-9}$ . Pravděpodobnost výskytu dvou jedinců, kteří by měli stejný genotyp na všech lokusech, byla  $7,88 \cdot 10^{-19}$  a pravděpodobnost, že dvě náhodně vybraná mláďata by měla stejný genotyp na všech lokusech, byla  $6,994 \cdot 10^{-19}$ .

Nejenom charakteristika z hlediska statistiky, ale i to jak se mikrosatelity lépe či hůře hodnotí je důležitá vlastnost. Mezi špatně hodnotitelné mikrosatelity patřily např. Cd4, Paequ2 a Ole13. Dobře hodnotitelné a viditelné byly mikrosatelity Paequ8, Oc79 a Cd1. Na Obrázcích č. 2, 3 a 4 jsou zobrazeny výřezy gelů těchto mikrosatelitů, které byly vygenotypovány na 21 nepříbuzných jedincích pelikána bílého.

**Obrázek č. 2:** Elektroforetogram dvoualelového lokusu Paequ8 u 21 nepříbuzných jedinců pelikána bílého. Teplota *annealingu* byla 60 °C a elektroforetická separace probíhala po dobu 120 minut. Jednotlivé alely jsou vyznačeny šipkami.



**Obrázek č. 3:** Elektroforetogram dvoualelového lokusu Oc79 u 21 nepříbuzných jedinců pelikána bílého. Teplota *annealingu* byla 54 °C a elektroforetická separace probíhala po dobu 90 minut. Jednotlivé alely jsou vyznačeny šipkami.



**Obrázek č. 4:** Elektroforetogram šestialelového lokus Cd1 u 21 nepříbuzných jedinců pelikána bílého. Teplota *annealingu* byla 64 °C a elektroforetická separace probíhala po dobu 90 minut. Jednotlivé alely jsou vyznačeny šípkami.



## 4 Diskuze

V této diplomové práci jsem se snažila charakterizovat a genotypovat 42 polymorfních mikrosatelitů na 21 nepříbuzných jedincích pelikána bílého (*Pelecanus onocrotalus*), které vybrala v bakalářské práci Hudzieczková (2019). Nakonec jsem polymorfismus potvrdila pouze u 36 párů primerů, které tvoří 37 polymorfních produktů a ty jsem vygenotypovala. 35 párů primerů pocházelo primárně od druhů z řádu trubkonosí, jeden od kulíka mořského z řádu dlouhokřídli (Calex-01). Při charakterizování jsem vyřadila mikrosatelity Dc5, Paequ2, Cd4, Ole13 a Ptero06, protože jejich produkty byly nehodnotitelné a Cd2, který vůbec neposkytl polymorfní produkt.

Z čeledi albatrosovití jsem charakterizovala a genotypovala 7 mikrosatelitů. 7D8 a 11H1 od a. stěhovavého (*Diomedea exulans*), Dc31 od a. šedohlavého (*D. chrysostoma*), D24 od a. stěhovavého a šedohlavého, De35 od a. černobrvého (*Thalassarche melanophris*), BFAL4 od a. černonohého (*Phoebastria nigripes*) a LAAL19 od a. laysanského (*P. immutabilis*).

Dubois *et al.* (2005) našli celkem 10 polymorfních mikrosatelitních lokusů u albatrosa stěhovavého, mezi které patří i lokusy 7D8 a 11H1. Při teplotě *annealingu* 58 °C našli u těchto dvou mikrosatelitů po 2 alelách. Já jsem při amplifikaci u pelikána bílého našla stejně jako autoři při teplotě *annealingu* 58 °C 2 alely.

Albatrosem stěhovavým a šedohlavým se zabývala Burg (1999), která izolovala 26 mikrosatelitů od těchto druhů. Použila dvě různé teploty *annealingu* ( $T_A$ ).  $T_{A1}$  zvolila pro prvních 7 cyklů a  $T_{A2}$  pro dalších 25 cyklů. Lokus D24 mi poskytl při teplotě *annealingu* 65 °C 3 alely. Autorka při  $T_{A1}$  48 °C a  $T_{A2}$  52 °C získala monomorfní produkt. U lokusu Dc31 získala při stejných podmínkách opět monomorfní produkt. V mé diplomové práci jsem u tohoto lokusu našla celkem 4 alely při  $T_A$  61 °C.

Burg *et Croxall* (2001) popsali mikrosatelity u albatrosa černobrvého a šedohlavého. Pomocí *cross-species* PCR amplifikace autoři u lokusu De35 objevili při  $T_{A1}$  48 °C a  $T_{A2}$  52 °C 12 alel. Já jsem při teplotě *annealingu* 57 °C našla 2 alely.

Hernandez *et al.* (2014) charakterizovali pro albatrosy bělohřbeté, černonohé a laysanské celkem 15 mikrosatelitních lokusů. Já jsem polymorfismus potvrdila u dvou mikrosatelitů. Autoři u lokusu BFAL4 amplifikovali DNA 36 jedinců albatrosa černonohého a 12 jedinců a. laysanského, použili teplotu *annealingu* 60 °C a detekovali u obou 8 alel. Já jsem při  $T_A$  63 °C našla 2 alely, zatímco u lokusu LAAL19 s teplotou *annealingu* 63 °C jsem detekovala celkem 6 alel jako autoři u obou výše zmíněných druhů, kteří měli  $T_A$  60 °C.

Osmnáct polymorfních mikrosatelitů pocházelo od druhů čeledi buřňákovití. Celkem 6 od buřňáka útlozobého (*Pachyptila belcheri*) (Patbel2, Patbel3, Patbel6, Pacbel\_08867, Pacbel\_10895, Pacbel\_15327) 4 pro b. šedého (*Calonectris diomedea*) (Cd1, Cd3, Cd5 a Cd6) po 2 od b. bělobradého (*Procellaria aequinoctialis*) (Paequ3, Paequ8) a b. havajského (*Pterodroma sandwichensis*) (Ptero04, Ptero09) a po jednom mikrosatelitu od b. taiko (*P. magentae*) (Tch6), b. trinidadského (*P. arminjoniana*) (Parm02), b. baleárského (*Puffinus mauretanicus*) (Puff 1.5) a b. světlonohého (*P. carneipes*) (Pc B109).

U buřňáka bělobradého Techow *et O'Ryan* (2004) našli 6 mikrosatelitů. Lokus Paequ3, který jsem charakterizovala na 21 nepříbuzných jedincích pelikána bílého, poskytoval 4 alely při teplotě *annealingu* 62 °C. Autoři ho amplifikovali při  $T_A$  55 °C na 93 jedincích a našli 9 alel. Polymorfismus vykazoval i lokus Paequ8, který amplifikací při  $T_A$  58 °C měl 3 alely. Já jsem ho pomocí *cross-species* PCR amplifikace charakterizovala při teplotě *annealingu* 60 °C a jeho produkt měl 2 alely.

Lawrence (2008) popsala mikrosatelitní lokusy izolované od buřňáka taiko. Mikrosatelit Tch6, který amplifikovala při teplotě *annealingu* 52 °C, měl dvě alely. Já jsem u tohoto lokusu našla 3 alely při teplotě *annealingu* 51 °C.

Bried *et al.* (2008) izolovali 11 mikrosatelitních lokusů, které byly odvozeny od buřňáka šedého. Polymorfismus vykazovaly u 21 nepříbuzných jedinců pelikána bílého 4 mikrosatelity. Autoři měli pro všechny lokusy stejné podmínky, a to  $T_A$  58 °C a testovali je na 43 jedincích. Mikrosatelit Cd1 jim poskytl 5 alel, stejně jako mně při teplotě *annealingu* 64 °C. Amplifikací lokusu Cd3 autoři našli 3 alely a já při stejné teplotě 4 alely. Po dvou alelách jsem našla u lokusu Cd5 při  $T_A$  63 °C a u lokusu Cd6 při  $T_A$  58 °C. Autoři u lokusu Cd5 našli 6 alel a u Cd6 5 alel.

Brown *et al.* (2009) ve své studii popsali pro buňáka trinidadského 6 lokusů, které vykazovaly polymorfismus. Na 21 nepříbuzných jedincích pelikána bílého byl polymorfni pouze lokus Parm02. Podmínky optimalizace byly zvoleny tak, že teplota *annealingu* byla 63 °C a produkt poskytoval celkem 4 alely. Autoři u stejného lokusu našli též 4 alely s teplotou *annealingu* 55 °C. Počet jedinců ale neuvádějí.

Buňákem baleárským, od kterého izolovali 10 mikrosatelitních lokusů, se zabývali Gonzalez *et al.* (2009). V mé diplomové práci polymorfismus vykazoval pouze jediný a to Puff1.5, u kterého jsem našla 2 alely při  $T_A$  55 °C. Autoři testování prováděli na 54 jedincích při teplotě *annealingu* 54 °C a našli shodný počet alel.

Welch *et al.* (2011) charakterizovali 10 mikrosatelitních lokusů od buňáka havajského. V mé práci byly za polymorfni prokázány pouze dva. Lokus Ptero04, který autoři pomocí PCR amplifikace testovali na 40 jedincích, poskytl při  $T_A$  53 °C 8 alel. Já jsem u pelikána bílého na 21 nepříbuzných jedincích našla 3 alely, které odpovídaly teplotě *annealingu* 60 °C. Autoři označili za polymorfni i mikrosatelit Ptero09, který měl při  $T_A$  48 °C 2 alely. Já jsem našla celkem 4 alely při  $T_A$  61 °C.

Hardesty *et al.* (2013) popsali 11 mikrosatelitů, které testovali na 84 jedincích buňáka světlonohého. Při amplifikaci u pelikána bílého vykazoval polymorfismus pouze jeden lokus, Pc B109, který při teplotě *annealingu* 60 °C měl 3 alely. Autoři měli  $T_A$  57 °C a detekovali 5 alel.

Buňákem útlozobým se zabývali Quilfeldt *et al.* (2012) a izolovali celkem 7 mikrosatelitních lokusů na 68 jedincích. V mé diplomové práci jsem polymorfismus prokázala u 3 z nich. Lokus Patbel2, u kterého jsem při  $T_A$  65 °C našla 5 alel, dále Patbel3 při teplotě *annealingu* 62 °C, u kterého jsem detekovala 7 alel a u lokusu Patbel6 jsem měla  $T_A$  55 °C a 2 alely.

Moodley *et al.* (2015) navrhli 25 mikrosatelitů pro buňáka útlozobého. Podmínky PCR reakce byly u všech stejné a  $T_A$  byla 56 °C. Testování prováděli na celkem 77 jedincích. Ve své diplomové práci jsem polymorfismus detekovala u 3 z nich. U Pacbel\_08867 a Pacbel\_15327 byly nalezeny 3 alely s teplotou

*annealingu* u obou 55 °C. Autoři použili  $T_A$  55 °C a detekovali 8 alel u každého. U lokusu Pacbel\_10895 byla použita teplota *annealingu* 48 °C a detekovala jsem celkem 2 alely. Moodley *et al.* (2015) našli u 75 jedinců 19 alel.

Dalších 11 mikrosatelitů bylo izolováno od druhů čeledi buňňáčkovití, kde se nakonec polymorfismus prokázal u 10 z nich. Ole01, Ole09, Ole19, Ole25 a Ole26 pocházely od buňňáčka dlouhokřídleho (*Oceanodroma leucorhoa*), Oc28B, Oc79 a Oc84 od b. madeirského (*O. castro*) a Omn3 a Omn8 od b. Monteirova (*O. monteiroi*).

Studiem buňňáčka dlouhokřídleho se zabývali Bickenell *et al.* (2011) a našli 26 mikrosatelitů. Testování prováděli na 23 jedincích a teplotu *annealingu* zvolili 60 °C. Já jsem polymorfismus prokázala u 4 z nich. Na lokusech Ole01 a Ole26 jsem pomocí *cross-species* PCR amplifikace detekovala celkem 3 alely, přičemž  $T_A$  u prvního byla 58 °C, zatímco u druhého 48 °C. Autoři u obou zmíněných mikrosatelitních lokusů našli po 2 alelách. Dvě alely jsem objevila u Ole09 a Ole19. Podmínky *annealingu* byly pro Ole09 66 °C a pro Ole19 60 °C. U lokusu Ole25 jsem detekovala 7 alel stejně jako Bickenell *et al.* (2011) při teplotě *annealingu* 57 °C s  $\frac{3}{4}$  koncentrací hořčnatých iontů, ale z důvodu toho, že byl problematicky hodnotitelný, tak nebylo možné určit genotyp u jednoho jedince pelikána bílého.

Devět mikrosatelitů charakterizovali Sun *et al.* (2009) u buňňáčka madeirského. Jako teplotu amplifikace zvolili 50 °C. V mé diplomové práci jsem polymorfismus zjistila pouze u 3 z výše zmíněných. Lokus Oc28B měl 3 alely, autoři jej testovali na 27 jedincích buňňáčka madeirského a 22 jedincích buňňáčka Monteirova. Já jsem u tohoto lokusu identifikovala 2 místa polymorfismu s výskytem 4 alel u prvního místa 2 alel u druhého místa polymorfismu a teplotou *annealingu* 54 °C. 2 alely jsem také našla u mikrosatelitu Oc79, kdy jsem zvolila teplotu *annealingu* stejnou jako u lokusu Oc28B. Stejný počet alel u tohoto lokusu našli i autoři. Polymorfni byl také lokus Oc84, u kterého autoři detekovali 3 alely. Já jsem u pelikána bílého na 21 nepříbuzných jedincích při  $T_A$  58 °C detekovala stejný počet alel jako autoři.

Bried *et al.* (2012) popsali u buňňáčka Monteirova dohromady 18 mikrosatelitních lokusů, které testovali na 125 jedincích. Ve všech případech měli

teplotu *annealingu* 58 °C. Amplifikací lokusu Omn3 jsem při  $T_A$  60 °C detekovala 4 alely, autoři 6. Lokus Omn8 měl u pelikána bílého největší počet alel, celkově 7, které jsem detekovala při teplotě *annealingu* 61 °C. Bried *et al.* (2012) našli u lokusu Omn8 celkem 10 alel.

Od řádu dlouhokřídlí z čeledě kulíkovití, konkrétně od kulíka mořského, byl polymorfni pouze jeden mikrosatelit, Calex-01. Testováním tohoto lokusu Brown *et Jordan* (2009) objevili při  $T_A$  55 °C 4 alely. Já jsem našla 3 alely a jako teplotu *annealingu* jsem zvolila 67 °C.

Laboratoř populační genetiky na Katedře buněčné biologie a genetiky Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého v Olomouci se specializuje hlavně na testování mikrosatelitů, které pochází z kladu Aequorlitorornithes pomocí metody *cross-species* PCR amplifikace. V diplomových pracech byly charakterizovány mikrosatelity od trubkonosých celkem u 6 druhů ptáků z tohoto kladu - potápka roháč (Janušová, 2017), nesyť indomalajský (Nedvěďová, 2015), plameňák karibský (Strejčková, 2018), plameňák růžový (Zlochová, 2019), pelikán kadeřavý (Verešová, 2020) a pelikán africký (Kopečná, 2020).

Janušová (2017) se zabývala analýzou polymorfni mikrosatelitů od trubkonosých u potápky roháče (*Podiceps cristatus*) pomocí *cross-species* PCR amplifikace. Svůj výzkum prováděla na 13 nepříbuzných jedincích. Celkem vygenotypovala 42 polymorfni mikrosatelitů, které obsahovaly od 2 do 12 alel na lokus. U pelikána bílého vykazovaly polymorfismus pouze 4 z nich.

Nedvěďová (2015) testovala polymorfismus u nesyt indomalajského (*Mycteria leucocephala*) na 6 nepříbuzných jedincích. U tohoto druhu našla dohromady 46 polymorfni, přesněji řečeno 45 originálních, z důvodu toho, že 2 polymorfni mikrosatelity byly ve skutečnosti jeden lokus, který byl amplifikován dvěma různými páry primerů. Dohromady 14 lokusů vykazovalo polymorfismus i u pelikána bílého.

Polymorfismem u plameňáka karibského (*Phoenicopterus ruber*) se ve své diplomové práci zabývala Strejčková (2018). Pomocí metody *cross-species* PCR amplifikace analyzovala polymorfni mikrosatelity u 30 nepříbuzných jedinců plameňáka karibského. K dispozici měla 50 párů primerů, z nichž polymorfismus



vykazovalo 44, a našla od 2 do 11 alel. U 21 nepříbuzných jedinců pelikána bílého bylo polymorfních celkem 12 z nich.

Zlochová (2019) testovala *cross-species* PCR amplifikací polymorfismus u 22 nepříbuzných jedinců plameňáka růžového (*Phoenicopterus roseus*). U 43 polymorfních lokusů našla 44 polymorfních oblastí, z nichž 13 vykazovalo polymorfismus i u pelikána bílého.

Kopečná (2020) prováděla analýzu metodou *cross-species* PCR amplifikace na 12 nepříbuzných jedincích pelikána afrického (*Pelecanus rufescens*). Charakterizovala 36 mikrosatelitů a polymorfismus prokázala u 34 z nich, u kterých detekovala od 2 do 5 alel na lokus. Já při svém testování u pelikána bílého měla polymorfních 10 z nich.

Verešová (2020) charakterizovala 11 polymorfních mikrosatelitních lokusů na 41 jedincích pelikána kadeřavého (*Pelecanus crispus*). Jenom 5 lokusů (BFAL4, Cd1, Ole25, Paequ2 a Calex-01) vykazovalo polymorfismus i u pelikána bílého.

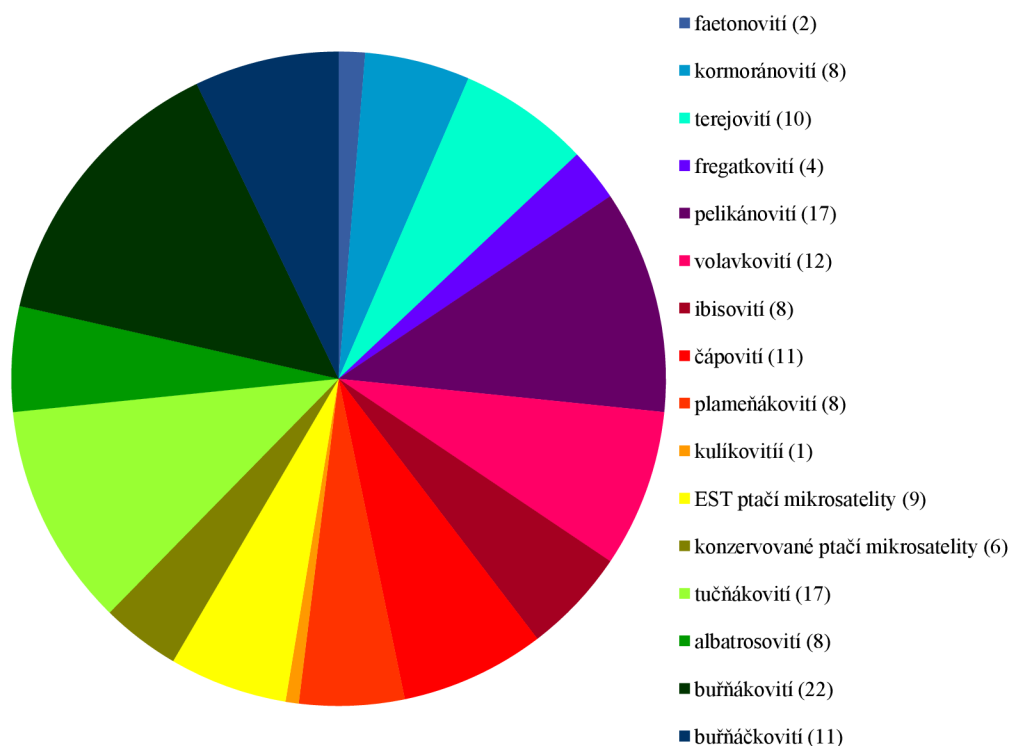
V Tabulce č. 4 jsou uvedeny mikrosatelity, které byly polymorfní u pelikána bílého a u zároveň u ptáků, kteří jsou uvedeni výše. Ze shora dolů jsou mikrosatelity seřazeny od největšího společného překryvu polymorfismu až po nejméně zastoupené. V Tabulce neuvádím mikrosatelity (7D8, 11H1, D24, De35, Cd6, Puff1.5, Ptero04, Patbel6, Pacbel\_08867, Pacbel\_10895, Ole01, Ole19 a Oc84) protože byly polymorfní pouze u pelikána bílého, ale u žádného z dále uváděných druhů. Jednotlivé druhy ptáků jsou uspořádány zleva doprava tak, že nejdříve je mnou testovaný pelikán bílý a následuje druh, který s ním sdílel nejvíce společných polymorfních mikrosatelitů až po druh, který s ním sdílel nejméně polymorfních mikrosatelitů.

**Tabulka č. 4:** Porovnání mikrosatelitních lokusů, které byly testované v této práci a vykazovaly polymorfismus u pelikána bílého s dalšími 6 druhy vodních ptáků z kladu Aequorlitornithes. V tabulce je uveden název lokusu, dále testovaný druh a počet alel. V případě, že byl daný lokus monomorfní, je označen písmenem M. V závorce je uveden počet charakterizovaných jedinců.

Lokus	Druh						
	Pelikán bílý (21)	Nesyt indomalajský (6)	Plameňák růžový (22)	Plameňák karibský (30)	Pelikán africký (12)	Pelikán kadeřavý (41)	Potápka roháč (13)
<b>BFAL4</b>	2	2	2	2	2	2	M
<b>Omn8</b>	7	4	5	3	3	M	9
<b>Dc31</b>	4	M	2	3	M	2	M
<b>Paequ3</b>	4	2	4	2	3	M	M
<b>Tch6</b>	3	3	4	M	M	M	4
<b>Cd5</b>	2	M	2	2	2	M	M
<b>Patbel2</b>	5	5	M	M	2	M	5
<b>Ole09</b>	2	3	5	2	M	M	M
<b>Calex-01</b>	3	2	2	M	M	3	M
<b>LAAL19</b>	6	M	5	3	M	M	M
<b>Paequ8</b>	2	4	M	2	2	M	M
<b>Cd1</b>	6	4	M	M	M	2	M
<b>Pc B109</b>	3	M	2	3	2	M	12
<b>Patbel3</b>	7	M	2	M	3	M	M
<b>Ole25</b>	7	3	M	M	M	3	M
<b>Ole26</b>	3	3	M	M	2	M	M
<b>Oc28B</b>	4+2	M	3	2	M	M	M
<b>Cd3</b>	4	M	M	M	2	M	M
<b>Parm02</b>	4	4	M	M	M	M	M
<b>Ptero09</b>	4	2	M	M	M	M	M
<b>Pacbel_15327</b>	3	2	M	M	M	M	M
<b>Oc79</b>	2	M	M	2	M	M	M
<b>Omn3</b>	4	M	M	2	M	M	M

Celkově v rámci Aequorlitornithes je pro pelikána bílého otestováno a charakterizováno v laboratoři populační genetiky 154 polymorfních mikrosatelitních lokusů na 21 nepříbuzných jedincích. Jejich přehled uvádím v Grafu č. 2. V rámci 154 lokusů jsem charakterizovala a analyzovala celkem 36 párů primerů, které poskytovaly 37 polymorfních produktů.

**Graf č. 2:** 154 polymorfních *cross-species* mikrosatelitů, které byly u pelikána bílého charakterizovány. Jejich počet je uveden v závorce u názvů čeledí, ze kterých pocházely.



Všechny mikrosatelity, které vykazovaly polymorfismus u pelikána bílého, byly dohromady zpracovány programy Cervus 3.0.7 a Genopop. Pomocí programu Genopop se zjistilo, že jeden mnou charakterizovaný mikrosatelit (Ole26) je ve velmi silné vazbě s mikrosatelitem Sn2A-36, který pochází od tereje modronohého (*Sula nebouxii*) (Tailor *et al.*, 2010). U mikrosatelitu Sn2A-36 je známo, že je vázaný na pohlaví, ale není to typická vazba na chromozom Z. U tohoto lokusu se vazba na chromozom Z projevuje tak, že všechny samice jsou homo nebo heterozygotní a samci jsou vždy homozygotní (Buržáková, 2011). Lokus Ole26 by mohl v budoucnosti sloužit jako genetický marker pohlaví pro pelikány bílé

## 5 Závěr

V této diplomové práci jsem charakterizovala a analyzovala 42 mikrosatelitních lokusů, které byly označeny za polymorfní v bakalářské práci Hudzieczkové (2019), která je testovala na 6 nepříbuzných jedincích pelikána bílého (*Pelecanus onocrotalus*). Jednalo se o 8 mikrosatelitů odvozených od zástupců z čeledi albatrosovití (Diomeideidae), 22 z čeledi buňňákovití (Procellariidae), 11 z čeledi buňňáčkovití (Hydrobatidae) a 1 mikrosatelit, který byl izolovaný od kulíka mořského z čeledi kulíkovití (Charadriidae) z řádu dlouhokřídli. Charakterizaci mikrosatelitů jsem prováděla pomocí metody *cross-species* PCR amplifikace na 21 nepříbuzných jedincích pelikána bílého.

Snažila jsem se charakterizovat 42 mikrosatelitních lokusů, které měly být polymorfní u pelikána bílého. Z toho jsem 1 vyřadila jako monomorfní a 5 jako nehodnotitelných. Celkem jsem amplifikovala 36 párů primerů, které poskytovaly 37 polymorfních produktů. Tyto produkty jsem charakterizovala pomocí genetických programů Cervus 3.0.7 a Genopop. Tyto lokusy mohou sloužit pro studium variability a paternity u pelikána bílého.

## **6 Didaktická část**

### **1) Zařazení tématu do výuky**

Téma mé diplomové práce je nad rozsah RVP střední školy či gymnázia. Téma PCR bych zařadila do výuky biologie, konkrétně pak do genetiky. Dále bych se pak také zmínila v biologii živočichů o pelikánu bílém a jeho charakteristických znacích.

### **2) Plán výuky**

PCR se řadí mezi metody do metod genetického inženýrství, proto bych ho zmínila společně s restrikční a sekvenční analýzou. Na úvod bych žáky seznámila s tím, co to genetické inženýrství je, jak dochází k izolaci a namnožení DNA. Tím bych navázala na PCR a vysvětlila princip této metody. V zoologii živočichů bych žáky informovala o rozšíření a zařazení pelikána bílého do systému ptáků a jeho rozšířením tohoto druhu. Na začátku další hodiny bych žákům rozdala pracovní list pro otestování znalostí z minulé hodiny.

## 7 Přílohy

**Příloha č. 1:** Pracovní list pro žáky k didaktické části.

**Úkol č. 1:** Pospojujte správné dvojice.

PCR	úseky DNA složené z tandemově se opakujících repetit
termocykler	zmnožení
annealing	přístroj, používaný k amplifikaci DNA
mikrosatelity	<i>in vitro</i> replikace DNA
amplifikace	hybridizace, spojení jednovláknna do dvojevláknna na základě komplementarity

**Úkol č. 2:** Doplňte křížovku.

1. Změna genetické informace.
2. Přesné a rovnoměrné rozdělení duplikovaných chromozomů (ve které fázi).
3. Vědec, který popsal strukturu DNA společně s J. Watsonem.
4. Místo rozdělení chromozomu na dvě raménka.
5. Veškerá genetická informace organismu.
6. Gen, který hraje důležitou roli při rozvoji mužského pohlaví.
7. Varianta genu.
8. Překlad RNA do molekuly proteinu.
9. Jeden z pěti základních typů určení pohlaví.
10. Zakladatel genetiky (příjmení).
11. Nejrozšířenější modelový organismus používaný v genetice. Pracoval s ním už T. H. Morgan.
12. Nejčastější porucha barevného vnímání, kdy jedinec není schopen rozlišit červenou a zelenou barvu.

## Úkol č. 2: Pokračování

1. 

--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

2. 

--	--	--	--	--	--	--	--

3. 

--	--	--	--	--	--	--	--	--

4. 

--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

5. 

--	--	--	--	--	--	--

6. 

--	--	--	--	--	--

7. 

--	--	--	--	--	--	--

8. 

--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

9. 

--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

10. 

--	--	--	--	--	--	--	--

11. 

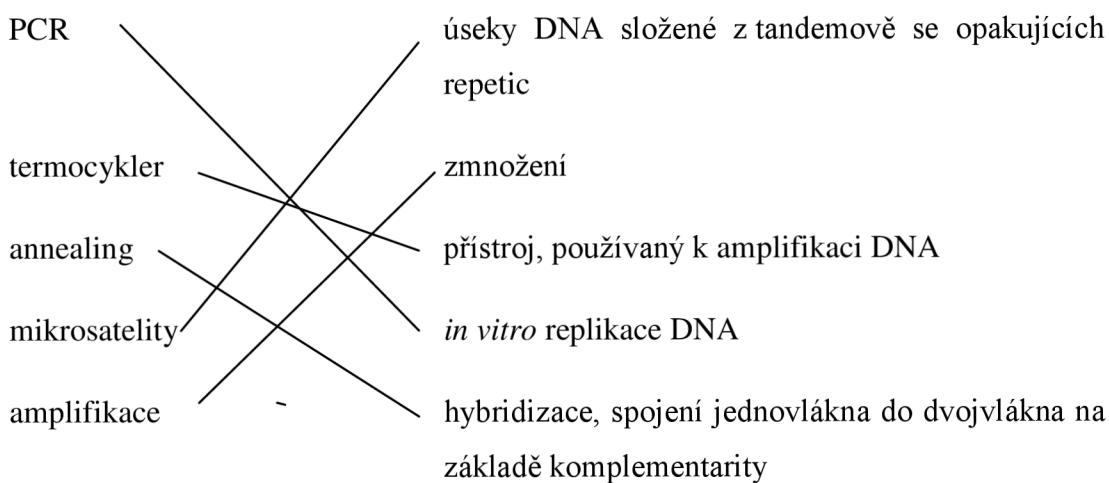
--	--	--	--	--	--	--	--	--

12. 

--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

**Příloha č. 2:** Pracovní list pro učitele k didaktické části.

**Úkol č. 1:** Pospojte správné dvojice.



**Úkol č. 2:** Doplňte křížovku.

1. Změna genetické informace.
2. Přesné a rovnoměrné rozdělení duplikovaných chromozomů (ve které fázi).
3. Vědec, který popsal strukturu DNA společně s J. Watsonem.
4. Místo rozdělení chromozomu na dvě raménka.
5. Veškerá genetická informace organismu.
6. Gen, který hraje důležitou roli při rozvoji mužského pohlaví.
7. Varianta genu.
8. Překlad RNA do molekuly proteinu.
9. Jeden z pěti základních typů určení pohlaví.
10. Zakladatel genetiky (příjmení).
11. Nejrozšířenější modelový organismus používaný v genetice. Pracoval s ním už T. H. Morgan.
12. Nejčastější porucha barevného vnímání, kdy jedinec není schopen rozlišit červenou a zelenou barvu.



**Úkol č. 2: Pokračování**

1.				M	U	T	A	C	E			
2.			M	I	T	Ó	Z	A				
3.	C	R	I	C	K							
4.	C	E	N	T	R	O	M	É	R	A		
5.		G	E	N	O	M						
6.				S	R	Y						
7.				A	L	E	L	A				
8.				T	R	A	N	S	L	A	C	E
9.		P	R	O	T	E	N	O	R			
10.	M	E	N	D	E	L						
11.	O	C	T	O	M	I	L	K	A			
12.		D	A	L	T	O	N	I	S	M	U	S

**Příloha č. 3:** Výstup z programu Cervus 3.0.7. Charakteristika 37 polymorfních mikrosatelitních lokusů u 21 nepříbuzných jedinců pelikána bílého.

Lokus	k	N	H <sub>Obs</sub>	H <sub>Exp</sub>	PIC	NE-1P	NE-2P	NE-PP	NE-I	NE-SI	HW	f (Null)
<b>7D8</b>	2	21	0,238	0,215	0,188	0,978	0,906	0,838	0,646	0,807	ND	-
<b>11H1</b>	2	21	0,286	0,251	0,215	0,970	0,893	0,819	0,600	0,778	ND	-
<b>D24</b>	3	21	0,571	0,528	0,438	0,867	0,751	0,619	0,313	0,570	NS	-
<b>Dc31</b>	4	21	0,286	0,443	0,373	0,906	0,792	0,670	0,382	0,629	NS	0,2447
<b>De35</b>	2	21	0,143	0,136	0,124	0,991	0,938	0,888	0,761	0,874	ND	-
<b>BFAL4</b>	2	21	0,000	0,502	0,370	0,880	0,815	0,722	0,380	0,600	***	0,9994
<b>Ole01</b>	3	21	0,190	0,180	0,166	0,985	0,913	0,841	0,689	0,834	ND	-
<b>Ole09</b>	2	21	0,000	0,177	0,157	0,985	0,921	0,861	0,700	0,839	ND	0,8973
<b>Oc84</b>	3	21	0,714	0,623	0,527	0,815	0,683	0,537	0,235	0,505	NS	-
<b>Ole25</b>	7	20	0,350	0,821	0,774	0,564	0,386	0,202	0,066	0,367	NS	0,3907
<b>LAAL19</b>	6	21	0,619	0,702	0,650	0,715	0,533	0,335	0,135	0,441	NS	0,0580
<b>Paequ3</b>	4	21	0,667	0,635	0,557	0,800	0,648	0,486	0,207	0,492	NS	-
<b>Paequ8</b>	2	21	0,667	0,511	0,374	0,876	0,813	0,719	0,376	0,594	NS	-
<b>Tch6</b>	3	21	0,238	0,408	0,336	0,921	0,822	0,717	0,425	0,657	NS	0,2495
<b>Cd1</b>	6	21	0,714	0,735	0,671	0,696	0,522	0,340	0,126	0,423	NS	-
<b>Cd3</b>	4	21	0,524	0,584	0,501	0,830	0,692	0,537	0,253	0,528	NS	0,0294
<b>Ole19</b>	2	21	0,143	0,285	0,239	0,961	0,880	0,803	0,560	0,751	ND	0,3205
<b>Ole26</b>	3	21	0,143	0,554	0,453	0,854	0,742	0,611	0,299	0,554	***	0,6086
<b>Omn3</b>	4	21	0,381	0,596	0,496	0,825	0,703	0,557	0,261	0,524	NS	0,2267
<b>Cd5</b>	2	21	0,762	0,502	0,370	0,880	0,815	0,722	0,380	0,600	NS	-
<b>Cd6</b>	2	21	0,143	0,494	0,366	0,884	0,817	0,724	0,385	0,605	NS	0,5426
<b>Parm02</b>	4	21	0,476	0,580	0,508	0,831	0,684	0,521	0,247	0,529	NS	0,0773
<b>Puff1.5</b>	2	21	0,095	0,177	0,157	0,985	0,921	0,861	0,700	0,839	ND	0,2857

**Příloha č. 3: Pokračování**

<b>Lokus</b>	<b>k</b>	<b>N</b>	<b>H<sub>Obs</sub></b>	<b>H<sub>Exp</sub></b>	<b>PIC</b>	<b>NE-1P</b>	<b>NE-2P</b>	<b>NE-PP</b>	<b>NE-I</b>	<b>NE-SI</b>	<b>HW</b>	<b>f (Null)</b>
<b>Ptero04</b>	3	21	0,429	0,591	0,510	0,833	0,692	0,542	0,246	0,523	NS	0,1662
<b>Ptero09</b>	4	21	0,476	0,577	0,521	0,829	0,665	0,489	0,233	0,527	NS	0,1172
<b>Oc28a</b>	4	21	0,571	0,654	0,577	0,783	0,626	0,459	0,192	0,479	NS	0,0629
<b>Oc28b</b>	2	21	0,381	0,418	0,325	0,917	0,838	0,749	0,434	0,654	NS	0,0345
<b>Omn8</b>	7	21	0,810	0,756	0,712	0,642	0,456	0,253	0,095	0,405	NS	-
<b>Pc B109</b>	3	21	0,524	0,539	0,455	0,862	0,735	0,596	0,296	0,561	NS	0,0015
<b>Patbel12</b>	5	21	0,667	0,720	0,652	0,716	0,546	0,368	0,140	0,433	NS	0,0345
<b>Patbel13</b>	7	21	0,762	0,852	0,810	0,510	0,338	0,165	0,051	0,347	ND	0,0421
<b>Patbel6</b>	2	21	0,143	0,136	0,124	0,991	0,938	0,888	0,761	0,874	ND	-
<b>Pacbel_08867</b>	3	21	0,190	0,180	0,166	0,985	0,913	0,841	0,689	0,834	ND	-
<b>Pacbel_10895</b>	2	21	0,048	0,048	0,045	0,999	0,977	0,956	0,910	0,954	ND	-
<b>Pacbel_15327</b>	3	21	0,238	0,222	0,205	0,977	0,889	0,802	0,625	0,798	ND	-
<b>Oc79</b>	2	21	0,381	0,483	0,360	0,889	0,820	0,728	0,390	0,612	NS	0,1064
<b>Calex-01</b>	3	21	0,333	0,361	0,315	0,938	0,827	0,713	0,456	0,688	ND	0,0151

**Legenda:**

k	počet nalezených alel
N	počet testovaných jedinců
H <sub>Obs</sub>	pozorovaná heterozygotnost
H <sub>Exp</sub>	očekávaná heterozygotnost
PIC	vypovídací hodnota lokusu
NE-1P	pravděpodobnost chybného přiřazení prvního rodiče k mláděti v případě, že není znám ani jeden z rodičů
NE-2P	pravděpodobnost chybného přiřazení druhého rodiče k mláděti v případě, že je znám první z rodičů
NE-PP	pravděpodobnost chybného přiřazení rodičovského páru k mláděti
NE-I	pravděpodobnost výskytu stejné alelové konstituce všech polymorfních lokusů u dvou náhodně vybraných nepříbuzných jedinců
NE-SI	pravděpodobnost výskytu stejné alelové konstituce všech polymorfních lokusů u dvou příbuzných mláďat

HW	soulad/odchylka od Hardy-Weinbergovy rovnováhy
NS	lokus je v souladu s Hardy-Weinbergovou rovnováhou
ND	lokus nelze vyhodnotit, zda je nebo není v souladu s Hardy-Weinbergovou rovnováhou
***	signifikantní odchylka od Hardy-Weinbergovy rovnováhy na hladině významnosti 0,1 %
F (null)	frekvence výskytu nulových alel

Number of individuals:	21
Number of loci:	37
Mean number of alleles per locus:	3,351
Mean proportion of loci typed:	0,9987
Mean expected heterozygosity:	0,4641
Mean polymorphic information content (PIC):	0,3997
Combined non-exclusion probability (first parent):	0,00265121
Combined non-exclusion probability (second parent):	0,00000984
Combined non-exclusion probability (parent pair):	$3,479 \cdot 10^{-9}$
Combined non-exclusion probability (identity):	$7,879 \cdot 10^{-19}$
Combined non-exclusion probability (sib identity):	$6,994 \cdot 10^{-9}$

## 8 Literatura

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

Bartoňková, I. (2013): Analýza a charakteristika polymorfních *cross-species* mikrosatelitů u pelikána bílého (*Pelecanus onocrotalus*) a pelikána skvrnozobého (*P. philippensis*). Diplomová práce. Depon in: Knihovna biologických oborů PřF UPOL Olomouc.

Bicknell, A. W. J., Dawson, D. A., Horsburgh, G. J., Knight, M. E., Bilton, D. T., Votier, S. C. (2011): Characterisation and predicted genome locations of Leach's stormpetrel (*Oceanodroma leucorhoa*) microsatellite loci (Procellariidae, Aves). Conservation Genetics Resources, 3, 711–716.

Bouchner, M. (1989): Kapesní atlas ptáků. Státní pedagogické nakladatelství, Praha.

Bried, J., Andris, M., Dubois, M.-P., Jarne, P. (2012): Eighteen polymorphic microsatellite markers in Monteiro's storm-petrel, *Oceanodroma monteiroi*, and cross-species amplification in three other Procellariiformes. Molecular Ecology Resources. Manuskript, dostupné online na <https://www.yumpu.com/en/document/48view/39976169/eighteen-polymorphic-microsatellite-markers-in-monteiros-storm>, navštíveno dne 25. 2. 2021.

Bried, J., Dubois, M.-P., Jouventin, P., Santos, R. S. (2008): Eleven polymorphic microsatellite markers in Cory's shearwater, *Calonectris diomedea*, and cross-species amplification on threatened Procellariiformes. Molecular Ecology Resources, 8, 602–604.

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

Brown, R. M., Jordan, W. C. (2009): Characterization of polymorphic microsatellite loci from Round Island Petrels (*Pterodroma arminjoniana*) and their utility in other seabird species. Journal of Ornithology, 150, 925–929.

Burg, T. M. (1999): Isolation and characterization of microsatellites in albatrosses. Molecular Ecology, 8, 338–341.

Burg, T. M., Croxall, J. P. (2001): Global relationships amongst black-browed and greyheaded albatrosses: analysis of population structure using mitochondrial DNA and microsatellites. *Molecular Ecology*, 10, 2647–2660.

Buržáková, K. (2011): Analýza vybraných polymorfních *cross-species* mikrosatelitů pro determinaci paternity u pelikána bílého (*Pelecanus onocrotalus*) a pelikána skvrnozobého (*P. philippensis*). Bakalářská práce. Depon in: Knihovna biologických oborů PřF UPOL Olomouc.

Dawson, D. A., Ball, A. D., Spurgin, L. G., Martín-Gálvez, D., Stewart, I. R., Horsburgh, G. J., Potter, J., Molina-Morales, M., Bicknell, A. W. J., Preston, S. A. J., Ekblom, R., Slate, J., Burke, T. (2013): High-utility conserved avian microsatellite markers enable parentage and population studies across a wide range of species. *BMC Genomics*, 14, 176.

Dawson, D. A., Horsburgh, G. J., Küpper, C., Stewart, I. R. K., Ball, A. D., Durrant, K. L., Hansson, B., Bacon, I., Bird, S., Klein, A., Krupa, A. P., Lee, J. W., Martín-Gálvez, D., Simeoni, M., Smith, G., Spurgin, L. G., Burke, T. (2010): New methods to identify conserved microsatellite loci and develop primer sets of high cross-species utility – as demonstrated for birds. *Molecular Ecology Resources*, 10, 475–494.

De Ponte Machado, M., Feldheim, K., Sellas, A., Bowie, R. (2009): Development and characterization of microsatellite loci from the Great White Pelican (*Pelecanus onocrotalus*) and widespread application to other members of the Pelecanidae. *Conservation Genetics*, 10, 1033–1036.

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.

Dubois, M.-P., Jarne, P., Jouventin, P. (2005): Ten polymorphic microsatellite markers in the wandering albatross *Diomedea exulans*. *Molecular Ecology Notes*, 5, 905–907.

Gaisler, J., Zima, J. (2007): Zoologie obratlovců. Academia - nakladatelství Akademie věd České republiky, Praha, 431–490.

Goldstein, D., Schlotterer, C. (1999): *Microsatellites, evolution and applications*. Oxford University Press, Oxford.

Gonzalez, E. G., Genovart, M., Oro, D., Zardoya, R., Juste, J. (2009): Polymorphic microsatellite markers for the critically endangered Balearic shearwaters, *Puffinus mauretanicus*. *Molecular Ecology Resources*, 9, 1044–1046.

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

Hanzák, J., Hudec, K. (1974): *Světlem zvířat. Díl 2. Část 1, Ptáci. Druhé přepracované vydání. Albatros, Praha*.

Hardesty, B. D., Metcalfe, S. S., Wilcox, C. (2013): Genetic variability and population diversity as revealed by microsatellites for Flesh-footed shearwaters (*Puffinus carneipes*) in the southern hemisphere. *Conservation Genetics Resources*, 5, 27–29.

Hedges, S. B., Sibley, C. G. (1994): Molecules vs. morphology in avian evolution: the case 59 of the "pelecaniform" birds. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91, 9861–9865.

Hernandez, L. D., Lounsbury, Z. T., Collins, P. W., Henry, R. W., Newsome, S. D., Sacks, B. N. (2014): Development and characterization of 15 polymorphic microsatellite markers for North Pacific albatrosses using paired-end Illumina shotgun sequencing. *Conservation Genetics Resources*, 6, 491–493.

Hickman, C. R., Peters, M. B., Crawford, N. G., Hagen, C., Glenn T. C., Somers, C. M. (2008): Development and characterization of microsatellite loci in the American white pelican (*Pelecanus erythrorhynchos*). *Molecular Ecology Resources*, 8, 1439–1441.

Hudzieczková, A. (2019): *Cross-species* amplifikace mikrosatelitů z řádu trubkonosí u pelikána bílého (*Pelecanus onocrotalus*). Bakalářská práce. Depon in: Knihovna biologických oborů PřF UPOL, Olomouc.

Janušová, D. (2017): Charakteristika vybraných polymorfních *cross-species* mikrosatelitů z kladu Aequorlitorhithes u potápky roháče (*Podiceps cristatus*). Bakalářská práce. Depon in: Knihovna biologických oborů PřF UPOL, Olomouc.

Jarvis, E. D., Mirarab, S., Aberer, A. J., Li, B., Houde, P., Li, C., Ho, S. Y. W., Faircloth, B. C., Nabholz, B., Howard, J. T., Suh, A., Weber, C. C., da Fonseca, R. R., Li, J., Zhang, F., Li, H., Zhou, L., Narula, N., Liu, L., Ganapathy, G., Boussau, B., Bayzid, S., Zavidovych, V., Subramanian, S., Gabaldón, T., Capella-Gutiérrez, S., Huerta-Cepas, J., Rekepalli, B., Munch, K., Schierup, M., Lindow, B., Warren, W. C., Ray, D., Green, R. E., Bruford, M. W., Zhan, X., Dixon, A., Li, S., Li, N., Huang, Y., Derryberry, E. P., Bertelsen, M. F., Sheldon, F. H., Brumfield, R. T., Mello, C. V., Lovell, P. V., Wirthlin, M., Schneider, M. P. C., Prosdocimi, F., Samaniego, J. A., Velazquez, A. M. V., Alfaro-Núñez, A., Campos, P. F., Petersen, B., Sicheritz-Ponten, T., Pas, A., Bailey, T., Scofield, P., Bunce, M., Lambert, D. M., Zhou, Q., Perelman, P., Driskell, A. C., Shapiro, B., Xiong, Z., Zeng, Y., Liu, S., Li, Z., Liu, B., Wu, K., Xiao, J., Yinqi, X., Zheng, Q., Zhang, Y., Yang, H., Wang, J., Smeds, L., Rheindt, F. E., Braun, M., Fjeldsa, J., Orlando, L., Barker, F. K., Jönsson, K. A., Johnson, W., Koepfli, K. P., O'Brien, S., Haussler, D., Ryder, O. A., Rahbek, C., Willerslev, E., Graves, G. R., Glenn, T. C., McCormack, J., Burt, D., Ellegren, H., Alström, P., Edwards, S. V., Stamatakis, A., Mindell, D. P., Cracraft, J., Braun, E. L., Warnow, T., Jun, W., Gilbert, M. T. P., Zhang, G. (2014): Whole-genome analyses resolve early branches in the tree of life of modern birds. *Science*, 346, 1320–1331.

Jeyasingham, W., Taylor, S., Zavalaga, C., Simeone, A., Friesen, V. (2013): Specialization to cold-water upwellings may facilitate gene flow in seabirds: New evidence from the Peruvian pelican *Pelecanus thagus* (Pelecaniformes: Pelecanidae). *Journal of Avian Biology*, 44, 297–304.

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

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

Kopečná, K. (2020): Analýza a charakteristika vybraných polymorfních mikrosatelitů z řádů trubkonosí a tučňáci a konzervovaných ptačích mikrosatelitů u pelikána afrického (*Pelecanus rufescens*). Diplomová práce. Depon in: Knihovna biologických oborů PřF UPOL Olomouc.



Kovalik, P., Pačenovský, S., Čapek, M., Topercer, J. (2010): Slovenské mená vtákov sveta. SOS/BirdLife Slovensko, Bratislava. Aktualizováno pro rok 2010.

Kremlová, H. (2019): *Cross-species* amplifikace mikrosatelitů z řádu tučňáci a konzervovaných ptačích mikrosatelitů u pelikána bílého (*Pelecanus onocrotalus*). Bakalářská práce. Depon in: Knihovna biologických oborů PřF UPOL, Olomouc.

Kremlová, H. (2021): Analýza a charakteristika vybraných polymorfních mikrosatelitů z řádu tučňáci a konzervovaných ptačích mikrosatelitů u pelikána bílého (*Pelecanus onocrotalus*). Diplomová práce. Depon in: Knihovna biologických oborů PřF UPOL, Olomouc.

Lawrence, H. A. (2008): Conservation genetics of the world's most endangered seabird, the Chatham Island tāiko (*Pterodroma magentae*). Dissertation. Auckland, New Zealand, dostupné online na <https://mro.massey.ac.nz/handle/10179/657>, navštíveno dne 25. 2. 2021

Mayr, G. (2003): The phylogenetic affinities of the Shoebill (*Balaeniceps rex*). Journal of Ornithology, 144, 157–175.

Mikulová, V. (2010): Mikrosatelitové lokusy pro determinaci paternity u vybraných druhů pelikánů (*Pelecanus* spp.). Diplomová práce. Depon in: Knihovna biologických oborů PřF UPOL, Olomouc.

Moodley, Y., Masello, J. F., Cole, T. L., Calderon, L., Munimanda, G. K., Thali, M. R., Alderman, R., Cuthbert, R. J., Marin, M., Massaro, M., Navarro, J., Phillips, R. A., Ryan, P. G., Suazo, C. G., Cherel, Y., Weimerskirch, H., Quillfeldt, P. (2015): Evolutionary factors affecting the cross-species utility of newly developed microsatellite markers in seabirds. Molecular Ecology Resources, 15, 1046–1058.

Moore, S. S., Sargeant, L. L., King, T. J., Mattick, J. S., georges, M., Hetzel, D. J. (1991): The conservation of dinucleotide microsatellites among mammalian genomes allows the use of hetelogenous PCR primer pairs in closely related species. Genomics, 10, 654–660.

Nedvěďová, M. (2015): *Cross-species* amplifikace mikrosatelitů z řádu trubkonosí u nesyta indomalajského (*Mycteria leucocephala*). Diplomová práce. Depon in: Knihovna biologických oborů PřF UPOL, Olomouc.

- Nelson, J. B. (2005): Pelicans, Cormorants, and their Relatives. The Pelecaniformes, 1st ed. Oxford University Press, Oxford, 661.
- Oliveira, E. J., Pádua, J. G., Zucchi, M. I., Vencovsky, R., Vieira, L. C. (2006): Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. *Genetics and Molecular Biology*, 29, 294–307.
- Prum, R. O., Berv, J. S., Dornburg, A., Field, D. J., Townsend, J. P., Lemmon, E. M., Lemmon, A. R. (2015): A comprehensive phylogeny of birds (Aves) using targeted next-generation DNA sequencing. *Nature*, 526, 569–573.
- Primmer, C. R., Møller, A. P., Ellegren, H. (1996): A wide-range survey of cross-species microsatellite amplification in birds. *Molecular Ecology*, 5, 365–378.
- Primmer, C. R., Painter, J. N., Koskinen, M. T., Palo, J. U., Merilä, J. (2005): Factors affecting avian cross-species microsatellite amplification. *Journal of Avian Biology*, 36, 348–360.
- Quillfeldt, P., Masello, J. F., Segelbacher, G. (2012): Extra-pair paternity in seabirds: a review and case study of Thin-billed Prions *Pachyptila belcheri*. *Journal of Ornithology*, 153, 367–373.
- Ranochová, A. (2008): Analýza mikrosatelitových lokusů pro determinaci paternity u vybraných druhů pelikánů. Diplomová práce. Depon in: Knihovna biologických oborů PřF UPOL, Olomouc.
- Reudink, M., Kyle, C. H. J., Nocera, J. J., Oomen, R. A., Green, M. C., Somers, C. H. M. (2011): Panmixia on a continental scale in a widely distributed colonial waterbird. *Biological Journal of the Linnean Society*, 102, 583–592.
- Rousset, F. (2008): GENEPOP'007: a complete re-implementation of the GENEPOP software for Windows and Linux. *Molecular Ecology Resources*, 8, 103–106.
- Sharma, P. C., Grover, A., Kahl, G. (2007): Mining microsatellites in eukaryotic genomes. *Trends in Biotechnology*, 25, 490–498.
- Schlosser, J. A., Garner, T. W. J., Dubach, J. M., McElligott, A. G. (2003): Characterization of microsatellite loci in Humboldt penguin (*Spheniscus humboldti*) and crossamplification in other penguin species. *Molecular Ecology Notes*, 3, 62–64.

- Schlötterer, C. (2000): Evolutionary dynamics of microsatellite DNA. *Chromosoma*, 109, 365–371.
- Sibley, C. G., Ahlquist, J. E. Monroe, B. L. (1988): A Classification of the Living Birds of the World Based on DNA-DNA Hybridization Studies. *The Auk*, 105, 409–423.
- Strejčková, B. (2018): Analýza a charakteristika polymorfních *cross-species* mikrosatelitů od trubkonosých u plameňáka karibského (*Phoenicopterus ruber*). Diplomová práce. Depon in: Knihovna biologických oborů PřF UPOL, Olomouc.
- Sun, Z., Gómez-Díaz, E., Bailie, A., Friesen, V. (2009): Isolation and characterization of microsatellite loci for storm-petrels. *Molecular Ecology Resources*, 9, 913–915.
- Šťastný, K., Bejček, V., Hudec, K. (1998): Svět zvířat IV. Ptáci 1. Albatros, Praha.
- Taylor, S. A., Morris-Pocock, J. A., Sun, Z., Friesen, V. L. (2010): Isolation and characterization of ten microsatellite loci in Blue-footed (*Sula nebouxii*) and Peruvian Boobies (*Sula variegata*). *Journal of Ornithology* 151; 525–528.
- Techow, N. M. S. M., O’Ryan, C. (2004): Characterization of microsatellite loci in Whitechinned Petrel (*Procellaria aequinoctialis*) and cross-amplification in six other procellariiform species. *Molecular Ecology Notes*, 4, 33–35.
- Tóth, G., Gáspári, Z., Jurka, J. (2000): Microsatellites in different eukaryotic genomes: Survey and analysis. *Genome Research*, 10, 967–981.
- Verešová, D. (2020): Analýza a charakteristika vybraných polymorfních mikrosatelitů z řádů trubkonosí a tučňáci a konzervovaných ptačích mikrosatelitů u pelikána kadeřavého (*Pelecanus crispus*) a u plameňáka růžového (*Phoenicopterus roseus*). Diplomová práce. Depon in: Knihovna biologických oborů PřF UPOL Olomouc.
- Vieira, M. L. C., Santini, L., Diniz, L., de Freitas Munhoz, C. (2016). Microsatellite Markers: What They and Why They Are so Useful. *Genetics and Molecular Biology*, 39, 312–328.

Welch, A. J., Fleischer, R. C. (2011): Polymorphic microsatellite markers for the endangered Hawaiian petrel (*Pterodroma sandwichensis*). *Conservation Genetics Resources*, 3, 581–584.

Winkler, D. W., Biller, S. M., Lovette, I. J. (2015): *Bird families of the world: an invitation to the spectacular diversity of birds*. Lynx Editions, Barcelona.

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

Zlochová, A. (2019): Amplifikace vybraných polymorfních mikrosatelitů z řádu trubkonosí u plameňáka růžového (*Phoenicopus roseus*). Diplomová práce. Depon in: Knihovna biologických oborů PřF UPOL v Olomouci.